

Department Chemie
der Technischen Universität München

Niedermolekulare $\alpha_4\beta_7$ -Integrinantagonisten

Timo Martin Weide

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler
2. Univ.-Prof. Dr. O. Nuyken, i. R.

Die Dissertation wurde am 27.10.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 28.11.2005 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München und im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München in der Zeit von September 2002 bis Oktober 2005 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Kessler angefertigt.

Meinem verehrten Lehrer Herrn Professor Kessler danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, das Interesse an meiner Arbeit und seinem mir stets entgegengebrachten Vertrauen. Besonderer Dank gilt neben der Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen der Schaffung eines hervorragenden Arbeitsklimas und seinem enormen Bemühen der Vermittlung einer breiten naturwissenschaftlichen Bildung.

Mein weiterer Dank gilt:

- meinen Laborkollegen Torsten Arndt, Georgette Thumshirn, Benjamin Roßbach, Jayanta Chatterjee und Florian Opperer für ein immer gut gelauntes und fröhliches Umfeld,
- Dr. Monika Semmrich für die Durchführung von biologischen Untersuchungen,
- Dominik Heckmann, Armin Modlinger, Benjamin Roßbach und Jörg Auernheimer für engagiertes Korrekturlesen des Manuskripts,
- Mona Wolff für die Durchführung einiger Synthesen und ihrer Leihgaben verschiedenster Laborgeräte,
- Frau Kranawetter für die Unterstützung bei HPLC-Trennungen,
- Herr Cordes für die ESI-MS-Analytik,
- meinen „Praktis“ Tobias, Anja, Corinna, Simon, Markus, Andreas, Melanie, Melanie, Sarah und insbesondere Daniela und Grit für ihre rege Mitarbeit am Arbeitsplatz,
- Rainer Haeßner und Alex Frenzel für ihre Hilfe bei Fragen rund um den Computer, NMR, etc.,

- Benjamin Roßbach, Dominik Heckmann, Armin Modlinger, Eric Biron, Jörg Auernheimer, Florian Manzenrieder, Markus Heller, Michael John, Melina Haupt und Florian Opperer für die Inseln der Entspannung,
- allen bisher nicht namentlich genannten wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern für das tolle Arbeitsklima.

Besonders danken möchte ich meiner Familie, die mich während des Studiums und während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit in allen Belangen unterstützte.

ABKÜRZUNGEN

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Å	Ångström, 10^{-10} m
abs.	absolutiert
Ac	Acetyl
CAN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination
Ar	Aromat
AS	Aminosäure
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-
Bu	Butyl
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
CAN	Cerammoniumnitrat
CD	<i>Crohn disease</i>
CDI	Carbonyldiimidazol
CD49d/CD29	$\alpha_4\beta_1$
CHO	<i>Chinese hamster ovarial</i>
CID	<i>Collision-induced dissociation</i>
Col	Kollagen
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CS1-CS5	Peptide aus <i>epitope mapping</i> der IIICS-Region (Fibronektin)
COX	Cyclooxygenase
d	Dublett oder <i>days</i>
DCM	Dichlormethan
δ	chemische Verschiebung
1D, 2D	eindimensional, zweidimensional
DC	Dünnschichtchromatographie/-chromatogramm
dd	Doppeldublett
dest.	destilliert
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	<i>N,N'</i> -Dimethylaminopyridin
DME	Dimethoxyethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix
EE	Essigsäureethylester

Eq	Äquivalent(e)
ESI-MS	<i>electrospray ionization mass spectrometry</i>
Et	Ethyl
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fn	Fibronektin
ges.	gesättigt
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HMQC-COSY	<i>Heteronuclear multiple quantum coherence mit COSY-Sequenz</i>
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Hz	Hertz
HV	Hochvakuum
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
IC	<i>inhibitory capacity</i>
ICAM	<i>intercellular cell adhesion molecules</i>
Ig	<i>Immunoglobulin</i>
IgCAM	<i>immunoglobulin cell adhesion molecule</i>
IgSF	<i>immunoglobulin superfamily</i>
J	Skalare Kopplungskonstante
IIICS	<i>typeIII connecting segment</i> (Fibronektin)
In	Invasin
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
LDA	Lithiumdiisopropylamid
Ln	Laminin
LPAM	<i>lymphocyte Peyer's patch specific adhesion molecule-1</i> , $\alpha4\beta7$ -Integrin
m	Multipllett
M	molar
MAdCAM-1	<i>Mucosal addressing cell adhesion molecule-1</i>
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minuten
MG	Molgewicht
mL	Milliliter
mmol	Millimol

MS	Massenspektrometrie oder Multiple Sklerose
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
Opn	Osteopontin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBL	<i>peripheral blood lymphocytes</i>
Ph	Phenyl
Ppm	<i>parts per million</i>
q	Quartett
R _f	Retentionsfaktor
ROESY	<i>rotating frame nuclear Overhauser and exchange spectroscopy</i>
R _t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Smp	Schmelzpunkt
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
t	Triplett
TBTU	O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
TCP	Tritylchlorid-Polystyrol-Harz
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TMOF	Trimethylorthoformiat
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TMS	Trimethylsilyl-
TOCSY	<i>total correlation spectroscopy</i>
Trt	Trityl
UC	<i>Colitis ulcerosa</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VLA	<i>very late activation antigen</i>
VLA-4	$\alpha_4\beta_1$ -Integrin
Vn	Vitronectin
vWF	von Willebrand Faktor
Xaa	Beliebige Aminosäure
z	Ladung

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 (CNO) 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 - außer in Überschriften - *kursiv* geschrieben.

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2 GRUNDLAGEN DER MEDIZINISCHEN CHEMIE.....	3
2.1 Pharmakologische Relevanz von Peptiden.....	3
2.2 Modifizierung der Leitstruktur.....	4
2.3 Empirische Regeln für die Entwicklung eines Wirkstoffes	6
2.4 Festphasensynthese.....	8
3 INTEGRINE ALS TARGETS IN DER MEDIZINISCHEN CHEMIE	11
3.1 Funktion der Integrine.....	11
3.2 Struktur der Integrine	12
3.3 Integrinliganden	16
3.4 Integrinaktivierung und Signaltransduktion.....	17
3.5 α_4 -Integrin-Rezeptoren	18
3.6 Liganden der α_4 -Integrine	21
3.7 Pathologische Bedeutung von α_4 -Integrinen.....	25
3.8 Synthetische α_4 -Integrinliganden als Therapeutika.....	26
4 ENTWICKLUNG VON $\alpha_4\beta_7$-INTEGRINLIGANDEN	31
4.1 Einführung	31
4.1.1 Vorarbeiten.....	36
4.1.2 Entwicklung von Peptidmimetika als $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden.....	40
4.2 Modifikation der N-terminalen Amidbindung durch aromatische Surrogate	41
4.2.1 Einführung.....	41
4.2.2 Aminophenyllessigsäuren als Bausteine für Peptidmimetika	43
4.2.3 Hydroxy-phenyllessigsäuren als Bausteine für Peptidmimetika.....	46
4.2.4 Indolizine als Peptid-Analoga.....	48
4.2.5 3-Substituierte Indolizin-1-carbonitril-Derivate als Phosphatase-Inhibitoren	54
4.2.6 Synthese von heterozyklischen Arylessigsäuren.....	57
4.3 Modifikation des C-terminalen Endes durch aromatische Surrogate.....	65
4.3.1 Einleitung	65
4.3.2 Verwendung von 2-Amino-2-(phenylethyl)-propionsäure als C-terminales Surrogat	66
4.3.3 Verwendung von 3-Amino-3-(pyridyl)-propionsäure und Methoxy- substituierten Derivaten	69
4.3.4 Reduzierte Amidbindung	72

4.3.5 Biaryle als C-terminales Surrogat.....	74
4.3.5.1 Die Suzuki-Reaktion	75
4.3.5.2 Festphasensynthese von 3-Amino-3-((pyridyl)phenyl)-propansäure- Derivaten	76
4.4 Beiträge zur Synthese von Alken-Dipeptid-Isosteren.....	78
4.5 Lactam-verbrückte Dipeptide.....	80
4.6 Piperazin-2-one und Piperazine als Peptidmimetika.....	83
4.6.1 Beiträge zur Synthese von RGD-Mimetika	86
4.7 Fusionierte Bicyklische Ringsysteme als Mimetika	90
4.7.1 Einleitung.....	90
4.7.2 Benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dion als Grundgerüst	91
4.7.3 2 <i>H</i> -Benzo[b][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-on-Derivate als 6,6-bicyklisches Grundgerüst.....	92
4.7.4 2 <i>H</i> -Benzo[b][1,4]oxazin-3(4 <i>H</i>)-on-2-carbonsäure-Derivate als 6,6-bicyklisches Grundgerüst	97
4.8 Biologische Evaluation.....	100
4.8.1 Zelladhäsionsassay - Allgemeine Testbedingungen.....	101
4.8.2 Kritische Betrachtung von Zell-Adhäsionsassays	102
4.8.3 Selektivität	103
4.8.4 Biologische Evaluation und Diskussion der synthetisierten Mimetika	103
5 ZUSAMMENFASSUNG	113
6 EXPERIMENTELLER TEIL	117
6.1 Material und allgemeine Arbeitsvorschriften	117
6.2 Synthese von Bausteinen	121
6.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	121
6.2.2 Spezielle Arbeitsvorschriften.....	131
6.3 Synthese von α_4-Antagonisten in Lösung	187
6.4 Festphasensynthese	197
6.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	197
6.4.2 Synthese von α_4 -Integrinantagonisten an der festen Phase	201
7 LITERATUR	223
8 ANHANG	239

1 Einleitung und Zielsetzung

1902 entdeckten Emil Fischer und Frank Hofmeister, dass Proteine aus Aminosäuren aufgebaut sind, welche durch Peptidbindungen verbunden werden.¹ Weitere Entwicklungen waren anfangs relativ schleppend auf Grund der Schwierigkeit, die polypeptidische Struktur aufzulösen und deren Synthese zu verwirklichen. Drei beeindruckende Durchbrüche in den fünfziger Jahren schienen diese Forschung zu revolutionieren. Zum einen die Isolierung, Strukturaufklärung und Totalsynthese von *Oxytocin* durch duVignaud, zum anderen Sanger's Strukturermittlung von Insulin und schließlich die Entdeckung der Doppelhelix der DNA, welche einen Zusammenhang zwischen Nucleotid- und Peptidsequenz deutlich werden ließ. Außerdem legte Bergmann den Grundstein für die Entwicklung der Peptidsynthese durch die Einführung der Z-Schutzgruppe. Heute wird Peptiden eine entscheidende Rolle als Neurotransmitter, Neuromodulatoren, Hormone, Antibiotika, Wachstumsfaktoren, Cytokine, Antigene, etc. zugesprochen: Sie sind dafür bekannt, alle essentiellen physiologischen Körperprozesse über sowohl inter- und intrazelluläre Kommunikation als auch durch rezeptorgesteuerte Signalübermittlung zu beeinflussen.^{2,3} In den letzten zwei Jahrzehnten zeigte sich, welche entscheidende Rolle Peptide sowohl bei der Entstehung von Krankheiten als auch für deren Bekämpfung spielen, während das menschliche Genom-Projekt noch hunderte oder tausende von neuen peptidischen Liganden und *targets* beisteuern wird. Das Hauptziel der Proteinforschung besteht darin, den Zusammenhang zwischen einer drei-dimensionalen, peptidischen Struktur und deren biologischer Aktivität zu verstehen, um die Entwicklung von adäquaten therapeutischen Mitteln in die Wege zu leiten. Dieses Gebiet umfasst ungefähr 50% der gegenwärtigen Pharmaforschung und wird in der Zukunft mehr und mehr an Geltung gewinnen.⁴⁻⁷

Zum Auslösen oder zur Unterdrückung einer biologischen Antwort ist die molekulare Erkennung eines Liganden durch einen Rezeptor entscheidend. Nicht nur für Peptide bedeutet dies die Wechselwirkung eines Teils der dreidimensionalen Oberfläche des Liganden mit der komplementären Oberfläche des Rezeptors. Obwohl natürliche, biologisch aktive Peptide ein großes Potential in der medizinischen Anwendung haben, müssen sie dennoch modifiziert werden, um gewisse Probleme in Bezug auf Pharmakodynamik und Bioverfügbarkeit zu überwinden. Die erwünschten, aber häufig nicht oder nicht ausreichend vorhandenen Eigenschaften, die das natürliche Peptid aufweisen sollte, beziehen sich 1) auf Rezeptorselektivität 2) hohe Aktivität 3) Stabilität gegenüber Hydrolyse und 4) ausreichende Bioverfügbarkeit. Diesen

Anforderungen werden im Idealfall sogenannte Peptidmimetika gerecht. Für die Entwicklung eines nicht-peptidischen Liganden wird zunächst versucht, geeignete Gerüststrukturen zu finden, welche die räumliche Anordnung der zur molekularen Erkennung und Signaltransduktion erforderlichen Komponenten, die so genannten pharmakophoren Gruppen, ermöglichen. Die richtige Wahl der Gerüststruktur zur Anordnung der „Schlüsselseitenketten“ ist nicht trivial. Hier sind nur Teilerfolge zu verzeichnen, die zu aktiven und selektiven Liganden führten.⁸⁻¹⁰

Ziel dieser Arbeit ist es, durch Kombination von organischer Synthese und biologischer Evaluierung niedermolekulare, nicht-peptidische Liganden für das $\alpha_4\beta_7$ -Integrin zu entwickeln. α_4 -Integrine sind an einer Reihe pathologischer Vorgänge wie Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungen beteiligt.^{11,12} Aufbauend auf den Ergebnissen von Gottschling *et al.* soll eine weitere Optimierung von $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden unter besonderer Beachtung eines verbesserten pharmakologischen Profils erreicht werden.^{13,14} Es werden unter anderem in rationalen Ansätzen Modifizierungen an der Leitstruktur vorgenommen und neue Bausteine für die Festphasensynthese von Peptidmimetika-Bibliotheken beschrieben. Des Weiteren steht die Suche nach wirkstoffbasierten Gerüststrukturen im Vordergrund. Die biologische Evaluierung von diversen, parallel synthetisierten Bibliotheken sollte die Erkennung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (*SAR*) ermöglichen.

2 Grundlagen der Medizinischen Chemie

2.1 Pharmakologische Relevanz von Peptiden

Biologisch aktive Peptide sind die Produkte von Genen und wechselwirken im überwiegenden Fall - nach ihrer *in vivo* Synthese - durch Translation und Transkription mit Proteinen oder Proteinkonjugaten. Die allgegenwärtige Kontrolle und Modulierung zellulärer Funktionen, die interzelluläre Verständigung, die Immunantwort und Informationsweiterleitung erfolgt über nicht-kovalente Peptid-Protein Wechselwirkungen.^{4,6,7,15,16} Zahlreiche biologisch aktive Peptide wurden in den letzten 30 Jahren entdeckt und charakterisiert.^{8,17,18} Viele von ihnen wurden sowohl in neuronalen als auch in nicht-neuronalen Geweben nachgewiesen. Repräsentative Beispiele dafür sind Somatostatin, Substanz P, Cholecystokinin, Endorphine, Enkephaline, Angiotensin II und Endothelin. Als Neurotransmitter, Neuromodulatoren und Hormone beeinflussen sie nach Bindung an ihre membranständigen Rezeptoren die Zell-Zell-Kommunikation und kontrollieren eine Reihe vitaler Funktionen wie Stoffwechsel, Immunabwehr, Verdauung, Atmung und sind deshalb von enormen Interesse.¹⁰ Die Zahl von nativen und modifizierten Peptiden, die als Medikamente eingesetzt werden, nimmt ständig zu und diese Tendenz dürfte auch in den nächsten Jahren anhalten.^{19,20} Auf Grund großer Fortschritte in der organischen Chemie und der Molekularbiologie konnten die meisten bioaktiven Peptide in größeren Mengen hergestellt und für pharmakologische und klinische Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden.²¹ Dadurch wurden in den letzten Jahren nicht nur neue Möglichkeiten zur Behandlung und Therapie einer Reihe von Erkrankungen etabliert, sondern auch Hoffnungen in Bezug auf die Therapierbarkeit anderer Krankheiten geweckt, bei deren Entwicklung Peptide eine Rolle spielen. Der Einsatz von Peptiden als Medikamente wird jedoch durch folgende Faktoren eingeschränkt: 1) die geringe metabolische Stabilität durch Protolyse im Magen-Darm-Trakt und im Serum, 2) die schlechte Resorption nach oraler Einnahme, vor allem auf Grund der relativ hohen Peptidmolekülmasse und/oder des Fehlens von Transportsystemen, 3) die schlechte oder auch zu schnelle Ausscheidung durch Leber und Nieren und 4) die unerwünschten Nebenwirkungen durch Wechselwirkung mit unterschiedlichen Rezeptoren. In den vergangenen Jahren wurde verstärkt versucht, Peptidmimetika zu entwickeln, die günstigere pharmakologische Eigenschaften haben als ihre Vorbilder.^{10,19,20,22,23} Unter einem Peptidmimetikum versteht man eine Verbindung, die als Ligand eines Rezeptors den biologischen Effekt eines Peptids auf

Rezeptorebene imitieren oder blockieren kann.²⁴ Generell betrachtet wurden zuverlässige Strategien zum Design von Peptidmimetika entwickelt, welche eine sorgfältige Betrachtung von sowohl strukturellen als auch konformativen Merkmalen der Peptide erfordern. Aus pharmakologischer und medizinischer Sicht ist es häufig erwünscht, nicht nur die Wirkung der Peptide auf Rezeptorebene zu imitieren (Agonisten), sondern auch bei Bedarf den Rezeptor zu blockieren (Antagonisten). Da diese beiden Typen von Liganden an unterschiedliche konformative Zustände des Rezeptors binden, ist es wichtig, Entwürfe von Peptidliganden zu betrachten, welche die unterschiedlichen Rezeptorzustände als Zielgruppe haben; Antagonist und Agonist sollten separat betrachtet werden.²⁵

2.2 Modifizierung der Leitstruktur

An die pharmakologischen Eigenschaften eines Peptidmimetikums werden primär einige Erwartungen geknüpft. Ein Hauptproblem bei der Entwicklung solcher Wirkstoffe ist die Entdeckung einer Leitstruktur, die dann beispielsweise unter Verwendung von *Molecular-Modeling*-Programmen optimiert werden kann. Außerordentlich hilfreich sind ebenfalls die Kenntnisse über die dreidimensionale Struktur des Peptid-Rezeptor-Komplexes, welche eine strukturbasierte Wirkstoffentwicklung ermöglichen, und die nachfolgende Signaltransduktion. Bei der Charakterisierung der Rezeptoren und der Erforschung des Mechanismus der Signaltransduktion sind beachtliche Fortschritte erzielt worden. Dagegen bereiten die Strukturuntersuchungen der Peptid-Rezeptor-Komplexe Schwierigkeiten, wobei der Einsatz neuer NMR- und Röntgenstruktur-Techniken hier viel versprechend erscheint.^{26,27} In letzter Zeit spielt die Strukturaufklärung von sehr großen Proteinen über Elektronenmikroskopie auch eine Rolle.²⁸

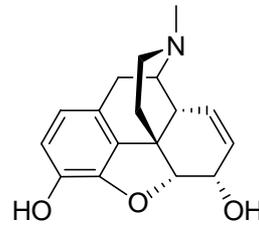
Als Leitstruktur für die Entwicklung von Mimetika dient im Regelfall das native Peptid selbst, dessen pharmakologische Eigenschaften optimiert werden sollen. Eine allgemein anwendbare und bisher erfolgreiche Methode zur Entwicklung von Peptidmimetika besteht darin, konformativ fixierte Analoga herzustellen, die die rezeptorgebundene Peptidkonformation des endogenen Liganden möglichst genau imitieren.²⁰ Die unmittelbare Folge des Einsatzes solcher Konformations-Analoga ist zum einen eine erhöhte Proteaseresistenz, d.h. die metabolische Stabilität erhöht sich, zum anderen eine erhöhte Selektivität und damit geringere Nebenwirkungen.^{29,30} Als günstig für diesen methodischen Zugang erweist sich der Umstand, dass an der Erkennung des Liganden durch den Rezeptor oft nur eine geringe Zahl von etwa vier

bis acht Aminosäureseitenketten des Peptids beteiligt sind.^{26,31} In solchen Fällen dient das restliche Molekül dazu, die pharmakophoren Gruppen zu fixieren.³²⁻³⁵ Darüber hinaus kann in dem Teil des Peptids, der an der Wechselwirkung zwischen dem Liganden und dem Rezeptor direkt beteiligt ist, zusätzliche Bindungsaffinität zu einem anderen Rezeptortypen lokalisiert sein.

Ein wichtiger Schritt bei der Entwicklung von konformativ eingeschränkten Peptidliganden besteht darin, die für die Rezeptorerkennung erforderlichen Aminosäureseitenketten zu identifizieren und anschließend den dreidimensionalen Zusammenhang zwischen den pharmakophoren Gruppen und deren Aktivität zu bestimmen. Dazu wird durch die Synthese verkürzter Analoga die für die biologische Aktivität erforderliche Minimalsequenz und durch systematische Veränderung der einzelnen Aminosäuren die Bedeutung der Parameter wie Stereochemie, Ladung, Hydrophilie usw. ermittelt. Anschließend werden starre Konformationen erzeugt und durch Studien der Konformations-Aktivitäts-Beziehungen die aktivsten Strukturen selektiert.²⁵ Die unbefriedigende Bioverfügbarkeit peptidischer Wirkstoffe kann ihren therapeutischen Einsatz erschweren oder verhindern. Berücksichtigt man zusätzlich, dass die Applikation peptidischer Wirkstoffe immunologische Reaktionen hervorrufen kann, so erscheint die Entwicklung niedermolekularer Nicht-Peptidliganden zwingend notwendig.³⁶ Die Entdeckung von Leitstrukturen in umfangreichen *screenings* ist hierbei essentiell. Dabei werden Substanzsammlungen (*compound libraries*) und einzelne Verbindungen, meist aus dem Naturstoffbereich, auf biologische Aktivität untersucht. Häufig sind diese Substanzen bereits konformativ eingeschränkte Analoga von Peptiden, welche die für die Rezeptorerkennung erforderlichen Merkmale aufweisen. Anschließend wird die Struktur hinsichtlich der Rezeptoraffinität, Selektivität und anderer pharmakologischer Eigenschaften optimiert.

Das klassische Beispiel für Nicht-Peptidliganden sind Opioidalkaloide, die sich als Mimetika endogener Peptide erwiesen haben. So imitiert beispielsweise Morphin (**B**) den Effekt des aus 31 Aminosäuren bestehenden β -Endorphins (**A**)³⁷ an einer für beide Verbindungen gleichen Erkennungsstelle am Rezeptor (Abb. 2.1).³⁸ Insbesondere dieses Beispiel zeigt eindeutig, dass es möglich ist, ein relativ großes Peptid durch eine niedermolekulare Verbindung zu ersetzen.

Tyr-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-
Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Phe-Lys-Asn-Ala-
Ile-Ile-Lys-Asn-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu



A

B

Abbildung 2.1: *Klassisches Beispiel für einen Nicht-Peptidligand. Natürlicher Ligand A und natürliches Peptidmimetikum B.*

2.3 Empirische Regeln für die Entwicklung eines Wirkstoffes

Mit der Etablierung der kombinatorischen Chemie glaubte man zunächst, dass sich die Zahl der Medikamente einfach dadurch erhöhen lässt, dass man eine große Zahl von Verbindungen synthetisiert und biologisch evaluiert. In der Zwischenzeit zeigte sich jedoch, dass die ersten Generationen von kombinatorisch erzeugten Bibliotheken nicht optimal waren, da sie meist große, lipophile und flexible Moleküle enthielten. Aus dieser Erfahrung heraus wird nun bereits bei dem Design von Bibliotheken versucht, Medikament-ähnliche Wirkstoffe zu generieren. Hierzu werden verschiedene Methoden, vom simplen Abzählen von Wasserstoffbrücken-Donatoren bis hin zu komplexen neuronalen Netzwerken, verwendet.³⁹

Damit ein Wirkstoff seinen Wirkungsort erreichen kann, muss er sowohl mit der wässrigen- (z.B. Cytoplasma) als auch mit der lipophilen Umgebung (z.B. Membran) wechselwirken können. Nur Substanzen mit einer mittleren Lipophilie vermögen sowohl durch die wässrige als auch durch die lipophile Phase zu gelangen. Zudem setzen sich viele Bindungsstellen in Proteinen aus polaren und unpolaren Bereichen zusammen. Viele quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen zeigen daher einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Lipophilie einer Verbindung und deren biologischer Wirkung. Die Lipophilie beeinflusst auch die metabolische Aktivität und die Bindung an Plasmaproteine.⁴⁰ Zur Beschreibung der Lipophilie hat sich der Verteilungskoeffizient P (*partition coefficient*) zwischen Octan-1-ol und Wasser als sehr geeignet erwiesen.⁴¹

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

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

Durch die Analyse von ca. 2200 oral bioverfügbaren Wirkstoffen konnten Lipinski *et al.* von der Firma Pfizer Inc. einige allgemeine Eigenschaften oral bioverfügbarer Substanzen ableiten.^{42,43} Diese als „Pfizer's rule of five“ bekannt gewordenen Eigenschaften trafen auf 90% der untersuchten Arzneimittel zu:

- $\text{LogP} < 5$
- Molekulargewicht < 500 g/mol
- Anzahl der Wasserstoff-Donatoren < 5
- Anzahl der Wasserstoff-Akzeptoren < 10
- Eine der vier genannten Regeln kann verletzt sein.

Trotz der Verletzung der *rule of five* waren jedoch viele Antibiotika, Fungizide, Vitamine und herzwirksame Glycoside oral verfügbar. Ein sehr bekanntes Beispiel ist das Immunsuppressivum *Cyclosporin*, welches gegen jede dieser Regeln verstößt aber gut oral verfügbar ist. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist, dass diese Moleküle Substrate für Transportsysteme darstellen.⁴⁴ Die *rule of five* ist nicht verbindlich, sondern gibt nur eine Orientierungshilfe.^{45,46} Ferner stellten Rishton *et al.* eine Liste mit nahezu 25 funktionellen Gruppen zusammen, die auf Grund von Solvolyse und Reaktivität mit Nucleophilen ungeeignet für die Verwendung in Wirkstoffen sind.⁴⁷ Weitere Methoden, um wirkstoffbasierte Verbindungen zu finden, sind unter anderem die Analyse des chemischen Pools⁴⁸, die Analyse der Bausteine von bekannten Medikamenten^{49,50} und die Minimierung von sowohl flexiblen Bindungen als auch polaren Oberflächen.⁵¹ Die sogenannten „Veber-Regeln“ postulieren eine bevorzugte orale Bioverfügbarkeit von Molekülen, die weniger als zehn freie rotierbare Bindungen enthalten und deren polare Oberfläche kleiner als 140 \AA^2 ist, was etwa zwölf oder weniger Wasserstoff-Donatoren und -Akzeptoren entspricht. Außerdem ist man ständig bestrebt, die Regeln und Vorgehensweisen zu einer möglichst effizienten Arzneimittelentwicklung zu optimieren. Ein neuer Ansatz ist beispielsweise das Generieren von Verbindungen geringerer Molekülgröße (bis zu 300 g/mol), die als Fragmente zum Aufbau von Leitstrukturen dienen sollen. Sie weisen geringe Lipophilie ($\text{logP} < 3$), bis zu drei rotierbare Bindungen und eine höhere Bindungseffizienz (höhere durchschnittliche Bindungsenergie der Verbindungen pro

Atom) auf. Dies führt zu einer „*rule of three*“ und impliziert den Aufbau von so genannten fragmentbasierten Bibliotheken.⁵²

Anhand dieser Regeln lassen sich jedoch kaum Aussagen über die metabolische Stabilität der Verbindungen ableiten. Normalerweise werden fremde, in den Körper eindringende Moleküle vom Immunsystem durch Antikörperbildung bekämpft. Kleine Moleküle lösen jedoch keine Immunreaktion aus. Sie werden durch unspezifische Enzyme in polare Verbindungen umgewandelt und können so anschließend ausgeschieden werden (Metabolismus). Da der Körper nicht zwischen Umweltgiften, natürlichen Stoffen und Medikamenten unterscheiden kann, werden auch Wirkstoffe durch enzymatische Biotransformation metabolisiert. Die Faktoren, welche das pharmakologische Profil eines Wirkstoffes 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/oder Darm (Eliminierung). Häufig werden sie durch **T** - die Toxizität – ergänzt.⁵³

2.4 Festphasensynthese

Eine Vielfalt von Technologien wurde zur Bildung kombinatorischer Bibliotheken angewendet, welche sich über biologische Methoden wie *phage display*⁵⁴, bei der Zufallspeptidsequenzen auf der Oberfläche von Hüllenproteinen von Bakteriophagen exprimiert werden, bis hin zu konventionellen Methoden wie der organischen Synthese in Lösung oder an der festen Phase erstrecken. Die Festphasensynthese wurde ursprünglich als Methode zur Herstellung einer großen Datenbank an Peptiden zum *screening* von Rezeptor- oder Antikörperwechselwirkungen⁵⁵ oder zur Synthese von Nucleotiden⁵⁶ entwickelt, anschließend wurde sie auf die Anforderung der medizinischen Chemie abgestimmt⁵⁷. Die Geburtsstunde der kombinatorischen Chemie basiert auf den bahnbrechenden Arbeiten von R. A. Houghten⁵⁸, K. Lam⁵⁹ und A. Furka⁶⁰, die jeweils eine kombinatorische Peptid-Bibliothek zur Erkennung von Leitstrukturen benutzten. Sowohl die gewachsene Nachfrage nach kostengünstigeren Methoden in der Medikamentenentwicklung als auch Fortschritte im automatisierten *screening*⁶¹, welche die Möglichkeit eröffnete, tausende von Verbindungen in kurzer Zeit zu testen, veranlasste die pharmazeutische Industrie kombinatorische Synthesestrategien einzuführen. Während sich bei Peptiden und Oligonucleotiden die Festphasensynthese als wichtigste Methode etabliert hat, wurde sie bei anderen Verbindungsklassen erst im letzten Jahrzehnt populär.⁶²⁻⁶⁶

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

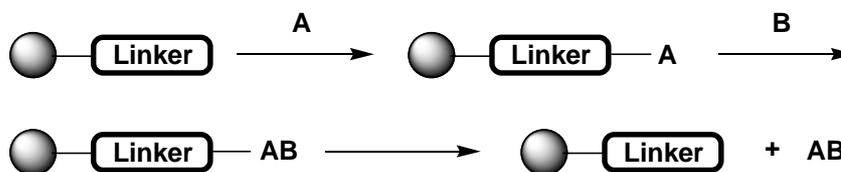


Abbildung 2.2: Allgemeines Prinzip der Festphasensynthese

Der *linker* muss gegenüber den verwendeten Reaktionsbedingungen stabil sein. Ebenfalls muss aber das Produkt **AB** ohne Zersetzung wieder vom *linker* abgespalten werden können. Heutzutage gibt es viele verschiedene *linker* und polymere Träger, so dass für nahezu jede Reaktionsfolge ein geeignetes System kommerziell erhältlich ist.⁶⁷ Die Vorteile der Festphasensynthese sind unter anderem 1) einfache Automatisierbarkeit, 2) Beschleunigung der Reaktion und hohe Umsätze durch Verwendung von Überschüssen an Reagenzien, 3) aufwändige Reinigungs- und Aufarbeitungsschritte entfallen, da nur das Harz gewaschen werden muss und 4) einfache Handhabung kleiner Mengen. Ein Nachteil der Festphasensynthese ist unter anderem die begrenzte strukturelle Diversität, da es einige Einschränkungen bei den chemischen Reaktionen gibt. Zur Analyse von Bibliotheken und Festphasenreaktionen ist die Massenspektrometrie die Methode der Wahl.

Insbesondere der Festphasensynthese komplexer, von Naturstoffen abgeleiteter Moleküle, wurde mit der Herstellung von Substanzbibliotheken besondere Aufmerksamkeit geschenkt. So gelangen an festen Trägern Synthesen von *Deglycobleomycin* A_5 ^{68,69}, *Penticinnamin* E ⁷⁰, sowie (-)-*Saframycin*.⁷¹

3 Integrine als *targets* in der Medizinischen Chemie

3.1 Funktion der Integrine

Der Begriff „Integrin“ wurde zum ersten Mal 1987 in einem Übersichtsartikel verwendet, der eine Gruppe strukturell, immunologisch und funktionell verwandter Zelloberflächen-Rezeptoren beschreibt.⁷² Diese sind als integrale Membranproteine bei der Wechselwirkung der extrazellulären Matrix mit dem intrazellulären Zytoskelett beteiligt. Die Bildung, Umgestaltung und Erhaltung des Gewebes und der Organe wird durch dynamische Verbindungen zwischen den Zellen und ihrer Umgebung ermöglicht, über die komplexe chemische und physikalische Reize übertragen werden. Auf der einen Seite der Zellmembran erkennen Integrine sowohl strukturell unterschiedliche Komponenten der extrazellulären Matrix als auch angrenzende Zellen und Plasmaproteine, während sie auf der anderen Seite der Zellmembran über ihre kurze zytoplasmatische Domäne direkt mit dem Zytoskelett in Verbindung stehen. Dieses Zusammenspiel kann auch als treibende Kraft der Zelle bezeichnet werden⁷³. Die Bindung der Integrine an extrazelluläre Liganden wird in eine Bildung und Umgestaltung von fokaler Adhäsion umgesetzt, welche für eine Veränderung der Zellform und der Gewebeorganisation verantwortlich ist.⁷⁴ Signale aus dem Zellinneren werden an die Integrin-Ectodomäne weitergeleitet, welche die Bindungsaffinität verändert. Ein feinfühliges Gleichgewicht zwischen einer *inside-out* und *outside-in* Signaltransduktion über Integrine ermöglicht eine kontrollierte Zellbewegung oder Adhäsion. Vom therapeutischen Standpunkt betrachtet sind Integrine vermutlich die wichtigste Klasse der Zell-Adhäsions-Rezeptoren, zu denen ebenfalls die Immunglobulin-Superfamilie⁷⁵, Selektine^{76,77} und Cadherine^{78,79} zählen. Allgemein gehören diese Proteine zu der vielseitigen Rezeptorfamilie der CAMs (*cell adhesion molecule*) und repräsentieren wichtige Bindeglieder zur Verankerung von Zellen. Da Integrine Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen regulieren, spielen sie eine bedeutende Rolle in einem großen Bereich von biologischen Prozessen wie Entwicklung⁸⁰, Wundheilung⁸¹, Angiogenese^{82,83}, Immunantwort⁸⁴ und Hämostase⁸⁵. Umgekehrt ist eine Fehlfunktion der Integrine für eine Vielzahl an Erkrankungen wie zum Beispiel Autoimmunkrankheiten, Thrombose und Tumorwachstum verantwortlich.⁸² Aus diesem Grund wurden umfangreiche Bemühungen in Richtung der Entdeckung und Entwicklung von Integrinliganden zur klinischen Anwendung unternommen. Deutliche Fortschritte wurden bei der Behandlung von Thrombose erzielt, bei der die Thrombus-Bildung durch die

Hemmung der Bindung des $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Integrins an Fibrinogen unterdrückt werden kann.⁸⁶ Sowohl α_4 - als auch β_2 -Integrine, die vorwiegend auf Leukozyten zu finden sind, können für eine Reihe von Autoimmunkrankheiten und chronische Entzündungen verantwortlich gemacht werden^{11,87}, während $\alpha_V\beta_3$ - und $\alpha_V\beta_5$ -Integrin eine bedeutende Rolle bei Tumorwachstum, Angiogenese und Knochenbildung zugeschrieben werden kann.^{82,88}

3.2 Struktur der Integrine

Integrine sind heterodimere, transmembrane Glycoproteine. Die Anzahl der β -Untereinheiten wurde im Laufe der Zeit von ursprünglich drei (β_1 , β_2 und β_3) auf acht erweitert, während mittlerweile 18 verschiedene α -Untereinheiten unterschieden werden. Diese Untereinheiten können in einer eingeschränkten Weise nichtkovalent zu 24 verschiedenen Integrinen kombiniert werden, welche sich hinsichtlich ihrer physiologischen Funktion und ihrer Liganden unterscheiden. Die Integringruppe kann in drei Familien eingeteilt werden: 1) *very late activation* (VLA-4) β_1 -, 2) β_2 -Leukozyten- und 3) β_3 -Adhäsionsintegrine (Abb. 3.1). Ungefähr die Hälfte der α -integrinuntereinheiten enthält eine zusätzliche von *Willebrand-Faktor-A-Type* Domäne, die auch als α_A - oder I-Domäne bekannt ist. Jedem der 24 Integrine kann eine spezifische Funktion zugeordnet werden, was durch die Vielfältigkeit der Liganden, aber besonders durch die Phänotypen von *knockout* Mäusen verdeutlicht wird.⁸⁹ Die Vielfalt der Integrine wird darüber hinaus durch alternatives *splicing*, post-translationalen Veränderungen und Wechselwirkung mit anderen Oberflächen- oder intrazellulären Proteinen erhöht.^{90,91}

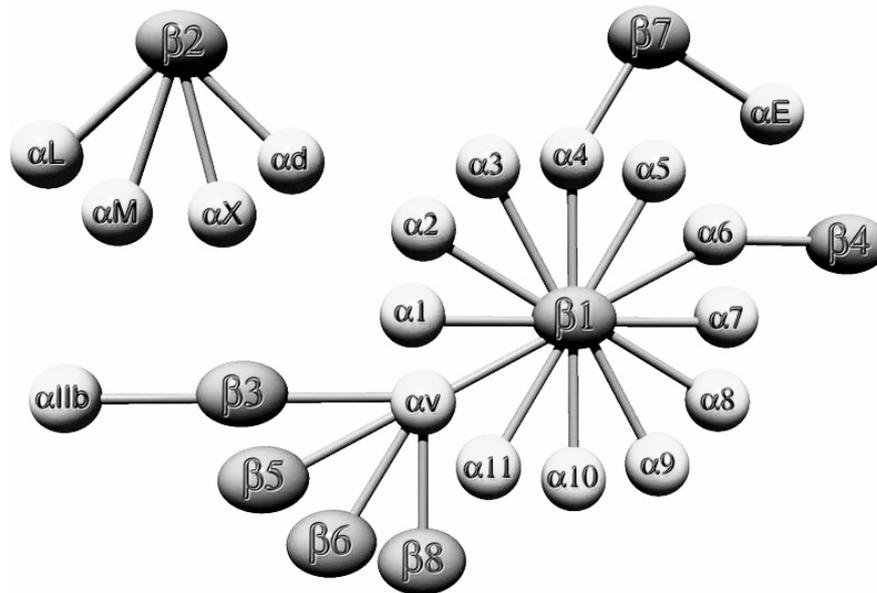


Abbildung 3.1: Mitglieder der einzelnen Integrin-Subfamilien. Jedes Integrin besteht aus einer α - und β -Untereinheit.

Die extrazelluläre Domäne der Integrine stellt den größten Teil des Proteins dar. Sie besteht aus einer Kopf-Region, aus der eine gestreckte Stelzen-Region hervorgeht. Über eine sich jeweils anschließende kurze Transmembranhelix und die zytoplasmatische Domäne ist das Integrin mit den Proteinen des Zytosols verknüpft (Abb. 3.2). Die größere α -Untereinheit enthält ca. 1100 Aminosäuren und ist häufig aus zwei unterschiedlich langen Aminosäureketten aufgebaut, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Der extrazelluläre Teil der α -Untereinheit ist durch drei bis vier Bereiche von jeweils 12 bis 15 Aminosäuren am *N*-Terminus gekennzeichnet, die zweiwertige Kationen binden.⁹² Die zytoplasmatische Region ist sehr kurz (ca. 20-50 Aminosäuren) und weist bis auf die konservierte Heptapeptid-Sequenz KXGFFKR kaum Homologien auf. Sie interagiert mit der in der β -Untereinheit konservierten Sequenz LLVXIHDR.⁹³ Die Affinität des zytoplasmatischen Restes von $\alpha_{11b}\beta_3$ für divalente Kationen liegt im mikromolaren Bereich und die Komplexbildung der beiden Untereinheiten des zytoplasmatischen Restes wird von einer Stabilisierung der Sekundärstruktur begleitet.⁹⁴ Mit Ausnahme der β_4 -Einheit besteht die β -Untereinheit aus nicht ganz 800 Aminosäuren und enthält vier hochkonservierte, cysteinreiche Domänen nahe der transmembranen Region. Beide Untereinheiten haben eine kurze membranständige Region und eine zytoplasmatische Domäne. An der Bindung extrazellulärer Liganden sind beide Untereinheiten beteiligt. Die Kontaktstellen befinden sich in den Domänen nahe der

N-Termini.⁹⁵⁻⁹⁷ Mit Ausnahme von β_4 , deren zytoplasmatische Domäne aus ca. 1000 Aminosäureresten besteht und mit intermediären Filamenten der Zelle verbunden ist, besitzen alle β -Untereinheiten eine zytoplasmatische Region, die aus 15 bis 65 Aminosäuren besteht und mit dem Zytoskelett über Talin⁹⁸ und α -Actin^{99,100} und verankert ist. Neben ihrer Fähigkeit, Adhäsion zwischen extrazellulären Matrixliganden und passenden Rezeptoren auf benachbarten Zellen zu ermöglichen, dienen Integrine somit als mechanische transmembrane Verbindungen zum Zytoskelett innerhalb der Zelle. Der zytoplasmatische Rest der Integrine ist an der Initiierung und Weiterleitung der konformationellen Veränderung bei der Ligandenbindung beteiligt, und trägt somit entscheidend zur *outside-in* Signalübertragung bei. Bei dieser Signalübertragung spielen unter anderem zahlreiche interzelluläre Veränderungen und die Aktivierung von Kinasen und Phosphatasen eine entscheidende Rolle.¹⁰¹⁻¹⁰³

Als Durchbruch auf dem Weg zu einem besseren Verständnis der molekularen Grundlagen der Integrinfunktion muss sowohl die Kristallstrukturaufklärung der extrazellulären Domäne des $\alpha_V\beta_3$ -Integrins (Abb. 3.2) durch Xiong *et al.*^{96,104} als auch des $\alpha_{11b}\beta_3$ -Integrins⁹⁷ gesehen werden. In Übereinstimmung mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen hat das Integrin-Heterodimer eine quallenförmige Erscheinung mit einer ovalen Kopf- und zwei Stelzen-Regionen (*stalk-Region*).¹⁰⁵ Biochemische und EM-Studien konnten zeigen, dass die Kopfreion für die Ligandenbindung verantwortlich ist.¹⁰⁶ Der vorher nicht beobachtete Knick in den Stelzenregionen könnte ein Element der integrinvermittelten Signaltransduktion darstellen, wenn es sich hierbei nicht um einen Kristallisationsartefakt handeln sollte. In αA -enthaltenden Integrinen wird die Ligandenbindung durch die αA -Domäne, auch I-Domäne genannt, vermittelt.^{107,108} Diese Domäne gehört zu dem Dinucleotid bindendem *Rossmann-Fold*, einem von acht Helices umgebenen sechssträngigen Faltblatt, welches für tertiäre Strukturveränderungen in anderen Proteinen bekannt ist.^{109,110} Auf der Spitze findet man ein einfach gebundenes zweiwertiges Kation, welches von Sauerstoff enthaltenden Seitengruppen aus drei Schleifen koordiniert wird. Insgesamt bezeichnet man diese Seitengruppen als „MIDAS“-Region (*metal-ion-dependent adhesion side*). Bei Integrinen, welche diese αA -Domäne nicht aufweisen, wird die Ligandenbindung durch einen so genannten siebenblättrigen β -Propeller vermittelt, an den sich eine aus drei linear angeordneten β -Faltblättern bestehende Stelzen-Region anschließt. Darüber hinaus beteiligt sich noch eine αA -ähnliche Domäne (βA) der β -Untereinheit. Die meisten Untersuchungen deuten darauf hin, dass die βA -Domäne den Liganden über ein vermeintliches

MIDAS-ähnliches Motiv bindet.¹¹¹⁻¹¹³ An die β I-Domäne grenzt eine Immunglobulin(Ig)-ähnliche „Hybrid-Domäne“ an. Die Stelzen-Region der β -Untereinheit besteht aus sechs Domänen; bei vier davon handelt es sich um cysteinreiche EGF (*epidermal growth factor*)-artige Domänen.

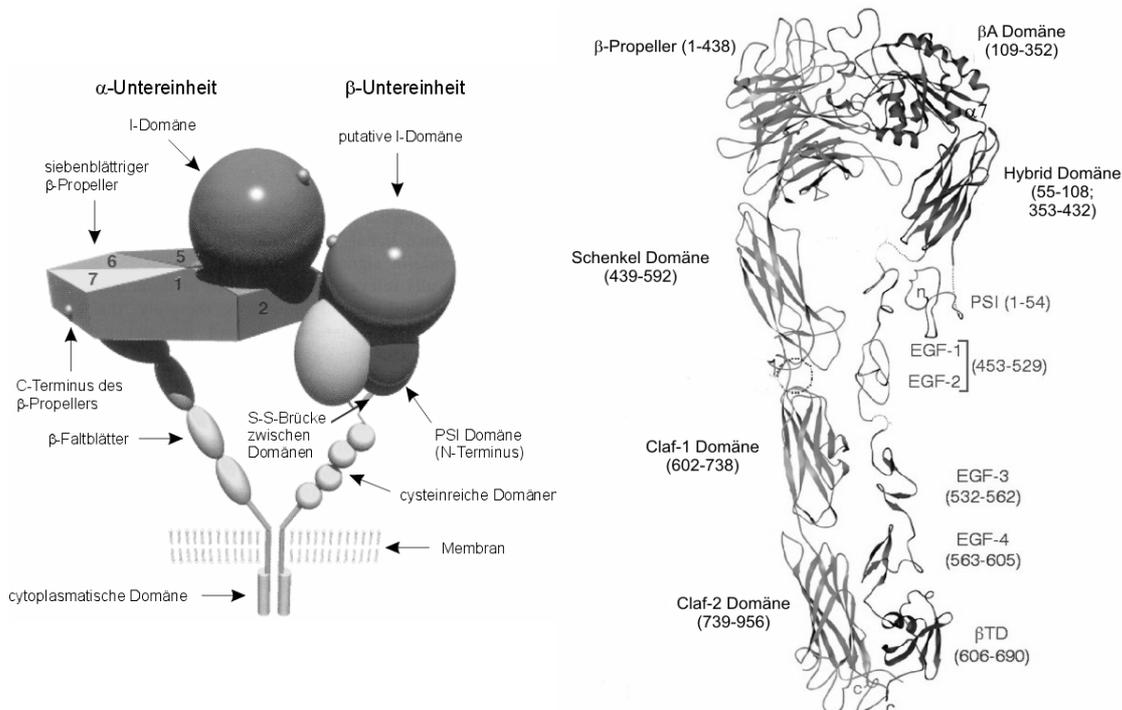


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Integrine nach Bella und Berman (links)¹¹⁴ und Röntgenkristallstruktur des extrazellulären Teils des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin nach Xiong et al. (rechts)⁹⁶.

Die Kopfgruppen der α - und β -Untereinheiten werden durch Kation- π -Kontakt zusammengehalten.⁹⁵ Der (β_3)-Arg²⁶¹ Rest, der Teil der α/β -Kontaktfläche ist, schiebt sich in den β -Propeller der α_v -Untereinheit ein, wobei die Guanidinium-Seitenkette von aromatischen Resten des β -Propellers umschlossen wird. Eine kleine Veränderung in der Position des (β_3)-Arg²⁶¹-Rests durch Ligandenbindung verursacht eine Umordnung und Störung der Kation- π -Wechselwirkung, welche zur Dissoziation der Kopfgruppen führt.

Sowohl die α - als auch die β -Untereinheit weisen ein *N*-Glycosilierungsmuster auf. Durch Veränderung der Glycosilierung wird die integrinvermittelte Adhäsion bis hin zum Verlust der Adhäsionsfähigkeit variiert.

3.3 Integrinliganden

Der bestimmende Faktor bei der Bindung der Liganden an Integrine ist die Anwesenheit von verschiedenen Erkennungssequenzen. Integrine binden viele ihrer Liganden in einer divalenten Weise über ionische Wechselwirkungen. Diese beinhalten eine große Anzahl der extrazellulären Matrixproteine (z.B. verschiedene Kollagene, Fibronectin, Vitronectin, Laminin, von Willebrand Faktor und Thrombospondin), passende Rezeptoren (z.B. VCAM-1, ICAMs und generell Mitglieder der Immunglobulinfamilie) und Plasmaproteine. Zahlreiche Krankheitserreger und Schlangengifte adressieren oder hemmen Integrinrezeptoren, um Infektionen einzuleiten bzw. Zell-Matrix-Kontakte zu lösen.^{115,116} Trotz der großen Vielfalt der Integrinliganden haben sie einen hervorstechenden Aspartat- oder Glutamatrest gemeinsam, der für die Erkennung entscheidend ist und üblicherweise innerhalb einer erweiterten Schleife gefunden wird.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Der Säurerest kommt in eingegrenzten Erkennungssequenzen vor und kann in einfacher oder mehrfacher Weise innerhalb des Liganden vorgefunden werden. Auf Asparaginsäure basierende Erkennungssequenzen (z.B. RGD, LDV, KGD, RTD) binden an die Mehrzahl der Integrine.^{110,120}

Der Aspartat- oder Glutamatrest bildet einen dreifachen Komplex mit dem rezeptorgebundenen, divalenten Kation.^{95,96,109} Die molekulare Grundlage dieser Tatsache lässt sich anhand der Kristallstruktur der Cokristallation des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins mit dem zyklischen Pentapeptid cyclo(RGD-f(NMe)V) erklären. Die Struktur zeigt, dass der Ligand das Heterodimer über den Aspartatrest, welcher an ein Kation in der MIDAS-Domäne der β -Untereinheit bindet, und den Guanidinrest von Arginin, welcher mit zwei Asparaginsäuren innerhalb des β -Propellers der α -Untereinheit wechselwirkt, verbindet. Die so gewonnenen Erkenntnisse über die Struktur ermöglichen in Zukunft nun auch ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign.¹²¹ Während Mg^{2+} und Mn^{2+} die Bindung des Liganden in einem großem Konzentrationsbereich unterstützen, wurde dies von Ca^{2+} nur im mikromolaren Bereich beobachtet.^{122,123} Man nimmt an, dass Ca^{2+} in millimolaren Konzentrationen an eine allosterische Ca^{2+} -spezifische Bindungsstelle in der β -Untereinheit bindet und den Liganden zur Dissoziation bewegt. Regulation der Integrine durch Kationen scheint auch bei Umformung des Gewebes¹²⁴, wie zum Beispiel beim Knochenstoffwechsel,¹²⁵ eine gewisse Rolle zu spielen.

3.4 Integrinaktivierung und Signaltransduktion

Viele der Integrine sind nicht ständig im aktiven Zustand und werden häufig auf der Zelloberfläche im inaktiven Zustand, in dem sie keine Liganden binden oder nicht zur Signaltransduktion befähigt sind, vorgefunden. Das wichtigste Blutplättchen-Integrin, $\alpha_{IIb}\beta_3$, ist in großer Dichte auf zirkulierenden Plättchen vorhanden und überwiegend im inaktiven Zustand. Anderenfalls würden Blutplättchen an im Plasma vorhandenes Fibrinogen binden und zu einer Thrombose führen. Bei einer Aktivierung der Blutplättchen wird das $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin vom Inneren der Zelle aktiviert, so dass es an Fibrinogen binden kann. Dies verursacht ein Anhaften der Blutplättchen an die Zellwand und über die Bindung von Fibrinogen eine Aggregation mit anderen Thrombozyten.¹²⁶ Lymphozyten sind ein weiteres Beispiel für die Bedeutung der Integrine in ihrem inaktiven Zustand und ihre regulierte Aktivierung. Mitglieder der β_2 -Integrinfamilie kommen auf den meisten weißen Blutkörperchen vor, welche jedoch im ruhenden Zustand inaktiv sind. Wenn die Zellen durch Zytokine aktiviert werden, führt dies ebenfalls zu einer Aktivierung der Integrine, welche nun an ihre Liganden binden können und dadurch ein Anhaften der Leukozyten an die Gefäßwand oder andere Zellen ermöglichen.¹²⁷ Vergleichbar mit den β_2 -Integrinen erhofft man sich auch durch eine Inhibierung der α_4 -Integrine, welche ähnliche Funktionen bei Lymphozyten vermitteln, eine Therapie von Entzündungs- und Autoimmunkrankheiten.^{12,128,129} Niedrig-affine Wechselwirkungen werden zum Teil von zusammengelagerten Integrinen vermittelt und sind wahrscheinlich für das *tethering* und *rolling* von Zellen verantwortlich.^{130,131} Diese Wechselwirkungen werden sowohl von multivalenten Liganden als auch dem Zytoskelett¹³² verstärkt. Der hoch-affine Aktivitätszustand erfordert ein strukturelles Umschalten des Rezeptors vom niedrig-affinen Zustand. Die Aktivierung wird gewöhnlich durch eine *inside-out* Signaltransduktion verursacht, die vermutlich auf eine Veränderung der Orientierung der beiden Integrinuntereinheiten zurückzuführen ist. Modellrechnungen von Gottschalk *et al.* legen nahe, dass der Übergang zwischen niedrig-affinem und ligandenbindendem Zustand auf einer Verdrehung der α - und β -Untereinheit beruht. Im Falle der Bindung eines Liganden bewirkt die scherenartige Bewegung der beiden Untereinheiten eine Trennung der Kopfgruppen.^{121,133} Parallel wird angesichts der geknickten Form der Kristallstruktur ein „Klappmesser-Modell“ als Ursache für die Signaltransduktion angenommen.¹³⁴ Die für die Ligandenaffinität verantwortliche Orientierung der Untereinheiten wird durch den Kontakt mit Proteinen des Zytoskeletts determiniert.¹³⁵ Die Bedeutung der transmembranen und zytoplasmatischen Regionen an der Integrinaktivierung kann auch durch deren

Truncierung bewiesen werden.^{136,137} Generell findet bei dem Aktivierungsprozess eine extrazelluläre Umstrukturierung statt.^{138,139}

3.5 α_4 -Integrin-Rezeptoren

$\alpha_4\beta_1$ -, $\alpha_4\beta_7$ -, $\alpha E\beta_7$ -Integrine und die so genannten Leukozyten-Integrine ($\alpha L\beta_2$ -, $\alpha M\beta_2$ -, $\alpha D\beta_2$ - und $\alpha X\beta_2$ -) sind an Zell-Zell-Wechselwirkungen beteiligt und werden vor allem auf den Zellen des Immunsystems angetroffen. Wechselwirkungen der Zell-Adhäsions-Moleküle (CAMs) mit ihren Rezeptoren spielen bei vielen Immun- und Infektionskrankheiten eine große Rolle. Sowohl $\alpha_4\beta_1$ -Integrine, die auch als *very late antigen* (VLA-4) bezeichnet werden, als auch $\alpha L\beta_2$ -Integrine, die auch unter dem Namen *leukocyte function-associated antigen* (LFA-1) bekannt sind, gehören zu der Gruppe der CAMs und vermitteln vorwiegend Leukozytenwanderung und Extravasation.¹¹ Da Lymphozyten an der Immunantwort beteiligt sind, werden sie zu den Entzündungs- oder Infektionsorten rekrutiert. Normalerweise zirkulieren sie im Blut in nur geringer Konzentration und extravasieren durch das Endothel zur extravaskulären Seite. Zu Beginn einer Entzündung stimuliert die lokale Ausschüttung von Entzündungsstoffen wie Cytokine, Interleukin-1 und Chemokine von aktivierten T-Zellen und resistenten Monozyten benachbarte Endothelzellen zur Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie zum Beispiel V-CAM-1 und MAdCAM-1 auf ihrer vaskulären Oberfläche.¹⁴⁰ Vermittelt über Selektine und ihre Kohlenhydratliganden haften wandernde Lymphozyten mehr und mehr bis sie schließlich über eine starke Bindung an Integrine festgehalten werden. Die Wechselwirkung mit Integrinen und Chemokinen tragen zu dem Ergebnis sowohl der Integrinzusammenlagerung als auch der Umgestaltung des Zytoskeletts bei, welche schließlich über feste intrazelluläre Verbindungen zur Einwanderung in das Zielgewebe führen.^{141,142}

Zirkulierende Lymphozyten dirigieren gewöhnlich die Immunüberwachung durch einen lockeren *tether and roll* Mechanismus auf dem Endothelgewebe. Der erste Kontakt (*tethering*) zwischen Leukozyten und den Endothelzellen wird vor allem durch E-, L-, und P-Selektine, in einigen Fällen aber auch durch Integrine (z.B. $\alpha_4\beta_7$ -Integrin/MAdCAM-1) vermittelt. Auftretende stimulierende Signale kehren das *rolling* Verhalten zu einer starken Zellhaftung um. Neue Studien zeigen, dass auf Oberflächen gebundene Chemokine die Aktivität der Integrine durch einen einleitenden Kontakt mit ihren Liganden modulieren können.¹³⁰ Die Wechselwirkung mit Chemokinen veranlassen die Lymphozyten zur Anhäufung ihrer VLA-4 Integrine entlang der

Kontaktoberfläche, was schlagartig die effektive Konzentration der VLA-4/VCAM-1-Wechselwirkung erhöht. Obwohl die Einzelheiten der Signaltransduktion relativ unbekannt sind, kann die Affinität von VLA-4 über interzelluläre Bahnen moduliert werden, welche auf eine Wechselwirkung der Chemokine mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Leukozyten zurückzuführen ist. Man spricht unter diesen Annahmen von einer *inside-out* Signalübertragung.¹⁴³ Die *inside-out* Signalübertragung über Botenstoffe (*second messenger*) wird auch von den β_2 -Integrinen genutzt, welche sich einiger Phosphokinasen bedienen.^{144,145} Frühere Untersuchungen belegen, dass nur Integrine im hoch-affinen Zustand an der festen Adhäsion beteiligt sein können.¹⁴⁶ Integrine und Chemokine sind bei der anschließenden Migration in das Gewebe beteiligt. Mit Hilfe von Chemokinen wandern die Leukozyten schließlich durch das Gewebe (Abb. 3.3). Darüber hinaus sind unter anderem MMPs (*matrix metalloproteasen*) und Urokinase an der Auflösung des Gewebes beteiligt.

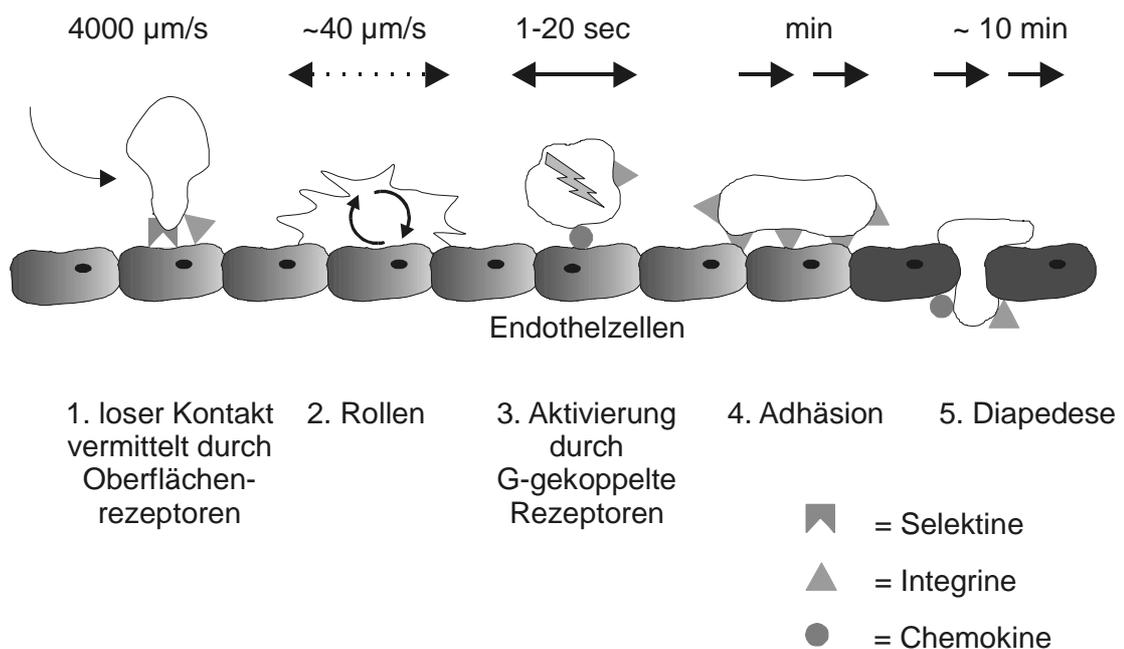


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der schrittweisen Extravasation von Leukozyten.¹¹

Im Immunsystem ist die Extravasation ein wichtiger Prozeß. Die Spezifität hängt dabei von der Art der vaskulären Phänotypen, der Regulation der Rezeptoren und dem *homing* der Leukozyten ab. Als *homing* bezeichnet man den Vorgang, bei dem Leukozyten ihren Bestimmungsort in einem spezifischen Gewebe erreichen. Im Gegensatz zu den Selektinen können α_4 -Integrine sowohl am *tethering* als auch an der Adhäsion der Leukozyten an das Endothel beteiligt sein.¹¹

Obwohl die α_4 -Integrine an verschiedene Proteine binden, geht man davon aus, dass die für Autoimmunkrankheiten wesentliche Ursache in der Wechselwirkung mit VCAM-1 und MAdCAM-1 liegt. Die stark unterschiedlichen Expressionsprofile dieser Proteine in entzündetem Gewebe sprechen für diese Interpretationen. So wird erhöhte MAdCAM-1 Expression im gastrointestinalen Trakt mit der Crohn- Krankheit, *colitis ulcerosa* und Hepatitis C sowie erhöhte VCAM-1 Expression mit Asthma, Multipler Sklerose oder Rheuma in Verbindung gebracht.^{12,147}

Die α_4 -Integrinuntereinheit wird an der Zelloberfläche als Protein mit einem Molekulargewicht von 155 kDa eingebaut. Durch Aktivierung der T-Lymphocyten kann diese Integrinuntereinheit zwischen Arg⁵⁵⁸ und Ser⁵⁵⁹ gespalten werden, was zur Bildung von Fragmenten mit 70 und 80 kDa führt.¹⁴⁸ Die Adhäsion an VCAM-1 oder Fibronectin wird durch diese Spaltung nicht beeinflusst.

Das Integrin VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$, *very late activating antigen-4*) wird auf Lymphocyten und anderen Leukozyten eingebaut. Die Familie der β_1 -Integrine wird deshalb als *very late antigens* bezeichnet, da sie erst nach Verzögerung in aktivierten T-Zellen exprimiert werden. VLA-4 kommt auf den meisten Lymphocyten vor, zu denen man die Monozyten, eosinophilen- und basophilen Granulozyten zählen kann. Allerdings exprimieren neutrophile Granulozyten keine $\alpha_4\beta_1$ -Integrine.^{11,149} Sie vermitteln das *homing* und die Verankerung von unreifen Blutzellen an *bone marrow stromal cells* und ihre extrazelluläre Matrix.¹⁵⁰ Das Matrixprotein Fibronectin^{151,152} und das *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1)^{153,154} stellen u.a. die natürlichen Liganden für $\alpha_4\beta_1$ -Integrine dar. Allen Bindungssequenzen ist gemeinsam, dass der negativ geladene Asparaginsäurerest *N-terminal* von einer hydrophoben Aminosäure flankiert wird. Allgemein lässt sich das Erkennungsmotiv der $\alpha_4\beta_1$ -Integrine auf die Sequenz (I/L)-D-(S/V) reduzieren. Auch $\alpha_4\beta_1$ -Integrine verschiedener Zellen können miteinander wechselwirken.¹⁵⁵ Über die $\alpha_4\beta_1$ - $\alpha_4\beta_1$ -Integrinwechselwirkung ist noch wenig bekannt. Der Ersatz von Arg⁸⁹ und Asp⁹⁰ in der α_4 -Untereinheit unterbindet zwar die $\alpha_4\beta_1$ - $\alpha_4\beta_1$ - nicht aber die $\alpha_4\beta_1$ -VCAM-1-Wechselwirkung.¹⁵⁶ Kürzlich wurde beschrieben, dass α_4 -Integrine ebenfalls das *N-terminale* Fragment, jedoch nicht das vollständige Protein Osteopontin binden, welches nach enzymatischer Spaltung durch Thrombin entsteht. Dies könnte von Bedeutung sein, da sowohl Osteopontin als auch Thrombin in entzündetem Gewebe nachgewiesen werden konnte.¹⁵⁷

Wie die meisten Integrine existiert auch $\alpha_4\beta_1$ in einem niedrig-affinen und hoch-affinen Aktivitätszustand. Man nimmt an, dass der anfängliche Kontakt mit VCAM-1 über eine niedrig-affine, multivalente Wechselwirkung stattfindet^{158,159} und die

Aktivierung der Lymphozyten eine Konformationsänderung des Integrins hervorruft, welche nun die Adhäsion über eine hoch-affine Wechselwirkung ermöglicht. Die Aktivierung der VLA-4-Integrine kann unter anderem durch Antigene, Anti-T-Zell-Antikörper, spezifische β_1 -Antikörper und das zweiwertige Kation Mn^{2+} eingeleitet werden.^{160,161}

$\alpha_4\beta_7$ -Integrine werden häufig als LPAM-1 bezeichnet (*lymphocyte Peyer's patch specific adhesion molecule*), da sie das *homing* $\alpha_4\beta_7$ -Integrin-exprimierender Leukozyten an *mucosa*-assoziiertes lymphatisches Gewebe steuern. In adulten Menschen werden sie unterschiedlich stark auf T- und B-Zellen exprimiert.¹⁶² β_7 -*knockout* Mäuse zeigen, dass β_7 -Integrine für den Erhalt und Bildung des *mucosa*-assoziierten lymphatischen Gewebes essentiell sind.¹⁶³ $\alpha_4\beta_7$ -Integrine binden spezifisch und mit hoher Selektivität an MAdCAM-1.

3.6 Liganden der α_4 -Integrine

α_4 -Integrine binden an Fibronectin (Fn), Invasin (In), *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und MAdCAM, sowie an das *N*-terminale Fragment von Osteopontin (Opn).^{157,164} An Fn wurde erstmalig entdeckt, dass Integrine in extrazellulären Matrixproteinen die RGD-Tripeptidsequenz erkennen.¹⁶⁵ Für $\alpha_4\beta_1$ -Integrine ist die minimale Erkennungssequenz von Fn die Tripeptidsequenz LDV, welche in humanen, Rinder-, Ratten- und Hühner-Fibronectin sehr stark konserviert ist.¹⁶⁶

Die transmembranen Glykoproteine *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und *mucosal addressing cell adhesion molecule-1* (MAdCAM-1) gehören zusammen mit ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3 in die integrinbindende Untergruppe der *immunoglobulin superfamily* (IgSF)-Rezeptoren (Abb. 3.5).¹⁶⁷ VCAM-1 und MAdCAM-1 werden normalerweise im gastrointestinalen Trakt exprimiert. Während MAdCAM-1 ausschließlich im Darm zu finden ist¹⁶⁸, wird VCAM-1 auch in den peripheren Organen exprimiert.⁸¹

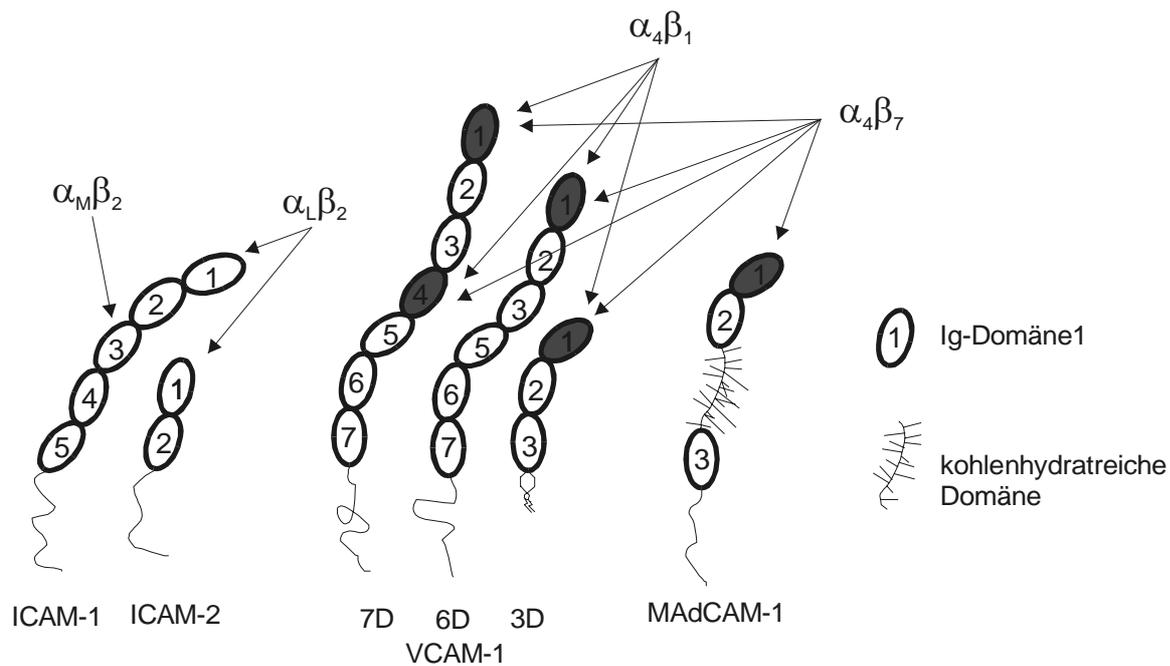


Abbildung 3.4: Domänenstruktur der IgSF-Adhäsionsrezeptoren. Domänen, die mit α_4 -Integrinen wechselwirken, sind dunkel hervorgehoben.¹⁶⁷

Wie aus Abb. 3.4 ersichtlich wird, ist VCAM sowohl ein Ligand für $\alpha_4\beta_1$ - als auch für $\alpha_4\beta_7$ -Integrine, während MAdCAM selektiv an das $\alpha_4\beta_7$ -Integrin bindet. Daneben sind auch Wechselwirkungen von MAdCAM mit dem L-Selektin bekannt. Auf Grund der letzteren beiden Bindungen, die für das *lymphocyte homing* wichtig sind, wird MAdCAM häufig auch als *lymphocyte homing factor* bezeichnet, da es das *homing* $\alpha_4\beta_7$ -Integrin exprimierender Leukozyten an *mucosa*-assoziiertes lymphatisches Gewebe steuert.¹⁶⁷ MAdCAM-1 wird sehr stark auf den postkapillaren Venolen mit hohem Endothel (HEV) der Peyerschen Plaques und dem mesenterialen Lymphknoten auf den Venolen in der *lamina propria* des Darms exprimiert.^{169,170}

Mittels Mutagenese-Studien wurden die D1-Domäne und die D4-Domäne in 7D-VCAM als Bindungsstellen für α_4 -Integrine identifiziert.^{171,172} Diese Studien zeigten, dass MAdCAM und VCAM jeweils einen für die Aktivität entscheidenden, hochkonservierten Aspartatrest innerhalb der Erkennungssequenzen (QIDSP in VCAM, LDT in MAdCAM) enthalten. Die Selektivität von MAdCAM für $\alpha_4\beta_7$ -Integrine könnte in der D2-Domäne begründet sein: Ein Hybrid-Protein aus MAdCAMs D2-Domäne und VCAMs D1-Domäne zeigte ebenfalls eine selektive Anbindung an $\alpha_4\beta_7$ -Integrine.¹⁷³

Die sehr ähnlichen Kristallstrukturen von zwei extrazellulären, N-terminalen Ig-Domänen D1 und D2 von VCAM¹¹⁷ (Abb. 3.5) und MAdCAM^{174,175} (Abb. 3.6)

zeigen typische Ig-Faltungsmerkmale. So besteht jede Ig-Domäne aus sieben β -Strängen, die mit A bis G bezeichnet werden. Die beiden β -Faltblätter ABE und CDFG sind über eine Disulfidbrücke zwischen B und F miteinander verknüpft.

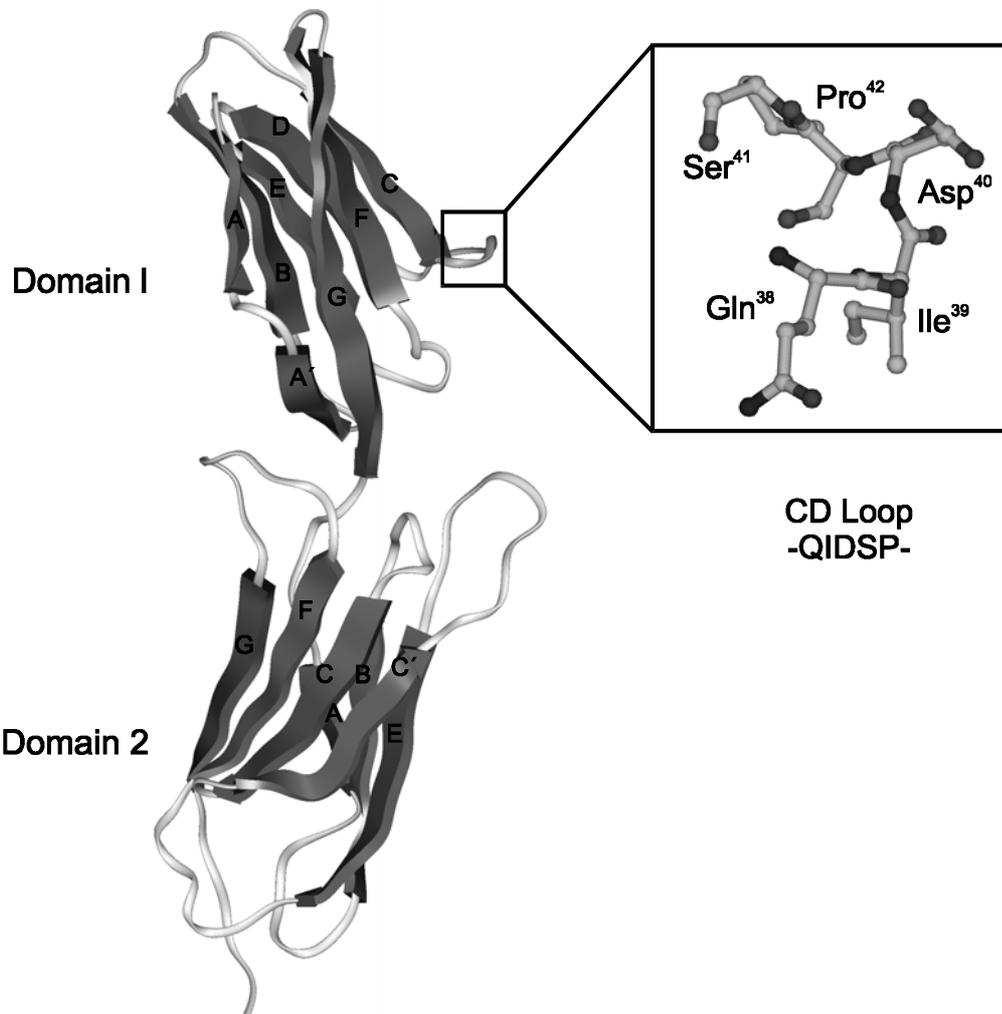


Abbildung. 3.5: Kristallstruktur der Ig-Domänen D1 und D2 von VCAM-1.¹¹⁷ Die QIDSP-Erkennungssequenz liegt innerhalb des CD-loops.

Eine neuere Kristallstruktur von MAdCAM in Arbeiten von R. L. Brady *et al.*¹⁷⁵ zeigt in der D1-Domäne eine stärkere strukturelle Übereinstimmung der bindenden CD-Schleifen in VCAM und MAdCAM als bisher angenommen. Bei einer Überlagerung der beiden D1-Domänen liegen die beiden kritischen Aspartatreste im neuen Modell nur 2 Å, anstelle von bisher angenommenen 8 Å auseinander. Außerdem zeigt die aktuelle Kristallstruktur von MAdCAM am C-Terminus von D2 eine unterschiedliche Konformation. Deutliche Unterschiede in den beiden Kristallstrukturen zeigen sich in der DE-Schleife der D2-Domäne. Während dort in

MAdCAM negative Ladungen vorherrschen (Glu¹⁴⁸-Glu¹⁴⁹), sind in VCAM zwei positiv geladene Reste zu finden (Arg¹⁴⁶-Lys¹⁴⁷).

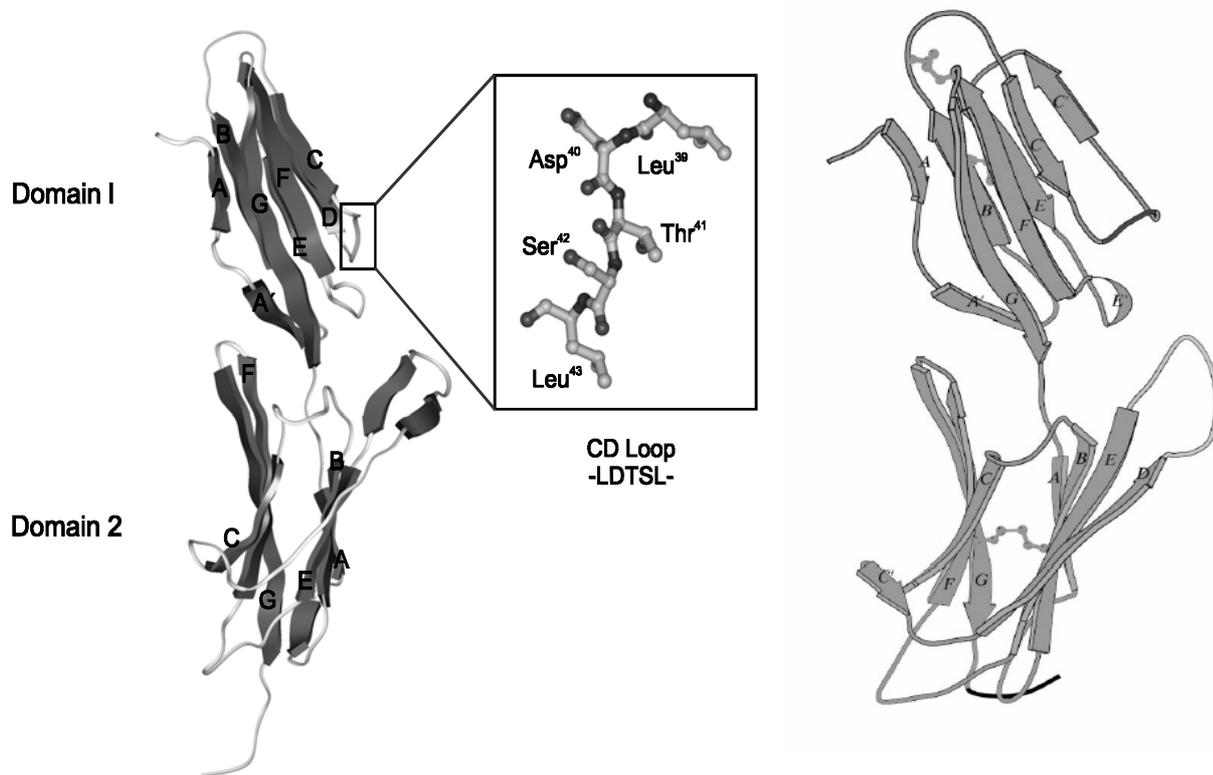


Abbildung. 3.6: Kristallstrukturen der Ig-Domänen D1 und D2 von MAdCAM-1.^{174,175} Das LDT-Bindungsmotiv liegt innerhalb des CD-loops. (links: Kristallstruktur von 1998, rechts: Kristallstruktur von 2002).

Die großen Ähnlichkeiten in der D1-Domäne zusammen mit den oben erwähnten Ergebnissen des D2-MAdCAM/D1-VCAM-Hybrids legen den Schluss nahe, dass die Bindung an $\alpha 4$ -Integrine über die D1-Domäne erfolgt, während die D2-Domäne essentiell für die Selektivität ist. Bei beiden Integrinliganden ordnet sich die Erkennungssequenz in einem *turn* der exponierten CD-Schleife an, der über Wasserstoffbrücken zwischen Prolin im Fall von VCAM-1¹¹⁷ oder einem Guanidin-Rest von Arginin bei MAdCAM-1¹⁷² mit dem Bindungsmotiv stabilisiert wird. Diese konformative Einschränkung trägt bedeutend zur definierten Struktur des Erkennungsmotivs bei. Die starre räumliche Anordnung der Bindungssequenz in der Schleifenregion erklärt auch, warum lineare Peptide derselben Sequenz nahezu keine antagonistische Aktivität aufweisen.¹⁷⁶

3.7 Pathologische Bedeutung von α_4 -Integrinen

Entzündungen sind eine Reaktion des Immunsystems auf Verletzungen, Infektionen und allergische Erkrankungen, welche durch eine lokale Anhäufung von Leukozyten, Plasmaproteinen und Flüssigkeit an der extravaskulären Seite charakterisiert werden. Allergische Reaktionen können dem angrenzenden Gewebe schaden. Exzessive Entzündungen können teilweise bei Organtransplantationen einen problematischen Verlauf hervorrufen und zur Abstoßung führen.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ Während des Verlaufs von chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen trägt das Immunsystem zur Pathologie bei, wobei Leukozytenadhäsion und Extravasation teilweise beteiligt sind (Abb. 3.3). Eine komplexe Anzahl von CAM-Wechselwirkungen mit Leukozyten und Endothelzellen spielt eine entscheidende Rolle beim Ablauf dieser Prozesse. Zirkulierende Leukozyten werden durch Lockstoffe differenziert und wandern in die Richtung des Lockreizes. Durch Unterdrückung der CAM-Expression und Funktion während des Verlaufs einer Entzündung könnte es möglich sein, Immunkrankheiten zu heilen.¹¹ Leukozyten exprimieren grundlegend VLA-4 bzw. α_4 -Integrine im niedrig-affinen Zustand, um ein Anhaften zu verhindern. Wenn sie jedoch einen Entzündungsherd erreichen, werden Leukozyten aktiviert und extravasieren in das Gewebe.^{167,180} Eine bedeutende Anzahl der Entzündungshemmer wirkt als unselektive Expressionshemmer der β_1 -, β_2 - und β_3 -Integrine, von denen z.B. Glykocorticoide die Expression sowohl von LFA-1, VLA-4, VCAM-1 und LFA-3 als auch P- und E-Selektine hemmen.^{181,182} Die meisten entzündungshemmenden Medikamente gehören zu der Gruppe der NSAID - nicht-stereoidische Entzündungshemmer - deren Wirkung auf der Unterdrückung der Prostaglandin-Biosynthese durch das Enzym Cyclooxygenase¹⁸³ basiert.¹⁸⁴ Weitere neuere Therapieansätze wurden basierend auf Leukotorien-Antagonisten¹⁸⁵ oder *tumor necrosis factor* (TNF) Blocker¹⁸⁶ vorgestellt. Entzündungs- und Autoimmunkrankheiten wie rheumatoide Arthritis, *inflammatory bowel disease* (IBD), Multiple Sklerose, Psoriasis oder Asthma werden gegenwärtig mit relativ alten, zuvor genannten Medikamenten behandelt, obwohl eine lange Einnahme mit inakzeptablen Nebenwirkungen wie zum Beispiel einem erhöhten Infektionsrisiko durch Beeinträchtigung des Immunsystems verbunden ist. Aus diesem Grund ist es wünschenswert, Medikamente gegen chronische Entzündungen zu entwickeln, welche selektiv spezifische zelluläre Reaktionen inhibieren, ohne das normale Immunsystem zu beeinträchtigen. Seitdem geklärt ist, dass Leukozytenextravasation ein Schlüsselschritt bei krankheitserregenden Vorgängen wie Autoimmun- und Entzündungsreaktionen ist, rückt die Suche nach α_4 -Liganden in den

Blickpunkt. Potentielle Nachteile einer solchen Therapie könnten in der Expression der Adhäsionsmoleküle auf verschiedenen Zelltypen liegen, was einen Einfluss auf das gesamte Immunsystem zur Folge haben könnte. Trotzdem liegen bereits viel versprechende Ergebnisse zur Therapie von Multipler Sklerose¹⁸⁷ und der Crohn-Krankheit vor.¹⁸⁸ Darüber hinaus wurden auch Erfolge bei der Behandlung von Asthma, Arteriosklerose und rheumatoide Arthritis mittels selektiver Inhibierung der $\alpha_4\beta_7$ /VCAM-1 Wechselwirkung erzielt.^{11,12,147,189,190}

Bei IBD (*inflammatory bowel disease*) ist die Expression von MAdCAM im Darm erhöht, was eine erhöhte Lymphozytenakkumulation zur Folge hat. Klinisch kann diese Krankheit in zwei sich überschneidende Phänotypen eingeteilt werden: *colitis ulcerosa* (UC) und Crohn-Krankheit (CD, *enteritis regionalis*).¹⁹¹ Dadurch, dass MAdCAM im Vergleich zu anderen Adhäsionsmolekülen nur auf sehr wenigen Geweben exprimiert wird, ist es ein idealer Ansatzpunkt zur Behandlung von Darmerkrankungen, ohne das übrige Immungeschehen drastisch zu beeinflussen.

Auch in der Metastasierungskaskade spielen α_4 -Integrine eine wichtige Rolle. Auf Zellen des Primärtumors verhindern α_4 -Integrine die Loslösung und Invasion von malignen Zellen. Bei zirkulierenden Tumorzellen können α_4 -Integrine die Dissemination verstärken.^{192,193}

α_4 -Integrinliganden besitzen somit großes therapeutisches Potential bei Entzündungen, Autoimmunerkrankungen und möglicherweise auch bei solchen Tumoren, die eine α_4 -Integrin-abhängige Metastasierung zeigen. Substanzen, die selektiv die $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM Interaktion blockieren, scheinen sehr aussichtsreich in einer Therapie von IBD zu sein. $\alpha_4\beta_1$ -selektive Verbindungen würden die Migration von $\alpha_4\beta_1$ -positiven Leukozyten zu VCAM-reichen Gewebe unterbinden. Ob Selektivitäten für $\alpha_4\beta_1$ bzw. $\alpha_4\beta_7$ klinisch relevant sind, werden in Zukunft weiterführende klinische Studien beantworten müssen. Allerdings weisen selektiv wirkende Medikamente höchstwahrscheinlich geringere Nebenwirkungen auf.

3.8 Synthetische α_4 -Integrinliganden als Therapeutika

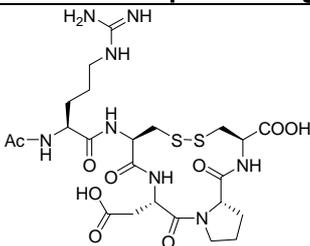
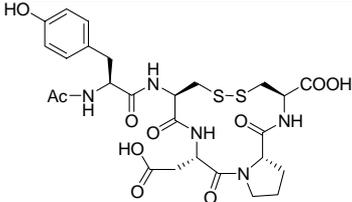
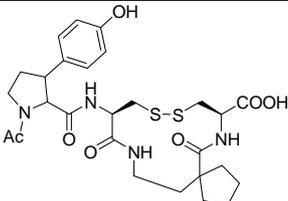
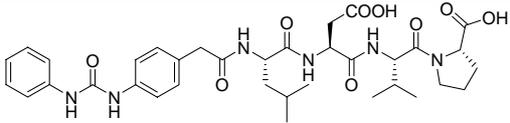
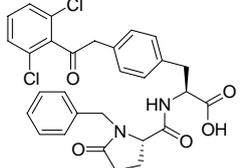
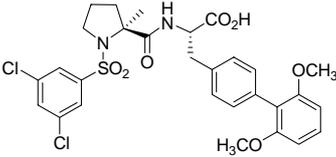
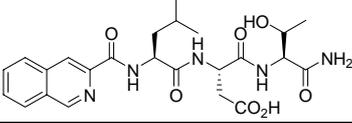
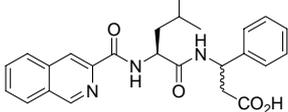
Die ersten klinischen Versuche zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie der Crohn-Krankheit und Multipler Sklerose mit „Natalizumab[®]“, einem monoklonalen Antikörper (mAbs) gegen α_4 -Integrine, erschienen viel versprechend.¹²⁹ Jedoch wurde der Antikörper auf Grund seiner Nebenwirkungen wieder vom Markt genommen. Im Allgemeinen ist jedoch die Verwendung von Peptiden und niedermolekularen

Liganden den Antikörpern vorzuziehen, da kleine Moleküle generell nicht zur Auslösung einer Immunantwort neigen. Die geringe Plasmahalbwertszeit von mAbs wird ebenfalls als problematisch angesehen. Durch die bereitzustellende Menge ist man bestrebt, angesichts der chronischen Natur der zu behandelnden Krankheiten kostengünstigere niedermolekulare Wirkstoffe zu entwickeln.

Die Entwicklung potenter Integrinliganden stützt sich auf die Kenntnis der Erkennungssequenz natürlicher Integrinliganden. Die Entwicklung von einem Liganden-basierten zu einem strukturbasierten Wirkstoffdesign ging mit der Aufklärung der Röntgenstruktur der Kopfgruppe des $\alpha_V\beta_3$ -Integrins einher, welche jedoch eine zu geringe Ähnlichkeit mit den α_4 -Integrinen aufweist, um ein strukturgestütztes Design zu ermöglichen. Somit ist die Wirkstoffsuche derzeit noch auf ligandenorientierte Ansätze beschränkt. Zunächst ging man bei der Entwicklung von α_4 -Integrinantagonisten von den Proteinen Fibronectin, VCAM-1 und einem α_4 -Antikörper aus, welche zu potenten Peptiden führten. 1992 berichteten Wayner *et al.*, dass das Pentapeptid EILDV an VLA-4 Integrine bindet.¹⁹⁴ Bochner *et al.* konnten durch den Einbau eines Tyrosins in die Sequenz GPEYLDVP-NH₂ eine deutliche Aktivitätssteigerung gegenüber dem natürlichen Liganden CS-1 beobachten.¹⁹⁵ Basierend auf diesen Ergebnissen konnten Vanderslice *et al.* zyklische, disulfidverbrückte VLA-4 Integrinliganden **1** entwickeln.¹⁹⁶ Basierend auf der Tetrapeptidsequenz -Ile-Leu-Asp-Val- wurden auch zyklische Peptide entwickelt, welche entweder über ihre C- und N-terminalen Enden **2** oder eine verbrückende Gruppe miteinander verknüpft sind.^{197,198} Frühere Veröffentlichungen berichten über das disulfidverbrückte Peptid RC^{*}D[ThioP]C^{*} **3** als potenten Liganden¹⁹⁹ für VLA-4 Integrine, welches ursprünglich als konformativ eingeschränktes RGD-Mimetikum konzipiert wurde und dessen weitere Entwicklung zu sehr potenten Liganden **4** führte.²⁰⁰ Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das -Asp-Pro-Dipeptid durch lineare Verbindungsstücke **5** ersetzt werden kann, welche über einen hydrophoben Bereich mit den VLA-4 Integrinen wechselwirken.^{201,202} Der erste niedermolekulare VLA-4 Ligand stammt von Lin *et al.* und wurde in der klinischen Phase untersucht. Eine systematische Variation an beiden Enden der linearen Erkennungssequenz des natürlichen Liganden führte zu der Identifizierung eines für die Aktivitätssteigerung essentiellen N-terminalen PUPA-Restes.^{203,204} Addition eines C-terminalen Prolinrestes führte zur dem potenten Liganden Bio1211[®] **6**. Derivate der Verbindung **6** konnten erfolgreich im Tiermodell gegen Asthma eingesetzt werden. Die fundierte Rolle des PUPA-Rest wird durch seine Anwendung in vielen LDT-Mimetika bekräftigt.^{128,205,206} Acylphenylalanine **7** bilden die zweite große Klasse der

α_4 -Integrinliganden, von denen viele die Fähigkeit besitzen, sowohl VLA-4 als auch $\alpha_4\beta_7$ -vermittelnde Wechselwirkungen mit unterschiedlicher Selektivität zu inhibieren.^{147,205-208} Die Aktivität dieser Verbindungen ergibt sich aus ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit den oben erwähnten zyklischen, disulfidverbrückten VCAM-1 Liganden. Beispiele aus jüngster Zeit (Verbindung **8**) illustrieren, dass die Suche nach optimalen α_4 -Liganden noch nicht abgeschlossen ist.²⁰⁹ Verbindung **10** zeigt ein Beispiel eines selektiven $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden aus unserer Arbeitsgruppe^{13,14}, welcher aus einer peptidischen Leitstruktur **9** hervorging.^{210,211} Die angegebenen, erheblich voneinander abweichenden IC_{50} -Werte lassen sich jedoch auf Grund der stark unterschiedlichen Testbedingungen nur schwer miteinander vergleichen. So ergeben sich aus zellulären Assays meist niedrigere biologische Aktivitäten als aus Tests an isolierten Rezeptoren.

Tabelle 1. Auswahl von α_4 -Liganden.

Nr.	Struktur	Rezeptor	IC ₅₀	Lit.
1	Cyclo(*C-Y-L-D-V-C*)	$\alpha_4\beta_1$	50nM	196
2	cyclo(-MePhe-Leu-Asp-Val-D-Arg-D-Arg-)	$\alpha_4\beta_1$	260nM	198
3		$\alpha_4\beta_1$ $\alpha_5\beta_1$	90nM	199
4		$\alpha_4\beta_1$	3nM	200
5		$\alpha_4\beta_1$	0.1nM	202
6		$\alpha_4\beta_1$	1nM	212
7		$\alpha_4\beta_1$	0.4nM	213
8		$\alpha_4\beta_1$	0.08nM	214
9		$\alpha_4\beta_7$ $\alpha_4\beta_1$	3nM	211
10		$\alpha_4\beta_7$	1.4mM	13

4 Entwicklung von $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Entwicklung niedermolekularer, nicht-peptidischer $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden. Die Entwicklung von Bibliotheken, welche das Leitmotiv in verschiedener Weise variieren und zum Teil lediglich auf seine prinzipielle schematische Struktur reduzieren, ist im Folgenden dargestellt. Ein Hauptaugenmerk wurde auf die Reduzierung von im Molekül enthaltenen Amidbindungen gelegt, indem u.a. die in unserem Arbeitskreis erprobte Substitution von Amidbindungen durch planare aromatische Systeme angewendet wurde. Außerdem sollten Gerüstmetika entwickelt werden, die das Rückgrat des natürlichen Peptids durch ein artfremdes Rückgrat ersetzen, an dem die für die Aktivität essentiellen Seitenkettenelemente des ursprünglichen Peptids verankert sind. Allgemein sollte die Verwendung von wirkstoffverwandten Grundgerüsten, welche sich schon in der Natur profiliert haben und deshalb potentiell oral verfügbar sein sollten, zu Verbindungen mit verbesserter Affinität und Bioverfügbarkeit führen.

4.1 Einführung

Betrachtet man den Liganden, so wird die an der Bindung beteiligte Oberfläche als Pharmakophor bezeichnet, bei dem das Peptidrückgrat als Grundgerüst für die pharmakophoren Gruppen dient. Enzyme oder Rezeptoren bevorzugen spezifische Konformationen der Liganden. Das Konzept der starren Komplementarität hat zu Versuchen geführt, starre oder konformativ eingeschränkte Verbindungen von ursprünglich flexiblen Substanzen zu entwickeln, die Aussagen über die bevorzugte Konformation des Liganden bei der Bindung an den Rezeptor erlauben. Dabei hat sich der Begriff „*bioactive conformation*“ etabliert.²⁶ Da selbst konformativ eingeschränkte Verbindungen in einer Vielzahl von Konformationen vorliegen können, beschreibt der Begriff „*(bioactive) conformation*“ den Mittelwert einer limitierten Anzahl von nahe verwandten Konformationen einer Verbindung.²¹⁵ Aus diesem Grund stellt die konformative Einschränkung eine wichtige und effektive Methode zur Charakterisierung der biologisch aktiven Konformation von Peptiden dar.²¹⁶ Die bevorzugte Konformation eines flexiblen Moleküls in Lösung muss nicht zwingend mit der rezeptorgebundenen korrelieren. Die Fixierung des Liganden in der bevorzugten Konformation erhöht die Bindungsaffinität an den Rezeptor, da ein geringerer Entropieverlust zu verzeichnen ist, welcher bei der Bindung eines konformativ ungünstigeren Liganden aufzuwenden wäre.^{215,217} Peptide sind flexible

Verbindungen, welche in Lösung in verschiedenen Konformationen vorliegen. Generell kann man annehmen, dass je besser die Struktur in Lösung sich der rezeptorgebundenen Konformation annähert, desto größer die Affinität zum Rezeptor ist. Eine brauchbare Methode zur Bestimmung der Konformation bei der Bindung an den Rezeptor bietet die Verwendung von konformativ eingeschränkten Molekülen (Abb. 4.1). Wenn die konformativ eingeschränkte Verbindung aktiv ist, kann man annehmen, dass die bevorzugte Struktur des Bindungsmotivs eher der rezeptorgebundenen Peptidkonformation als dem entsprechenden linearen Peptid ähnelt (*matched case*). Umgekehrt kann man beobachten, dass eine konformative Einschränkung, welche die pharmakophoren Gruppen in einer der aktiven Struktur nicht verwandten Konformation anordnet, zu verminderter Aktivität führt (*mismatched case*).³²

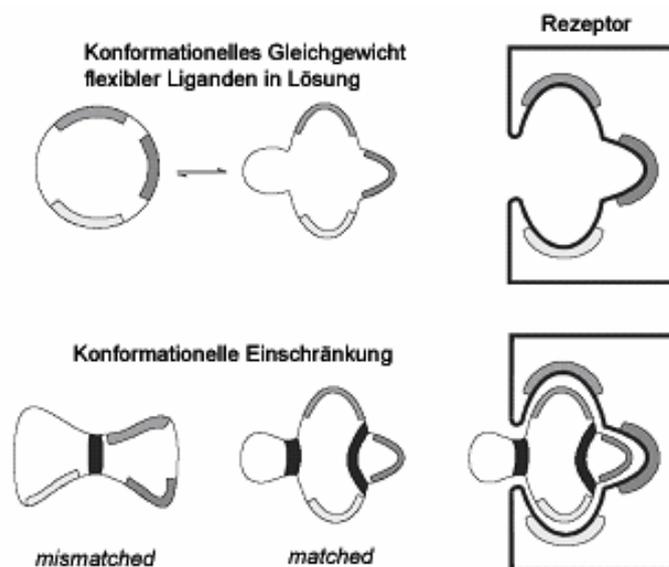


Abbildung 4.1: Flexible Moleküle können in Lösung unterschiedliche Konformationen einnehmen. Durch konformative Restriktion z.B. Zyklisierung kann die aktive Konformation fixiert werden.³²

Eine gängige Methode, um Moleküle in eine weniger flexible und bioaktive Konformation zu bringen, bedient sich der Zyklisierung des Peptidrückgrats.²¹⁸ Zyklisierung wird häufig als Strategie zum Design von potenten Liganden oder Medikamenten benutzt.²⁵ Verminderte molekulare Flexibilität durch eine geringere Anzahl an rotierbaren Bindungen scheint auch die Wahrscheinlichkeit einer besseren oralen Verfügbarkeit zu erhöhen, welche unter anderem zu höheren Selektivitäten führen kann. Die Verwendung von zyklischen Peptiden ist ein allgemein akzeptiertes Verfahren zur Aufklärung von bioaktiven Konformationen und zur Generierung von Leitstrukturen.^{82,197,198,219}

Die Erkennungssequenz besteht häufig nur aus drei bis vier Aminosäuren³³, wobei die Sekundärstruktur des Peptids überwiegend als Gerüst zur Präsentation der zur Erkennung spezifischen pharmakophoren Seitenketten dient.²²⁰ Unter diesen Bedingungen dient das restliche Molekül zur Ausbildung der aktiven Konformation. In vielfältigen Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass kurze lineare Peptidsequenzen mit größeren Proteinen konkurrieren können, solange ihre Erkennungssequenz sich in einem β -turn oder β -sheet anordnet.^{125,219,221} Vom strukturellen Standpunkt aus betrachtet haben β -turns eine besondere Rolle als Träger der molekularen Erkennung erreicht, da sie eine sterisch kontrollierte Anordnung der pharmakophoren Gruppen ermöglichen.^{33,222,223} Der Austausch eines Peptids durch ein Nicht-Peptid unter Erhalt der pharmakophoren Gruppen, ein so genanntes β -turn-Mimetikum, wurde zu einem Steckenpferd der medizinischen Chemie.^{10,224-226} Die erste erfolgreiche Anwendung des Konzepts der konformativen Einschränkung wurde von Veber *et al.* berichtet, wobei aus dem Peptidhormon Somatostatin ein oral verfügbares Mimetikum abgeleitet werden sollte.²²⁷ Schließlich stellte sich heraus, dass die Tetrapeptidsequenz -Phe-Trp-Lys-Thr- Teil eines β -turns ist, welcher die zur Erkennung beteiligten pharmakophoren Gruppen beinhaltet. Weitere Untersuchungen führten zu einem potenten zyklischen Hexapeptid, bei dem nur sechs der ursprünglich 14 Aminosäuren zur Aktivität beitragen.²¹⁹ Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die biologische Aktivität durch eine Fixierung der „*bioactive conformation*“ in einem Hexapeptid beibehalten werden kann. Dies ist nur ein Beispiel, bei dem zyklische Peptide mit gleicher oder verbesserter Aktivität aus natürlichen Liganden abgeleitet werden können.^{216,228-230} Hirschmann *et al.* entwickelten Anfang der 90er Jahre Gerüstmimetika auf der Basis von Monosacchariden.^{9,231,232} Vergleicht man die geometrischen Parameter von Monosaccharidgerüsten und einem Peptidrückgrat, so wird ersichtlich, dass man durch Zuckerreste besonders gut sowohl β I'- und γ -turns als auch andere privilegierte Strukturen wie β II'- oder β II-turns Strukturen imitieren kann.²³³ Ausgehend von einer Konformationsanalyse des somatostatinanalogen zyklischen Hexapeptids (*Veber-Hirschmann-Peptid*) wurde das Rückgrat des β -turns mit den für die Aktivität wichtigen pharmakophoren Gruppen des Tetrapeptids -Phe-D-Trp-Lys- durch ein β -D-Glucose-Gerüst ersetzt (Abb. 4.2).

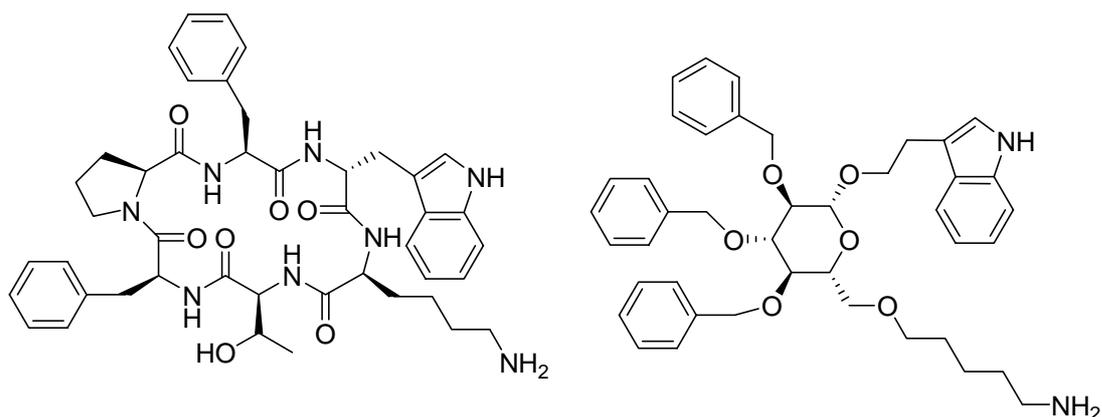


Abbildung 4.2: Veber-Hirschmann-Peptid im Vergleich mit dem de-novo designed Glucosegerüstmimetikum.

Im Falle von RGD-Mimetika konnten nur inaktive bzw. schwach aktive Glucosederivate generiert werden. Nicolaou *et al.* begründeten dies mit einer zu hohen Flexibilität der Struktur.²³⁴ Außerdem ist bei cyclo(-RGDfV-) mindestens eine der in Abbildung 4.3 angezeigten Amidbindungen für die Aktivität wichtig.²³⁵

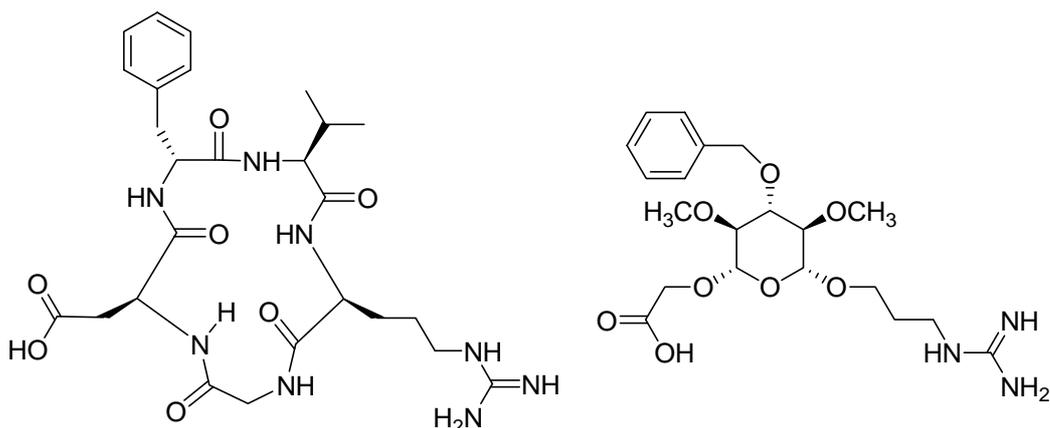


Abbildung 4.3: cyclo(-RGDfV-) und ein Mimetikum basierend auf Glucose.

Abbildung 4.4 zeigt zwei weitere Beispiele einer erfolgreichen Umsetzung dieses Konzepts. In Verbindung **D** liegt ein typisches Gerüstmimetikum vor, dessen Steroidgerüst die für die Bindung an $\alpha_{11b}\beta_3$ -Integrine wichtigen pharmakophoren Gruppen in gleicher räumlicher Anordnung präsentiert wie im peptidischen RGD-Peptid **C**.²³¹ Nicht-peptidische Grundgerüste basierend auf Diphenyl-Einheiten wurden kürzlich beschrieben: Hier zeigt das Mimetikum **F** sogar eine deutlich höhere inhibitorische Wirkung gegenüber der Farnesyltransferase als der peptidische Ligand **E**.²³⁶

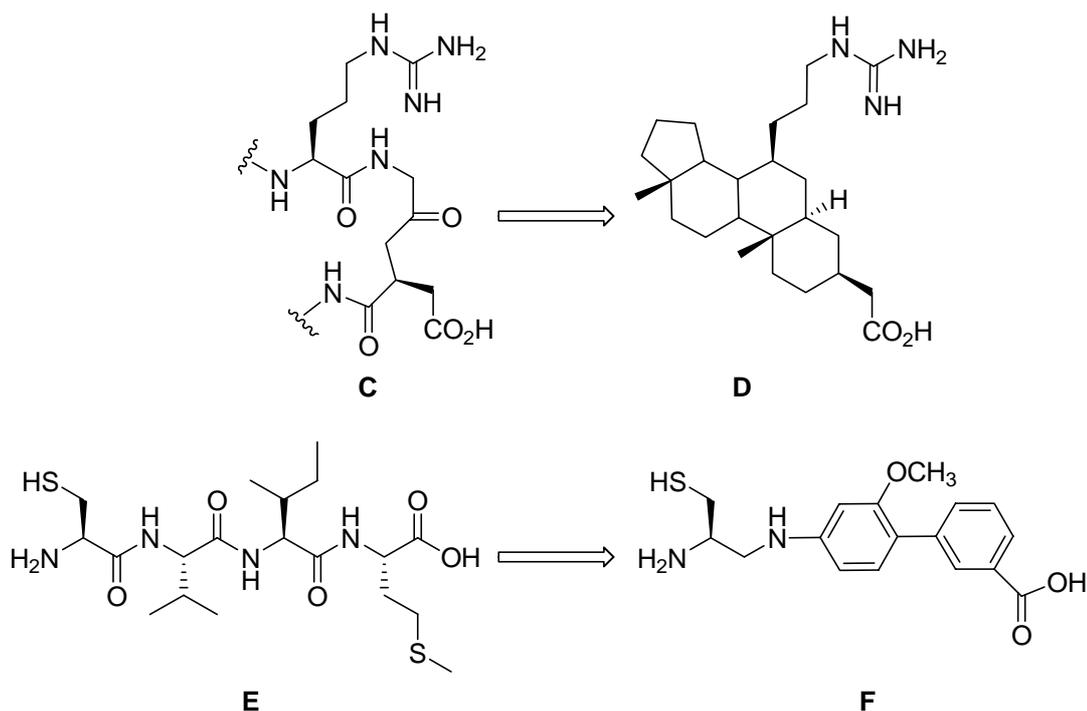


Abbildung 4.4: Beispiele für Gerüstmimetika und ihre peptidische Vorläufer.

Um gute Bindungseigenschaften der Liganden zu erreichen, sollte ein Grundgerüst folgende Anforderungen erfüllen:

- Grundkörper oder Strukturelemente aus dem Bereich der Naturstoffe, deren orale Verfügbarkeit bekannt ist.
- Eine gewisse Starrheit der Konformation, um ein Kollabieren (*hydrophobic collaps*) der Struktur zu verhindern.
- Eine einfach zu modifizierende Struktur.
- An das Grundgerüst sollen Pharmakophore in räumlichen Anordnungen geknüpft werden können, um privilegierte Strukturen zu imitieren (z.B. β -, γ -turns).
- Wenige bzw. nicht spaltbare Amidbindungen zur Erhöhung der metabolischen Stabilität.
- Geringes Molekulargewicht zur Erhöhung der oralen Verfügbarkeit.
- Gleiche räumliche Anordnung der für die Rezeptor- bzw. Enzymbindung verantwortlichen Gruppen wie im Peptid, um eine feste Bindung zu gewährleisten.

Eine weitere Voraussetzung für die Wirksamkeit von Gerüstmimetika ist, dass das Amidrückgrat keine für die Bindung an das Zielmolekül wichtigen Bindungen eingeht. Jedoch kann man dies häufig durch Verwendung von Heterocyclen lösen.

4.1.1 Vorarbeiten

Am Beispiel von $\alpha_4\beta_1$ -²⁰⁷, $\alpha_{IIb}\beta_3$ - und $\alpha_V\beta_3$ -Integrinliganden^{82,237} konnte bereits eindrucksvoll gezeigt werden, wie ausgehend von peptidischen Leitstrukturen, die den natürlichen Liganden nachahmen, niedermolekulare nicht-peptidische Antagonisten entwickelt werden konnten. Dabei sollte von zyklischen Peptiden ausgegangen werden.

In homodeten zyklischen Peptiden ist die Rückgratkonformation sowohl von der Konfiguration der Aminosäureseitenketten, als auch den sterischen Effekten der Gruppen in α -Position zur Aminosäure stark abhängig. Wechselwirkungen der funktionellen Gruppen der Seitenketten mit dem Peptidrückgrat sind von geringerer Bedeutung^{82,220}, können aber in einem ASN-*turn* beobachtet werden.²²³ Während zyklische Peptide ohne *turn*-induzierende Aminosäure in Lösung in einem sich sehr schnell einstellendem Gleichgewicht von mehreren Konformationen vorliegen²³⁸, führt die Einführung einer „Symmetrieverzerrung“ wie zum Beispiel durch eine D-Aminosäure zu einer bevorzugten Konformation, die durch unterschiedliche *turns* differenziert werden kann. D-Aminosäuren im Allgemeinen, sowie D-Prolin im Besonderen bevorzugen die $i+1$ Position einer β_{II} - bzw. einer β' -Schleife. Die Klassifizierung der *turns* und ihrer Untertypen kann an Hand der ϕ - und ψ -Winkel festgelegt werden.²²³ Die Kenntnis dieses konformationellen Verhaltens in Abhängigkeit von der Konfiguration der Aminosäuren kann als Vorlage für ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign genutzt werden. Deshalb wurden die Strukturen von zyklischen Penta- und Hexapeptiden in Lösung, welche D- und L-Alanin, bzw. D- und L-Prolin als strukturinduzierende Aminosäuren enthalten intensiv untersucht.²³⁹ Unter der Annahme, dass sich eine D-Aminosäure in der $i+1$ Position eines β_{II} -*turns* befindet, kann man neue konformationelle Grundgerüste des gleichen Typs durch Variation der Position der D-Aminosäure innerhalb der Sequenz erreichen. Diese sogenannte „*spatial screening*“ Methode zur Bestimmung der räumlichen Anforderungen des Pharmakophors wurde schon erfolgreich auf die RGD-Aminosäuresequenz angewendet.^{240,241}

Für das *spatial screening* der pharmakophoren LDT-Aminosäuresequenz wurden Bibliotheken von zyklischen Penta- und Hexapeptiden synthetisiert, welche D-Prolin

als strukturinduzierende Aminosäure enthielten.²⁴² Von diesen zeigte das Peptid cyclo(-LDTApA-) eine stark inhibierende Wirkung auf die Adhäsion von $\alpha_4\beta_7$ -exprimierenden Zellen an MAdCAM-1 (Abb. 4.5). In Anlehnung an diese Modelle wurden in zyklischen Hexapeptiden zwei gegenüberliegende β -turns in Gegenwart des Prolins induziert: ein β II'-turn, in dem die D-Aminosäure die $i+1$ Position einnimmt und einen gegenüberliegenden β -turn, der im Gleichgewicht einen β I- bzw. β II-Typ repräsentiert. Die anschließende Optimierung dieses Zyklopeptids führte zu weiteren aktiven Verbindungen und ermöglichte die Abschätzung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen.

Tabelle 2: Effekt von zyklischen Peptiden auf die $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM-1-Adhäsion.

Verbindung	Zelladhäsion [%] $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM-1
cyclo(-LDTApA-)	7
cyclo(-LDTApF-)	7 +/-3
cyclo(-LDTDpF-)	3 +/-4
Cyclo(-LDTDpTic-)	9 +/-1

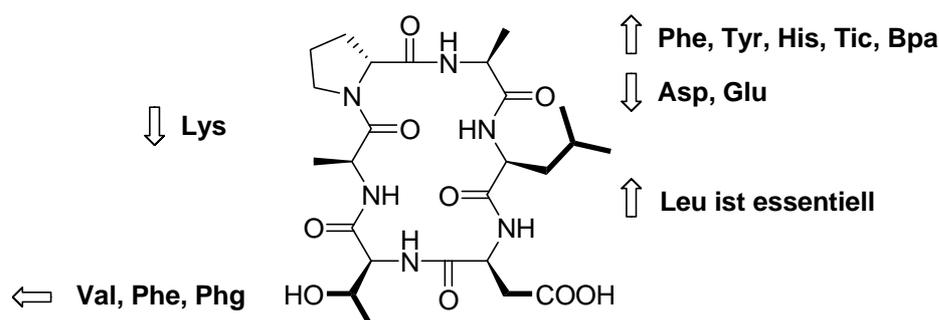


Abbildung 4.5: Abgeleitete Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aus Bibliotheken von zyklischen Hexapeptiden im Rahmen der Optimierung des Peptids cyclo(-LDTApA-).²⁴² Die Pfeilrichtung beschreibt eine erhöhte oder erniedrigte Aktivität.

Die Substitution von Alanin in Position 6 von cyclo(-LDTApA-) durch hydrophobe Aminosäuren zeigte, dass hydrophobe Wechselwirkungen die Bindungsaffinität steigern. Anhand der Analyse der Zyklopeptide konnten durch NMR-Spektroskopie Strukturinformationen gewonnen werden, die Auskunft über die räumliche Orientierung der pharmakophoren Gruppen der Erkennungssequenz LDT gaben (Abb. 4.6).²⁴² Zur weiteren Entwicklung von nicht peptidischen aktiven Verbindungen wurden die strukturellen und funktionellen Anforderungen der LDT-Erkennungssequenz durch Verwendung von peptidomimetischen Variationen wie Peptoide, Azapeptide und reduzierte Amidbindungen genau untersucht.¹⁴

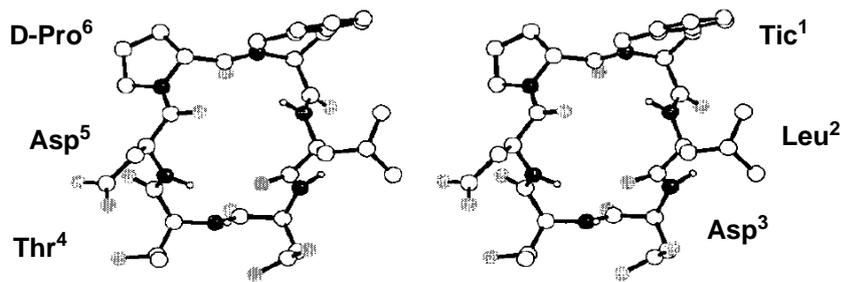


Abbildung 4.6: Stereoplot des Zyklopeptids *cyclo(-LDTDpTic-)*.

Die Strukturaufklärung der Konformation des zyklischen Hexapeptids führte zu Studien mit einem β -D-Mannose-Pyranring als Grundgerüst. Das substituierte β -D-Mannose-Grundgerüst sollte dabei die Konformation der pharmakophoren Gruppen in der zyklischen Leitstruktur imitieren. Entgegen den Erwartungen aus der Überlagerung mit der zyklischen Hexapeptidleitstruktur zeigte das mit den pharmakophoren Gruppen substituierte β -D-Mannopyranose-Mimetikum keine Aktivität gegenüber $\alpha_4\beta_7$ -Integrinen. Beim Austausch der LDT-Sequenz gegen das LDS-Erkennungsmotiv konnte jedoch Selektivität für $\alpha_4\beta_1$ erzielt werden.²⁴³ Ersetzt man jedoch die Serin-Seitengruppe durch einen Phenylalanin-Rest, so erhielt man unter Verwendung einer hydrophoben Schutzgruppe einen potenten Liganden, der die MAdCAM-1/ $\alpha_4\beta_7$ -Wechselwirkung inhibiert (Abb. 4.7).²⁴⁴

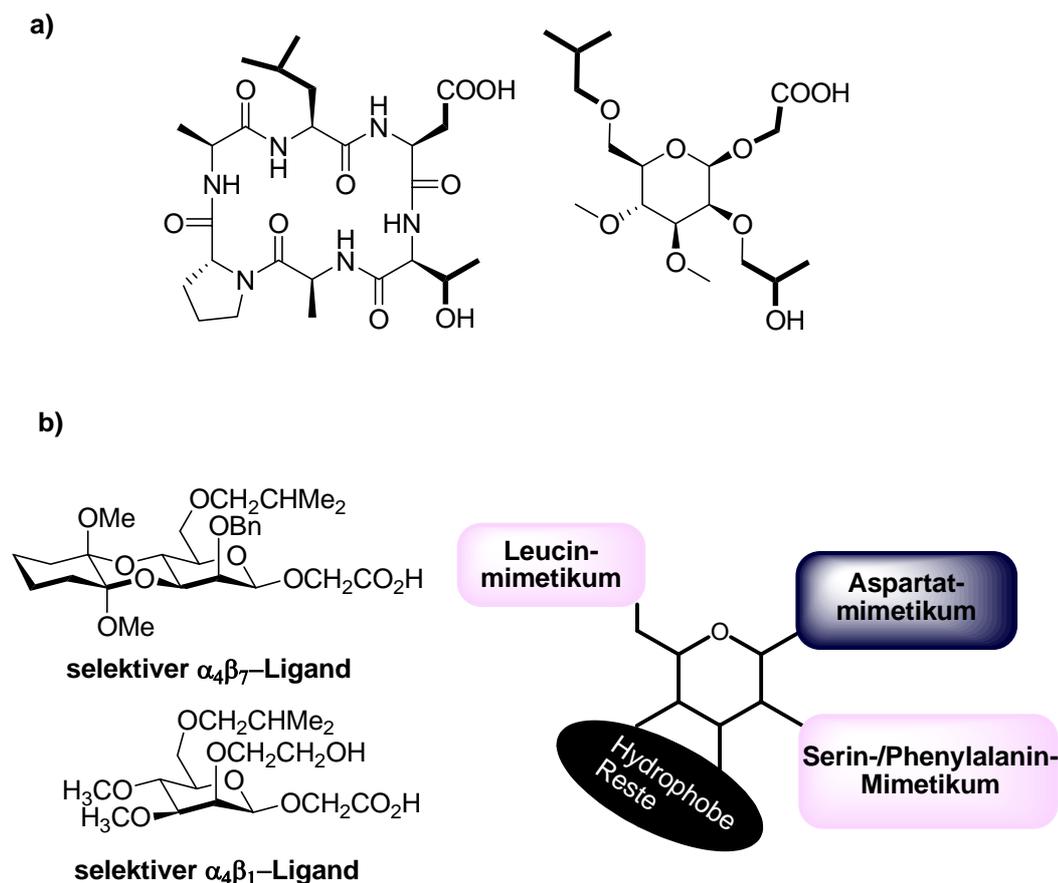


Abbildung 4.7: a) Zyklisches Peptid und auf β -D-Mannose-basierendes Peptidmimetikum. Das Mannopyranose-Grundgerüst präsentiert die pharmakophoren Gruppen in der gleichen Orientierung wie in der peptidischen Leitstruktur. b) Übertragung der pharmakophoren Gruppen eines Zylopeptids auf ein Zuckergerüst.

Ausgehend von der LDT-Erkennungssequenz wurde eine weitere Optimierung der Aktivität und des pharmakologischen Profils angestrebt, insbesondere durch Entwicklung von Peptidmimetika. *N*-terminale Acylierung des LDT Motivs und Modifizierung des *C*-terminalen Carboxamids mit Aminen führte zu potenten, aber unselektiven α_4 -Integrinliganden.^{210,211} Zur weiteren Entwicklung von nicht-peptidischen bzw. selektiven Liganden wurden verschiedene peptidomimetische Variationen, unter anderem der Einbau von *D*- und β -Aminosäuren und die Verwendung von Azapeptid- und Peptidmimetika untersucht, welche zur Identifizierung der sowohl strukturellen als auch funktionellen Anforderungen an die Erkennungssequenz dienen sollten.^{14,211} Alle *N*-terminalen Modifikationen an dem linearen Peptid führten zu inaktiven Verbindungen, bis auf die Substitution von Threonin. Die Amidbindung zwischen Threonin und Aspartat stellte sich als nicht essentiell heraus. Da auf Grund ihrer Planarität die Möglichkeit besteht, eine

Amidbindung durch einen Phenylring zu ersetzen²⁴⁵, konnten gute Erfolge mit 3-Amino-3-aryl-propionsäuren als Asp-Thr-Mimetika erzielt werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde in unserem Arbeitskreis eine Bibliothek von Mimetika entwickelt, aus der sich eine Verbindung mit einer reduzierten Amidbindung als besonders potent und selektiv erwies (Abb. 4.8).¹³

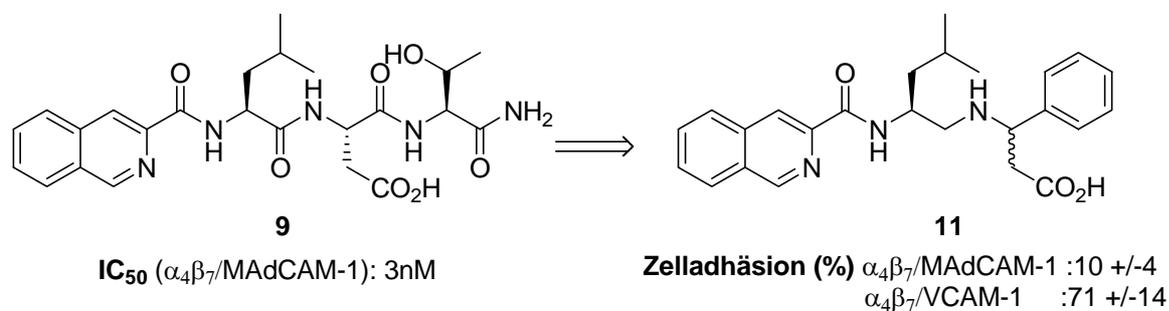


Abbildung 4.8: Leitstruktur für weitere Entwicklung von $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden.

Das Substitutionsmuster des Aromaten der 3-Amino-3-aryl-propionsäure übt nur einen marginalen Einfluss auf die Aktivität aus. Außerdem demonstriert die *N*-terminale Acylierung mit 3-Isochinolin-carbonsäure, dass dieser annelierte Heterozyklus nicht obligatorisch ist, sondern sich lediglich eine aromatische Substitution als wichtig erwies.²¹¹ Da die Position der verbrückenden Amidbindung zwischen Asparaginsäure und Threonin durch aromatische Seitenketten ersetzt wurde, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die biologisch aktive Konfiguration am C-3-Kohlenstoffatom derjenigen am natürlichen Liganden MAdCAM-1 folgt und dementsprechend *S*-Konfiguration aufweisen sollte. Eine enantioselektive Synthese der *C*-terminalen β -Aminosäure wäre aus diesem Grund wünschenswert, um eine Aussage über die biologisch aktive Konfiguration zu treffen und einen vergleichbaren Bindungsmodus in Bezug auf den natürlichen Liganden zu bestätigen. Das Ergebnis des biologischen Assays war jedoch ernüchternd, da alle enantiomerenreinen Epimere die gleiche Aktivität zeigten. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die inhibierende Wirkung dieser Substanzklasse auf anderen, unspezifischen Wechselwirkungen beruht oder sogar auf eine eventuelle Zytotoxizität zurückzuführen ist.

4.1.2 Entwicklung von Peptidmimetika als $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden

Peptide sind im menschlichen Organismus als Enzymsubstrate oder als Botenstoffe für zahlreiche biologische Funktionen verantwortlich. Der Einsatz von Peptiden als Medikamente wird allerdings durch die oben genannten Faktoren wesentlich

eingeschränkt. Es besteht daher ein großes Interesse daran, Wirkstoffe ohne diese Nachteile zu finden.

Die prinzipiellen Grundsätze für die Anforderungen an Peptidmimetika bilden das Leitmotiv für die folgenden Ansätze zur Optimierung der durch die minimale Erkennungssequenz (LDT) und die in unserem Arbeitskreis entwickelte, vorgegebene Leitstruktur (Abb. 4.9):

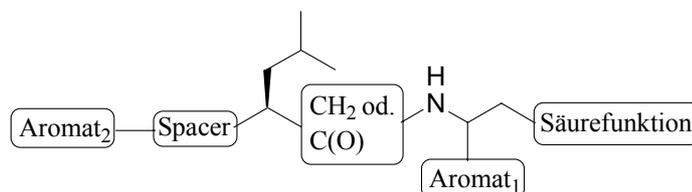


Abbildung 4.9: Schematische Leitstruktur von $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden.

Da sich bei der Synthese von Peptidsurrogaten - insbesondere wenn nicht auf die natürlichen Aminosäuren zurückgegriffen werden kann - eine racemische Synthese der Bausteinen als ökonomischer erweist, werden die folgenden Synthesen in der Regel auf diese Art durchgeführt. Hierbei entstehen beide Stereoisomere in gleichen Mengen und werden als Gemisch biologisch getestet. Sollte das Gemisch aktiv sein, werden die Isomeren dann separat untersucht. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, wesentlich ökonomischer und zeitsparender zu sein.

4.2 Modifikation der N-terminalen Amidbindung durch aromatische Surrogate

4.2.1 Einführung

Der Ersatz einer Amidbindung im Rückgrat biologisch aktiver Peptide ist eine sehr effektive Methode, peptidmimetische Wirkstoffe mit günstigen pharmakologischen Eigenschaften darzustellen, um damit größere metabolische Stabilität oder verbesserte orale Verfügbarkeit zu erreichen. Es ist bekannt, dass der Ersatz einer Amidbindung durch eine nicht-hydrolysierbare Dipeptid-isostere Bindung häufig peptidmimetische Substanzen hervorbringt, welche Inhibierungseigenschaften ähnlich den ursprünglichen Molekülen aufweisen.^{8,10} Zu den peptidmimetischen Variationen zählen unter anderem Peptoide, Azapeptide, Ketomethylen-Pseudopeptide und reduzierte Amidbindungen (Abb. 4.10). Ein wichtiger Unterschied zwischen diesen Klassen von Peptidmimetika besteht darin, dass Peptoide und Ketomethylenderivate

die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen über die -NH-Gruppen verloren haben.

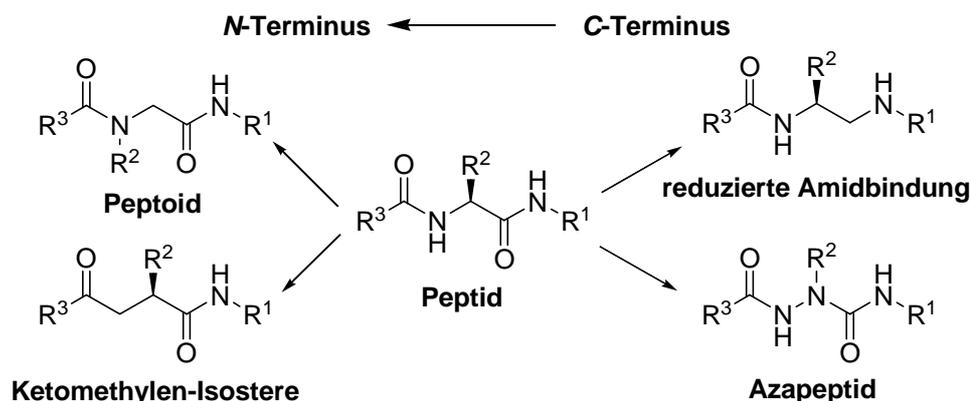


Abbildung 4.10: Verschiedene Peptidmimetika im Vergleich zur Peptidbindung.

Der folgende Ansatz verfolgt die Idee, die *N*-terminale Amidbindung der dipeptidischen Leitstruktur durch Surrogate zu ersetzen, die der planaren Struktur der Amidbindung gleichkommen. Template, welche diesen Ansprüchen genügen, sind unter anderen aromatische Systeme. Es gibt Beispiele in der Literatur, in denen die Bedeutung dieses isosterischen Ersatzes eindrucksvoll demonstriert worden ist. Einerseits gelang es unserer Gruppe, auf dem Gebiet der $\alpha_v\beta_3$ - bzw. α_4 -Integrinliganden die minimale Erkennungssequenz in beiden Fällen am C-Terminus auf eine 3-Amino-3-aryl-propionsäure zu reduzieren, indem die Amidbindung durch substituierte Phenylringe ersetzt wurde.^{13,246} Dass diese Substitution nicht nur in der Peripherie der Erkennungssequenz, sondern auch im Peptidrückgrat von Peptidmimetika möglich ist, demonstrierten Genentech^{247,248} und Eli Lilly^{86,249} mit der Entwicklung potenter RGD-Mimetika, die zunächst den Argininrest durch Benzamidin ersetzten und schließlich einen disubstituierten Phenylring als Ersatz für die Arginin-Glycin-Amidbindung einfügten (Abb. 4.11). So wurde die Evolution von der ursprünglichen Leitstruktur hin zum potenten Analogon beschrieben. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass das Rückgrat als Abstandhalter (*spacer*) für die ionischen pharmakophoren Gruppen dient, während man hydrophobe Wechselwirkungen ausschließen kann. Strukturen mit einem unpassenden *spacer* zeigen keine inhibierende Wirkung.²⁵⁰

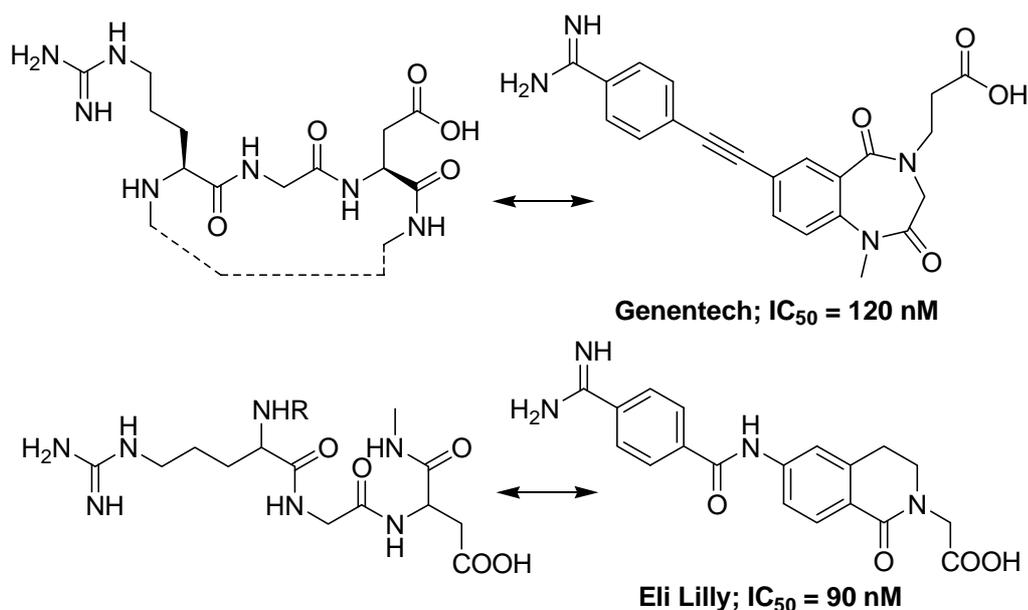


Abbildung 4.11: Rationelles Design von Glycoprotein IIb/IIIa Antagonisten.

4.2.2 Aminophenyllessigsäuren als Bausteine für Peptidmimetika

Die Verwendung von Phenyllessigsäuren bietet sich an, da die die Leucinseitenkette repräsentierende Isobutylgruppe synthetisch einfach durch α -Alkylierung des entsprechenden Esters einzuführen ist. Der Phenylrest sollte so substituiert sein, dass eine weitere Modifikation möglich ist, da bisherige Untersuchungen zeigten, dass die biologische Aktivität mit der Beschaffenheit, insbesondere mit der räumlichen Ausdehnung des aromatischen Systems am *N*-Terminus, korreliert. Die Wahl einer Nitrogruppe erschien viel versprechend, da sie leicht zu einer reaktiven Aminogruppe reduziert werden kann. Der unterschiedlich substituierte Phenylring imitiert die *N*-terminale Amidbindung des acylierten Leucins (Abb. 4.12).

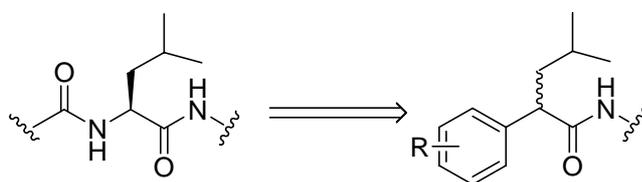


Abbildung 4.12: Die Phenylgruppe als Surrogat der *N*-terminalen Amidbindung.

Nitrophenyllessigsäuren sind in allen Substitutionsmustern kommerziell erhältlich und bieten die Möglichkeit der kovalenten Modifikation nach Reduktion der Nitrogruppe zur Aminogruppe. Der zuerst dargestellte Methylester **12** wurde nach der Alkylierung mit Isobutylbromid in α -Position im Anschluß an die Deprotonierung mit

Natriumhydrid wiederum alkalisch verseift. Die freie Nitrophenylessigsäure (**13**) wurde daraufhin zur Aminophenylessigsäure (**14**) reduziert und nach dem Schutz mit Fmoc-OSu als Baustein **15** für die Festphasensynthese zugänglich gemacht (Abb. 4.13). Das entsprechende *ortho*-Derivat war auf diesem Wege nicht zugänglich, da die Reduktion der Nitrogruppe zu einem intramolekularen Zyklisierungsprodukt führte.

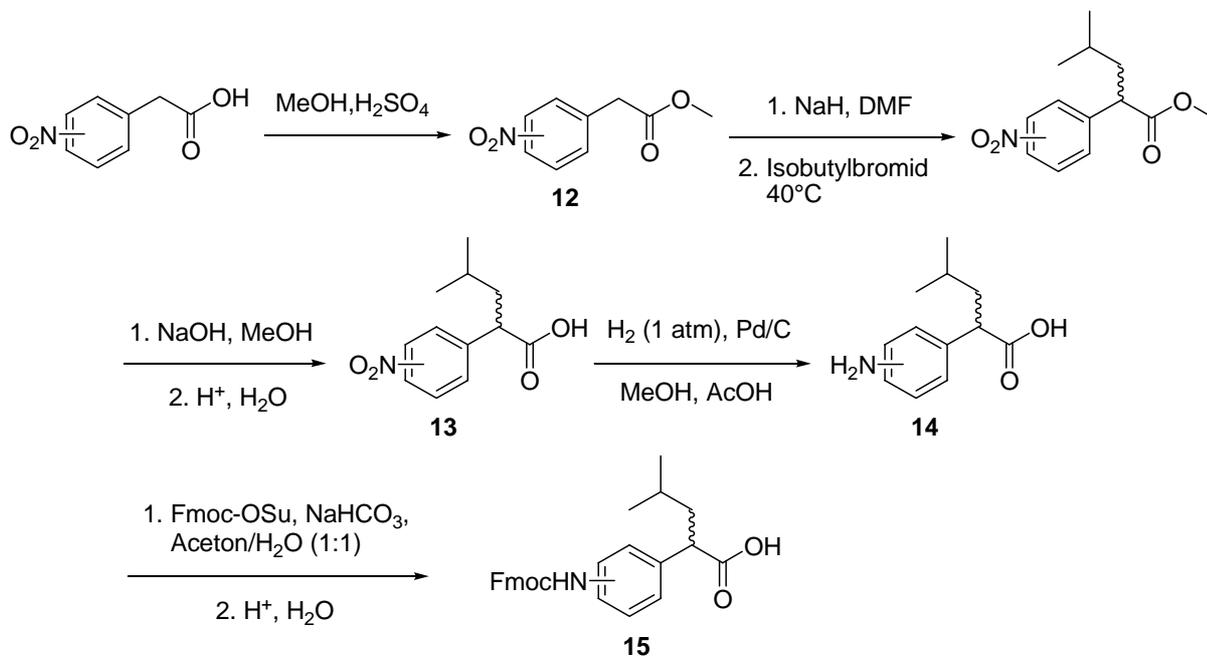


Abbildung 4.13: Synthese der *N*-Fmoc-(Aminophenyl)-essigsäure-Bausteine für die Festphasensynthese.

Die Festphasensynthese wurde an mit *N*-Fmoc- β -Phenylalanin belegtem Wang-Harz nach der Fmoc-Strategie durchgeführt.²⁵¹ *N*-Fmoc- β -Phenylalanin wurde über eine Fmoc-Schützung der kommerziell erhältlichen β -Aminosäure hergestellt. Nach der Kupplung der beschriebenen Bausteine **15** wurde eine kleine Bibliothek durch nukleophile aromatische Substitution mit einer Auswahl verschieden substituierter Pyridine in DMF bei 70°C über 12 Stunden synthetisiert (Abb. 4.14).²⁵² Dazu wurde das Harz in Glasreaktoren überführt, um das Arbeiten unter höheren Temperaturen zu gewährleisten. Die Verwendung von einem Wang-*linker* ist obligatorisch, da der temperaturlabile TCP-*linker* unter den für die Substitution benötigten Bedingungen nicht stabil war. Die S_N -Reaktion am Aromaten verlief nur mit stark elektronenarmen Verbindungen zufriedenstellend und erforderte die Verwendung Nitro-substituierter Verbindungen.

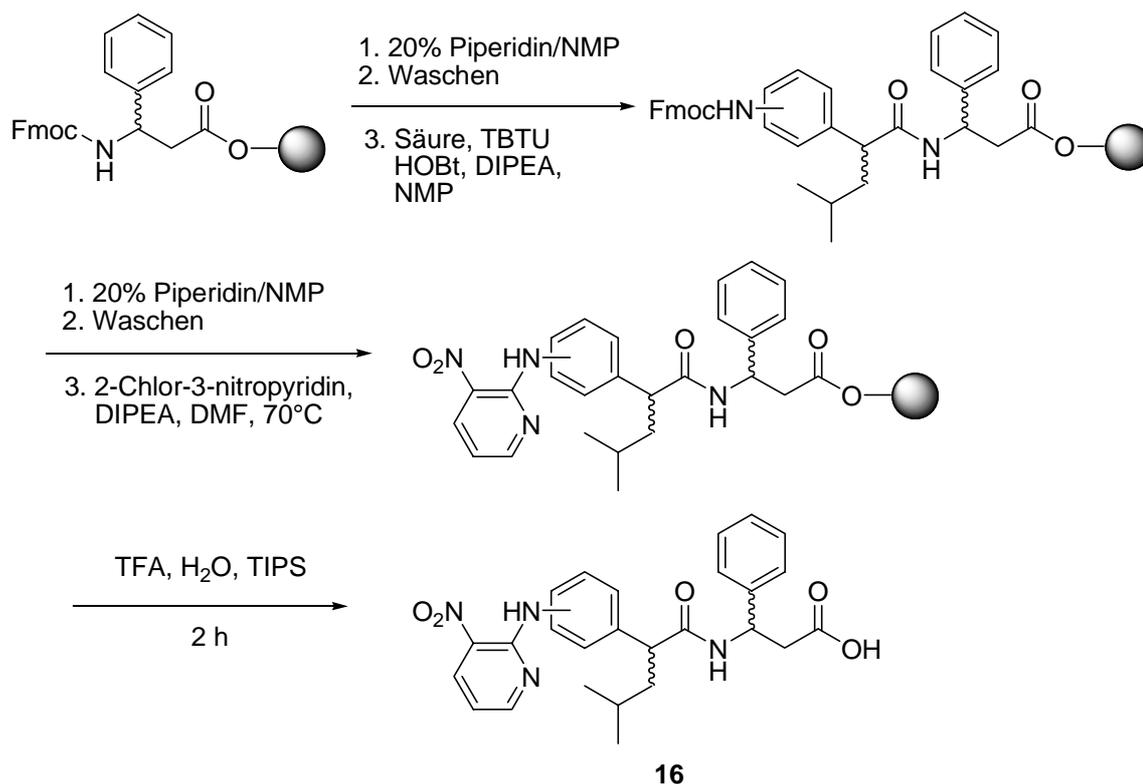


Abbildung 4.14: Festphasensynthese der N-terminal-modifizierten Integrinliganden **16**.

Da Nitrogruppen im allgemeinen pharmakologisch bedenklich sind, sollten sie anschließend in 3-Phenyl-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-one überführt werden.²⁵³ Dazu wurde die Nitrogruppe mit Zinn(II)chlorid in DMF bei Raumtemperatur zum Amin reduziert, welches anschließend an der festen Phase mit Triphosgen zyklisieren sollte (Abb. 4.15). Die Reaktion mit Aldehyden zu 3*H*-Imidazo[4,5-*b*]pyridin-Derivaten verlief mit sehr geringen Ausbeuten. Bei der Verwendung von NH₂-Leucin bei der nucleophilen aromatischen Reaktion konnte auf Grund der Instabilität des Produkts bei der sauren Abspaltung kein Produkt isoliert werden.

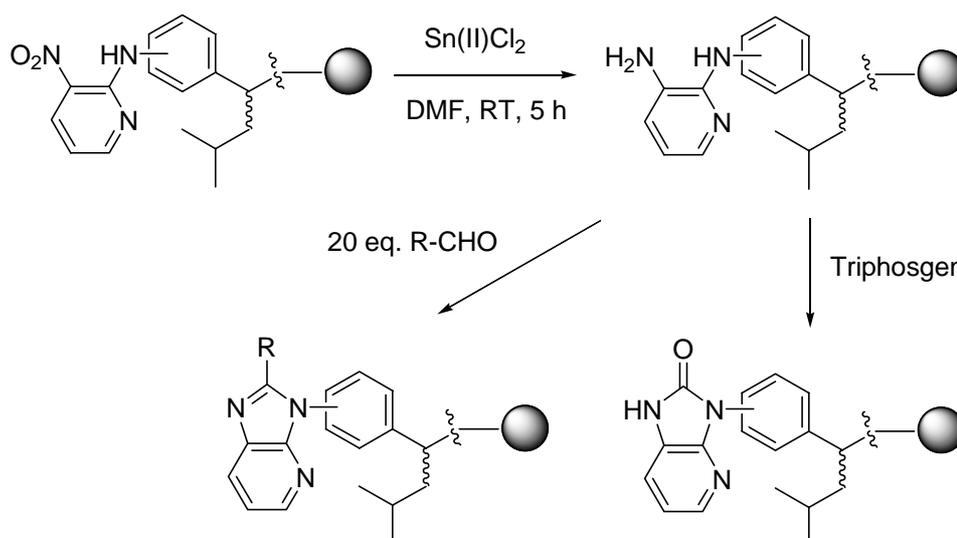


Abbildung 4.15: Festphasensynthese verschiedener heterozyklischer Verbindungen.

4.2.3 Hydroxy-phenylessigsäuren als Bausteine für Peptidmimetika

Nach den viel versprechenden Ergebnissen bei der Synthese der beschriebenen Phenylessigsäurederivate als Ersatz für die *N*-terminale Amidbindung wurde versucht, die Aminfunktionalität am Anilinbaustein aus Gründen der Bioverfügbarkeit aus dem Zielmolekül zu entfernen. Eine verringerte Löslichkeit scheint auf Grund der polaren, sekundären Aminofunktion unwahrscheinlich. Außerdem kann man die Bildung von schwerlöslichen Zwitterionen wegen der zweiten Aminfunktion am Pyridinring ausschließen. Trotz dieser vorteilhaften pharmakologischen Eigenschaften ist jedoch die Verwendung von Nitrogruppen nicht unbedenklich. Ebenfalls ist das Vermeiden aromatischer Amingruppen aus pharmakologischer Sicht wünschenswert, da die Toxizität von Anilinen im Metabolismus eine nicht zu vernachlässigende negative Begleiterscheinung ist.

Da sich das ausgedehnte aromatische System am *N*-Terminus als essentiell für die Aktivität der zu untersuchenden Verbindungen erwiesen hatte, wurde nach einem Weg gesucht, den Phenylessigsäurebaustein mit aromatischen Resten zu modifizieren. Weil ein Einfluss der als *linker* benutzten Aminbindung nicht bekannt ist, wäre ein annähernd isosterer Ersatz derselben in zweierlei Hinsicht interessant, da z.B. die planare Geometrie einer Amidbindung eventuell einen unterschiedlichen strukturellen Einfluss besitzen würde und die freie Drehbarkeit zu weit einschränken könnte. Die Oxymethyleneinheit ($-\text{CH}_2\text{-O}-$) stellt ein flexibles Verbindungsstück dar, welches in diesem Fall das Aminbindungssurrogat von Phenyl-Benzylethern imitiert (Abb. 4.16).

Die Methode der Wahl zur Generierung von Benzylethern ist die Alkylierung von Phenolen mit Benzylbromiden.

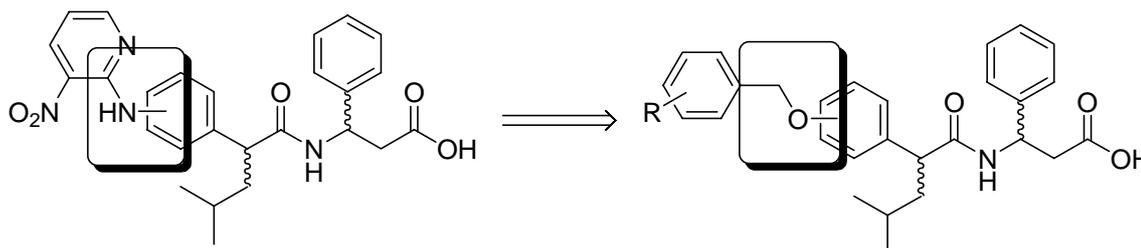


Abbildung 4.16: Substitution von *N*-substituiertem Anilin durch Benzylether.

Hydroxy-phenyllessigsäuren sind in *meta*- und *para*-Substitutionsmuster kommerziell erhältlich. Der zuerst dargestellte Methylester **17** wurde im Anschluß an die Alkylierung der phenolischen Hydroxygruppe mit 1-(Bromomethyl)-Aryl-Verbindungen mit NaH deprotoniert und anschließend mit Isobutylbromid in α -Position zur Carboxylgruppe alkyliert. Die nukleophile Substitution mit Benzylbromiden in siedendem Aceton unter Zusatz von Kaliumcarbonat als Base und einer katalytischen Menge Kaliumiodid hat sich als vorteilhafter erwiesen als die ursprünglich gewählte Route der Substitution in DMF. Der Methylester **19** wurde daraufhin basisch hydrolisiert und die entstandene freie Säure unter Standardbedingungen an 3-Amino-3-aryl-propionsäuremethylester (**20**) gekuppelt.²⁵⁴ Dieser wurde über eine *Radionov*-Reaktion aus Malonsäure und 4-Methylbenzaldehyd hergestellt.²⁵⁵ Anschließend wurde die Carbonylfunktion mit SOCl₂/MeOH als Methylester geschützt, beide Fragmente gekuppelt und im letzten Schritt durch Hydrolyse des Esters zur Zielverbindung **21** entschützt (Abb. 4.17).

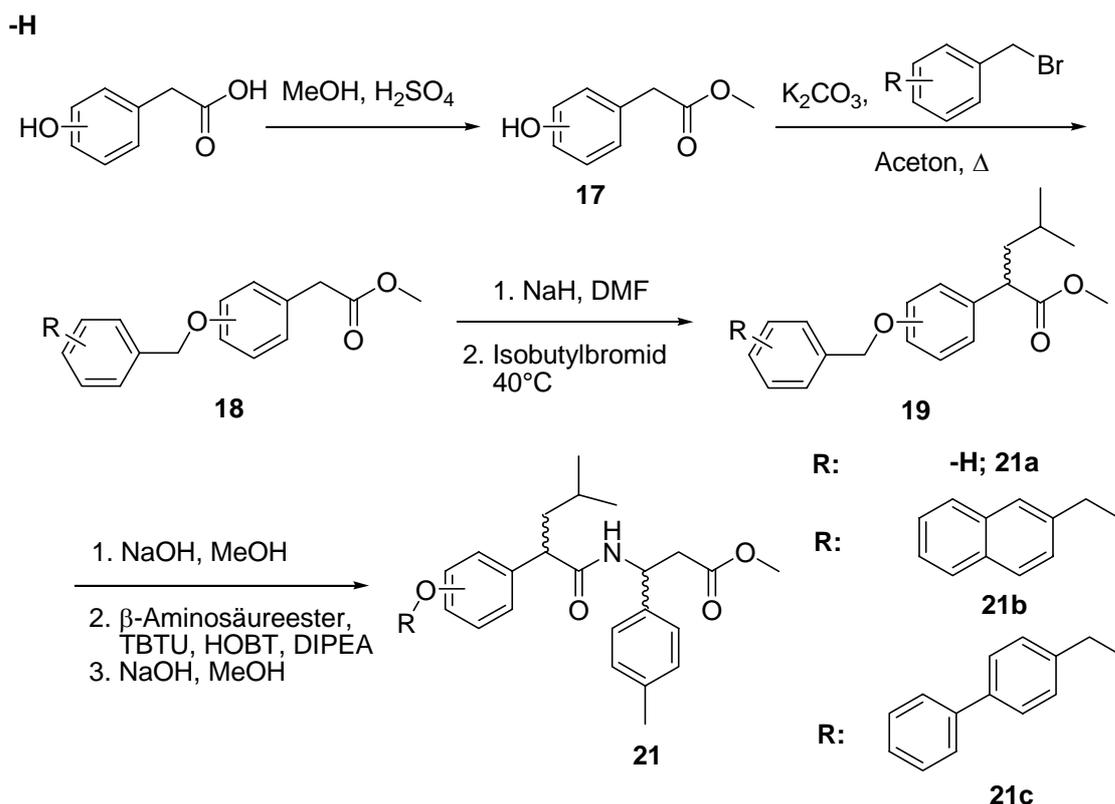


Abbildung 4.17: Synthese von Benzylphenylethern als $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden.

Von diesen wurden jedoch nur zwei Verbindungen **21a,b** zur biologischen Evaluierung in Betracht gezogen, da die geringe Löslichkeit der Verbindungen auf Grund der großen hydrophoben Reste einen biologischen Test nicht ermöglichte. Die Synthese wird nur wegen der Vollständigkeit erwähnt und um zu verdeutlichen, dass ein hydrophober aromatischer Rest - nicht wie angenommen - zur Aktivitätssteigerung beiträgt. Um eine abschließende Bewertung dieser Substanzklasse abzugeben, sollte über die Synthese von löslicheren Verbindungen, z.B. durch Verwendung von Pyridinen als aromatische Gruppe nachgedacht werden.

4.2.4 Indolizine als Peptid-Analoga

Im Verlauf dieser Arbeit wurde der *N*-Terminus mit einer Vielzahl von aromatischen Heterozyklen modifiziert. Dabei fiel die Wahl unter anderem auch auf Indolizine, die als Bestandteil von Medikamenten bereits verwendet werden.^{256,257} Außerdem galt der Entwicklung von kleinen, wirkstoffbasierten Molekülen, welchen eine gute Bioverfügbarkeit zugeschrieben werden kann, eine besondere Rolle. Auf der Suche nach einem interessanten molekularen Grundgerüst zur Synthese einer kleinen kombinatorischen Datenbank an der festen Phase wurde die Aufmerksamkeit auf die

[3+2]-Cycloaddition^{258,259} von Pyridiniumyliden an elektronenarme Alkene gelenkt.²⁶⁰⁻²⁶³ Die Indolizin-Chemie in Lösung ist weit verbreitet und ist insbesondere im Hinblick auf ihre hohen Ausbeuten unter milden Bedingungen attraktiv.^{256,257,264,265} Der Indolizin-Rest bietet außerdem die Möglichkeit, bereits bei der Synthese leicht modifiziert zu werden. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die biologische Aktivität mit der Beschaffenheit, insbesondere mit der räumlichen Ausdehnung des aromatischen Systems am *N*-Terminus, korreliert. Die Indolizine erlauben die Einführung von hydrophilen Substituenten, welche deutlich zur verbesserten Löslichkeit beitragen sollten. Ein unterschiedlich substituierter Pyridinring ist jeweils Startpunkt der Synthese (Abb. 4.18).

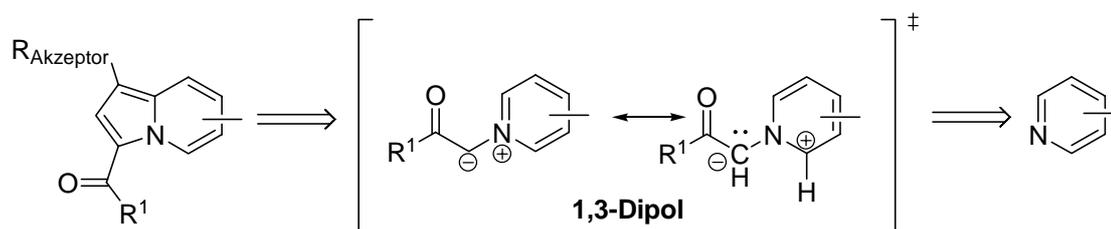


Abbildung 4.18: Synthese von Indolizinen durch [3+2]-Cycloaddition unter Verwendung von Pyridiniumyliden.

Als Leitstruktur diente das im Arbeitskreis entwickelte Dipeptid **10** mit der Isochinolincarbonsäure am *N*-terminalen Ende. Die Festphasensynthese wurde mit *N*-Fmoc- β -Phenylalanin belegtem TCP-Harz nach der Fmoc-Strategie durchgeführt.²⁵¹ Nach der Kupplung von *N*-Fmoc-Leucin und anschließender Abspaltung der Schutzgruppe wurde an das *N*-terminale Ende unter Standardkupplungsbedingungen sowohl Nicotin- als auch Isonicotinsäure gekuppelt.²⁵¹ Zur Synthese der Indolizine wurde das Harz in Glasreaktoren überführt, um das Arbeiten unter erhöhter Temperatur zu ermöglichen. Zu Beginn der Reaktion wurden die Pyridiniumsalze **24** durch die Reaktion von α -Bromessigsäureestern mit den Pyridinen in DMF über eine Quarternisierung am Stickstoffatom synthetisiert. Durch Zugabe von Triethylamin als Base nach dem Waschen erhielt man *in situ* Pyridiniumylide, welche auf Grund ihrer 1,3-dipolaren Struktur [3+2]-Cycloadditionen mit elektronenarmen Alkenen eingehen konnten. Die Reaktion mit Acrylnitril in DMF bei 60°C für 1 Stunde führte zu Tetrahydroindolizinen in guten Ausbeuten, wobei die Cycloaddition regioselektiv in Übereinstimmung mit den elektronischen Effekten verläuft. Im nächsten Schritt wurden die Tetrahydroindolizine durch Oxidation aromatisiert. Unter Verwendung des bimetalischen Komplexes TPCD $[\text{Co}(\text{pyridin})_4\text{HCrO}_4]_2$ als Oxidationsmittel bei 80°C in DMF gelang die Synthese der Indolizine **25** in einem Schritt (Abb. 4.19).^{266,267}

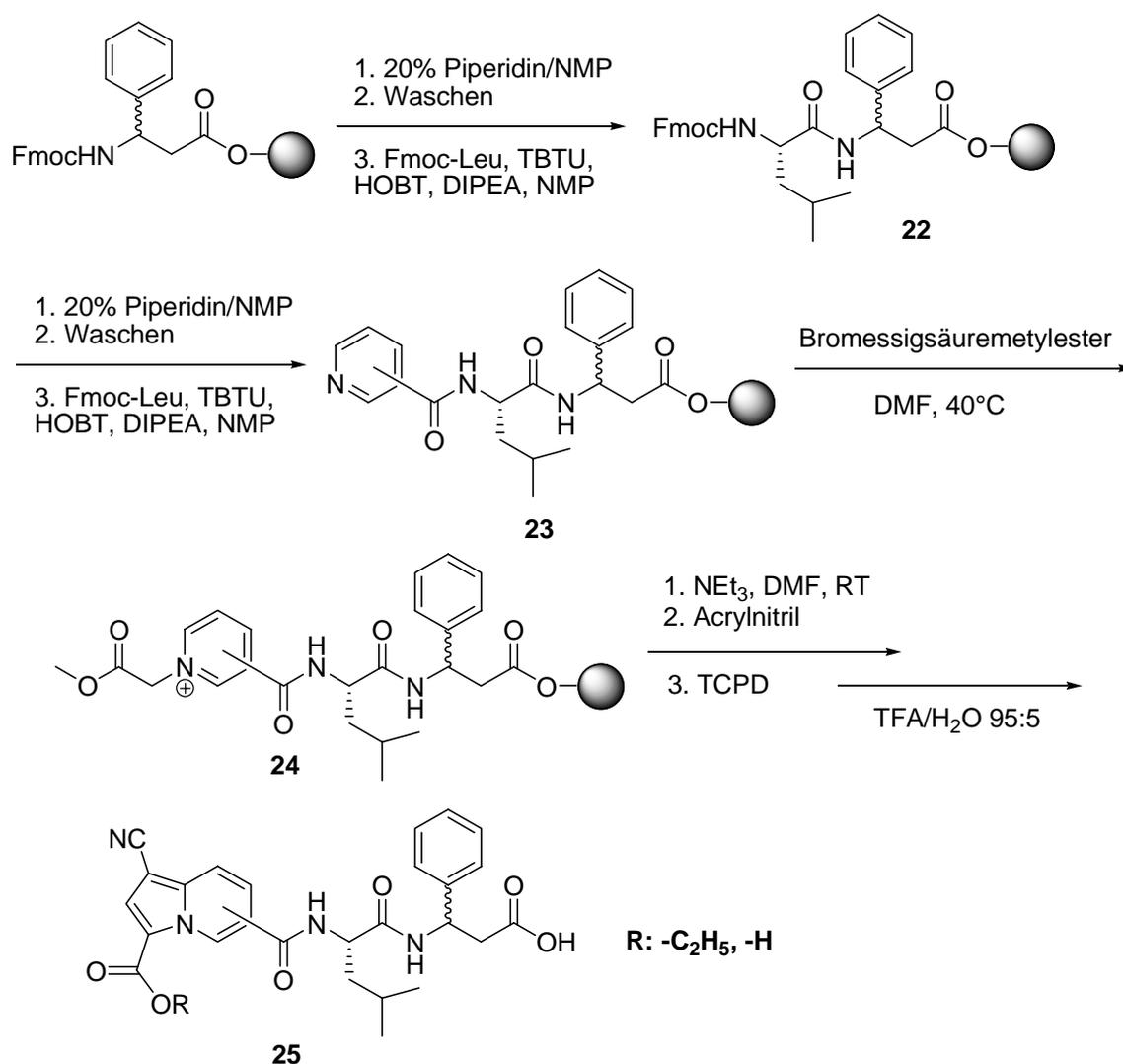


Abbildung 4.19: Darstellung der Indolizine **25** an der festen Phase.

Die Quarternisierung sowohl von Nicotin-, als auch Isonicotinsäure führte in quantitativen Ausbeuten zu den gewünschten Pyridiniumsalzen, während bei der Reaktion mit Picolinsäure vermutlich wegen sterischer Hinderung keine Umsetzung beobachtet werden konnte. Die Verwendung von Fumar- und Maleinsäureester als elektronenarme Alkene führte zu keinem Produkt in den benötigten Ausbeuten. Jedoch konnte man der Reaktionskontrolle über analytische HPLC nach Abspaltung vom Harz unter Standard-Rink-Amid-Bedingungen entnehmen, dass die Cycloaddition stattgefunden hat, da das Edukt nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Wahrscheinlich verlief die Oxidation der Tetrahydroindolizine zu den Indolizinen unvollständig, da die reduzierten Tetrahydroindolizine unter den sauren Abspaltungsbedingungen nicht stabil sind. Die Reaktion mit 1-Methyl-1*H*-pyrrol-2,5-dion (Maleinimid) lieferte das gewünschte Produkt auch nur in sehr geringen Ausbeuten (Abb. 4.20). Die Verwendung der Pyridiniumsalze, welche aus der

Reaktion von Pyridinderivaten mit α -Bromessigsäureestern hervorgingen, als 1,3-Dipole in einer [3+2]-Cycloaddition veranlasste uns dazu, heterozyklische *N*-Oxide von den oben genannten Pyridinderivaten einzusetzen. Das *N*-Oxid wurde dabei durch Oxidation des Pyridinstickstoffes mit *meta*-Chlorperoxybenzoesäure in DCM über 20 Stunden bei Raumtemperatur an der festen Phase generiert.²⁶⁸ Die [3+2]-Cycloaddition dieses 1,3-Dipols konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 4.20).

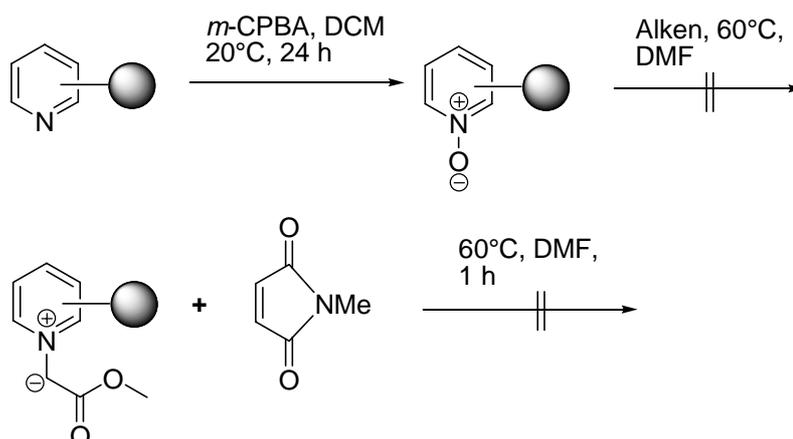


Abbildung 4.20: Verwendung von heterozyklischen *N*-Oxiden als 1,3-Dipole.

Wie bereits zuvor erwähnt, kann man eine Amidbindung durch Surrogate ersetzen, die deren planare Struktur nachahmen. In Analogie dazu erscheint die Verwendung von 2-(Pyridin-4-yl)-essigsäure als Baustein sinnvoll, welche in α -Position zur Carbonylgruppe substituiert werden kann und die Möglichkeit bietet, eine Amidbindung im Rückgrat des biologisch aktiven Peptids **10** zu ersetzen. Die substituierten 2-(Pyridin-4-yl)-essigsäurederivate dienen anschließend als 1,3-Dipole bei der [3+2]-Cycloaddition zu den Indolizinen (Abb. 4.21).

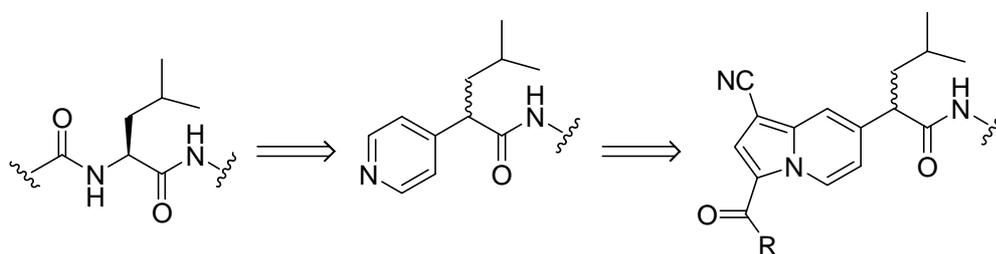


Abbildung 4.21: Substituierte Indolizine als Template zum Ersatz einer Amidbindung.

Der zuerst dargestellte Methylester **26** wurde nach der Alkylierung mit Isobutylbromid in α -Position im Anschluß an die Deprotonierung mit Natriumhydrid wiederum sauer

verseift. Die freie substituierte 2-(Pyridin-4-yl)-essigsäure (**28**) wurde dadurch für die Festphasensynthese zugänglich gemacht (Abb. 4.22).

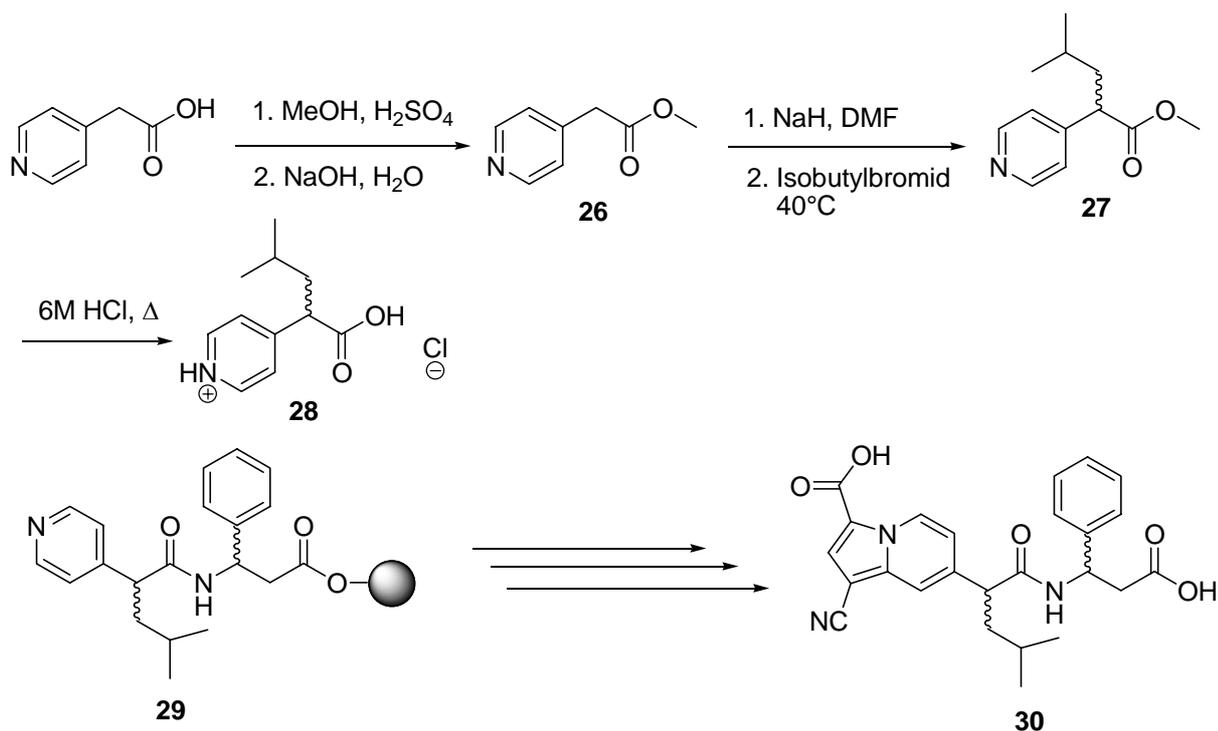


Abbildung 4.22: Substituierte 2-(Pyridin-4-yl)-essigsäure (**27**) als Templat für N-terminal modifizierte $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden mit Indolizin-scaffold.

Die [3+2]-Cycloaddition an der festen Phase bot eine gute Möglichkeit, eine kleine Bibliothek aufzubauen. Im nächsten Schritt sollte die planare Amidbindung ebenfalls durch ein aromatisches System ersetzt werden. Die Verwendung von (Pyridin-3-yloxy)-Derivaten verlängert jedoch das Amidrückgrat um eine zur Methylengruppe (-CH₂-) isostere Etherinheit und damit um eine weitere rotierbare Bindung (Abb. 4.23). Eine enantioselektive Synthese des Leucinsurrogates wurde wünschenswert, da Leucin offensichtlich bei den natürlichen Liganden in der L-Konfiguration vorliegt. Die 3-Amino-3-aryl-propionsäure wurde weiterhin racemisch eingesetzt und erlaubt somit keine Aussage über die biologisch aktive Konformation am C-3 Atom.

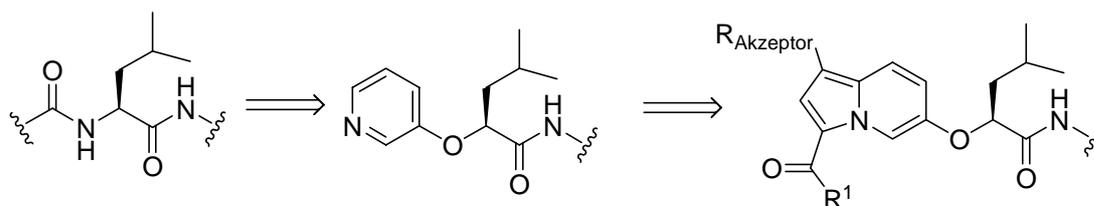


Abbildung 4.23: (Pyridin-3-yloxy)-Derivate ersetzen die planare Amidbindung.

Startverbindung für die Synthese von 4-Methyl-2-(pyridin-3-yloxy)-pentansäure (**34**) war D-Leucin, welches über eine nukleophile Substitution unter doppelter Inversion in Eisessig nach Diazotierung mit Natriumnitrit in (D)-O-Acetyl-Leucin-OH (**31**) überführt wurde. Der zunächst dargestellte *tert*-Butylester **32** wurde im Anschluß an die Veresterung mit wässriger Kaliumcarbonat-Lösung regioselektiv deacetyliert.²⁶⁹ Die erhaltene Verbindung **33** wurde daraufhin über eine *Mitsunobu*-Reaktion mit 3-Hydroxy-pyridin in die gewünschte (Pyridin-3-yloxy)-Verbindung **34** überführt (Abb. 4.24). Die Verwendung von 2-Hydroxy-pyridin in der *Mitsunobu*-Reaktion führte ausschließlich zur Alkylierung am Stickstoff des Pyridinringes. Die Spaltung des *tert*-Butylesters machte die freie Säure **34** für die Festphasensynthese zugänglich. Die Synthese der Indolizine wurde analog zu den oben beschriebenen Verbindungen durchgeführt. Die Verwendung von Acrylnitril als elektronenarmes Alken in der [3+2]-Cycloaddition zu den Indolizinen lieferte die gewünschten Zielverbindungen **35 a,b,c** in guten Ausbeuten.

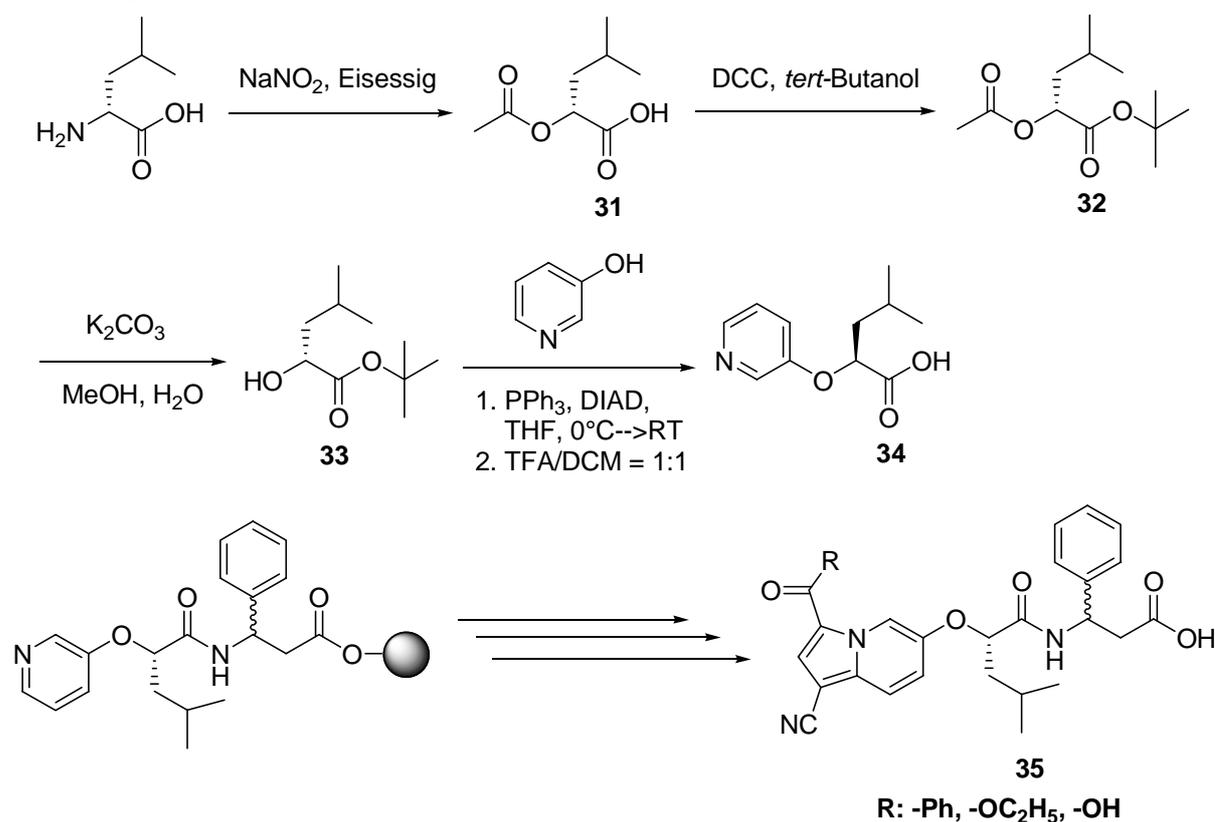


Abbildung 4.24: 4-Methyl-2-(pyridin-3-yloxy)-pentansäure (**34**) als Templat für Liganden mit Indolizin-Grundgerüst.

Zur Ausdehnung des aromatischen Systems erschien die Verwendung Pyridin-substituierter 4-Hydroxy-phenylessigsäure **38** sinnvoll, da die Pyridineinheit leicht über eine *Mitsunobu*-Reaktion mit (Pyridin-2-yl)-methanol an die phenolische

Hydroxygruppe gekuppelt werden kann. Der zuerst dargestellte Methylester **36** wurde nach der Alkylierung mit Isobutylbromid in α -Position im Anschluß an die Deprotonierung mit Natriumhydrid wiederum alkalisch verseift und lieferte somit das Edukt **38** für die Synthese der Indolizine an der festen Phase (Abb. 4.25). Die Amidbindung des Grundgerüsts wurde hierbei ebenfalls durch ein aromatisches Surrogat ersetzt. Das aromatische System konnte durch die Quarternisierung des Pyridinstickstoffs mit Bromacetophenon zusätzlich noch ausgedehnt werden.

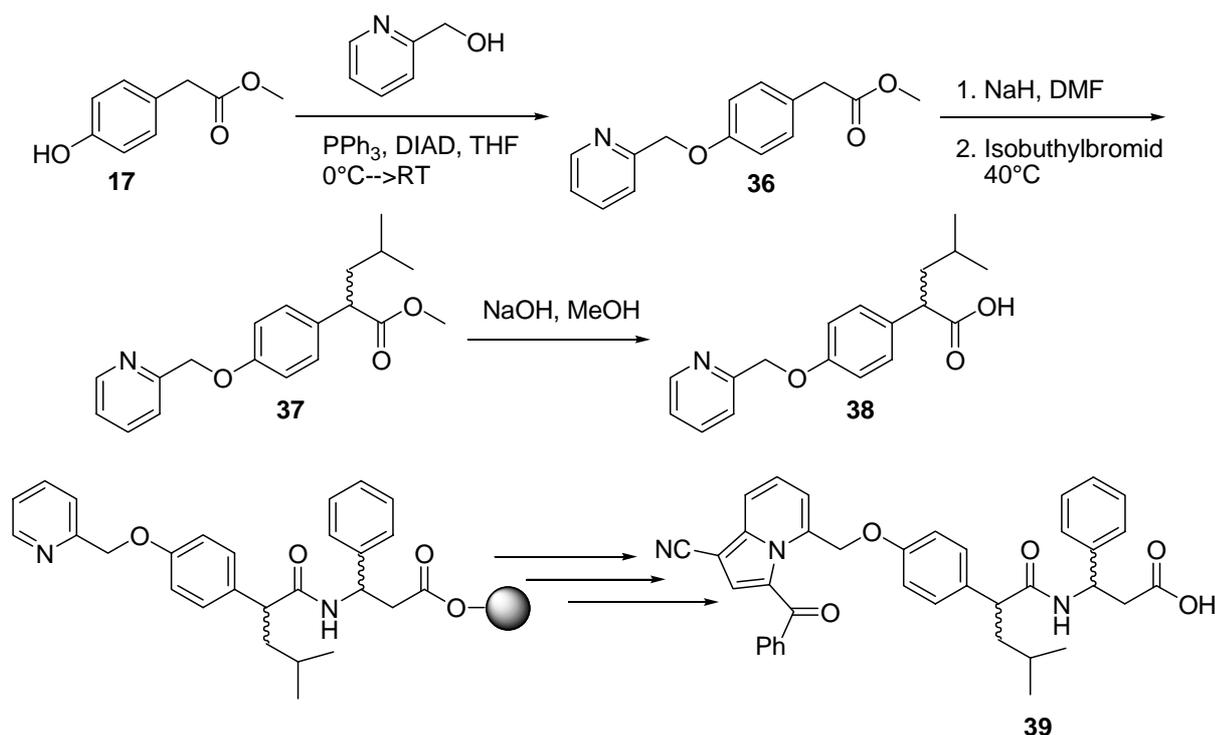


Abbildung 4.25: *Synthese eines ausgedehnten aromatischen Systems an dem Beispiel des Indolizin-scaffolds.*

4.2.5 3-Substituierte Indolizin-1-carbonitril-Derivate als Phosphatase-Inhibitoren

Da durch eine Kooperation mit H. Waldmann die Möglichkeit bestand, Verbindungen auf die Inhibierung von Phosphatasen zu testen, wurde die Aktivität einer Auswahl von Verbindungen auf dieses Zielproteine untersucht.

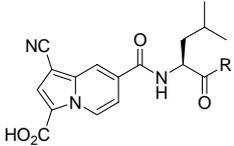
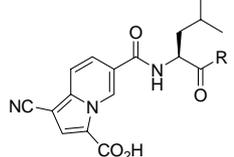
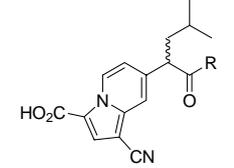
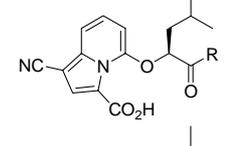
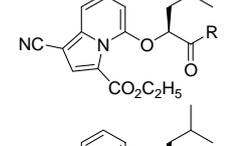
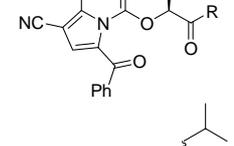
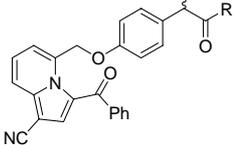
Proteinphosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-Reaktionen werden vom Organismus zur Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse verwendet. Störungen der Proteinphosphorylierung tragen zur Entwicklung vieler Krankheiten wie Krebs und Diabetis bei.²⁷⁰ Der Grad der Phosphorylierung wird durch Proteinkinasen (PK), welche die Phosphorylierung steuern, und für die Dephosphorylierung

verantwortlichen Proteinphosphatasen (PPs) reguliert. Den PKs kommt eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Medikamenten zu.²⁷¹⁻²⁷⁴ Proteinphosphatasen werden durch ihre Struktur und Substratspezifität in Serin/Threonin- (PSTPs) und Tyrosinphosphatasen (PTPs) klassifiziert. Die Entwicklung von niedermolekularen Inhibitoren der PTPs ist seit kurzem von Interesse^{275,276} als ein schnell wachsendes Gebiet in der klinischen Biologie und der medizinischen Chemie.²⁷⁷⁻²⁷⁹

Diese Entwicklung wurde zweifellos durch die Entdeckung ausgelöst, dass die Unterdrückung des *pt1b*-Genes in Mäusen Fettleibigkeit verhindert und die Empfindlichkeit gegenüber Insulin ohne Nebenwirkungen erhöht.^{280,281} Diese Beobachtungen machen *PTP1B* zu einem interessanten Ziel für die medizinische Chemie.²⁸² Tyrosinphosphatasen sind ausschlaggebend für die Toxizität von einigen krankheitserregenden Bakterien. Bakterien wie *Salmonella typhimurium* (Typhuserreger) und *Yersinia pestis* (Pesterreger) benutzen ihre eigenen Phosphatasen, um den Wirt zu infizieren oder dem Immunsystem zu entkommen.²⁸³ Die eingeschränkte Verbreitung zweier vermeintlicher Tyrosinphosphatasen (MPTPA und MPTPB), welche aus dem Genom des *Mycobacterium tuberculosis* geklont wurden, stellt diese als eine gute Erklärung für ihre Giftigkeit dar.²⁸⁴ Die doppelt-spezifische Phosphatase der *Cdc25*-Familie greift in den Zellzyklus ein, indem sie für die Dephosphorylierung der Cyclin-abhängigen Kinase, welche eine wichtige Rolle im eukaryotischen Zellzyklus spielt, verantwortlich ist.²⁸⁵ Die Überexpression von *Cdc25A* ist verantwortlich für die Malignität von Tumoren.^{286,287} Die *vaccina VH-1*-verwandte, doppelt spezifische Phosphatase VHR ist ein physiologischer Regulator der extrazellulär regulierten Kinasen der MAP-Kinasefamilie und ist dadurch an der Signalübertragung über den MAP-Kinaseweg beteiligt.^{288,289}

Die inhibitorischen Effekte einer repräsentativen Anzahl von Indolizinderivaten gegenüber verschiedenen Phosphatasen wurde in einem *in vivo* Test untersucht, dessen Ergebnisse in Tabelle 3 dargestellt werden. Die Enzymaktivität wurde über die Hydrolyse von *para*-Nitro-phenylphosphat in Standard-Pufferlösungen für *PTP1B*²⁹⁰ und VHR²⁹¹ bestimmt.

Tabelle 3: IC_{50} -Werte [μM] der Indolizinderivate für verschiedene Phosphatasen.

#	Struktur	Cdc25B	PTP1B	MPTPA	MPTPB	VHR
25a		> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
25b		> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
30		> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
35a		> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
35a Ester		> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
35b		70.7 ± 5.3	85.1 ± 7.2	> 100	22.0 ± 2.7	82.9 ± 3.9
39		69.2 ± 8.9	80.6 ± 5.2	74.9 ± 8.8	7.5 ± 1.9	77.8 ± 1.8

Die Verbindung mit dem 2-(4-((Pyridin-2-yl)methoxy)phenyl)-essigsäurerest **39** scheint ein nicht-ionischer Phosphotyrosin-Ersatz zu sein, wobei das peptidische Grundgerüst, welches die Alkylseitengruppen trägt, hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Enzym eingehen kann.^{292,293} Das 5-(Phenoxymethyl)-indolizin-Grundgerüst ist nicht allein für die Aktivität verantwortlich, scheint aber gegenüber den anderen Grundgerüsten bevorzugt zu sein, da Verbindung **35b**, welche einen Indolizin-5-ol-Rest trägt, ebenfalls Aktivität zeigt. Ein Benzoylsubstituent in der 3-Position der Indolizin-1-carbonitrilderivate trägt entscheidend zur Aktivität bei. Zusammenfassend kann man sagen, dass die 3-substituierten Indolizin-1-carbonitrile **35b** und **39** ein bislang nicht bekanntes, Phosphatase hemmendes Grundgerüst darstellen.

4.2.6 Synthese von heterozyklischen Arylessigsäuren

Die viel versprechenden Ergebnisse der beschriebenen Phenylelessigsäurederivate und Indolizine als Ersatz für die *N*-terminale Amidbindung rückte die Verwendung anderer aromatischer Surrogate in den Vordergrund. Da sich ein relativ ausgedehntes aromatisches System am *N*-Terminus als essentiell für die Aktivität der zu untersuchenden Verbindungen erwiesen hatte, die Verbindungen aber dennoch nicht zu hydrophob sein sollten, wurde das Augenmerk auf arylsubstituierte Heteroaromaten gelenkt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Verbindungen synthetisiert, die als Bausteine für Peptidmimetika dienen. Als erstes soll die Verwendung von 2-substituierten Indolessigsäuren dargestellt werden. Im Fall der Indolessigsäurederivate ersetzt der Pyrrolrest die planare Amidbindung, während der Phenylrest die Rolle des aromatischen Substituenten übernimmt (Abb. 4.26).

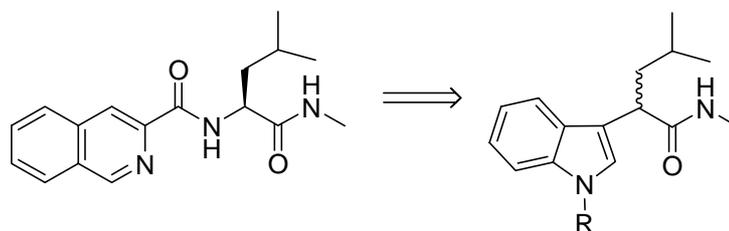


Abbildung 4.26: Indolessigsäure-Derivate ersetzen die planare Amidbindung.

Formal lässt sich die Darstellung der Zielverbindung 2-(1*H*-Indol-3-yl)-4-methylpentansäure (**42**) durch eine Alkylierung von kommerziell erhältlicher (1*H*-Indol-3-yl)-essigsäure beschreiben. Davon ausgehend erfolgt die Darstellung von (1*H*-Indol-3-yl)-essigsäuremethylester (**40**). Wurde (1*H*-Indol-3-yl)-essigsäure in Methanol unter Zusatz einer geringen Menge konzentrierter Schwefelsäure über einen Zeitraum von 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt, erhielt man nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung (1*H*-Indol-3-yl)-essigsäuremethylester (**40**). Die Einführung der Isobutylgruppe gelang durch Reaktion von (1*H*-Indol-3-yl)-essigsäuremethylester (**40**) in absolutem THF bei einer Temperatur von -78°C mit 2.05 Äquivalenten LDA, und Abfangen des generierten Enolats mit 1.3 Äquivalenten 1-Brom-2-methylpropan, wobei über einen Zeitraum von 2.5 Stunden unter Auftauen der Kältemischung gerührt wurde.²⁹⁴ Schließlich wurde der alkylierte Methylester **41** in die korrespondierende Carbonsäure **42** umgewandelt. Die Umsetzung von 2-(1*H*-Indol-3-yl)-4-methylpentansäuremethylester (**41**) mit 2.5 Äquivalenten Kaliumhydroxid in Methanol über Nacht bei Raumtemperatur führte nach wässriger saurer Aufarbeitung zur Bildung von 2-(1*H*-Indol-3-yl)-4-methylpentansäure (**42**) (Abb. 4.27). Eine weitere Aufreinigung war nicht erforderlich.

Durch Methylierung am NH-Stickstoff des Indols konnte zusätzlich die Wasserstoff-Donor-, Akzeptor-Eigenschaft variiert werden.

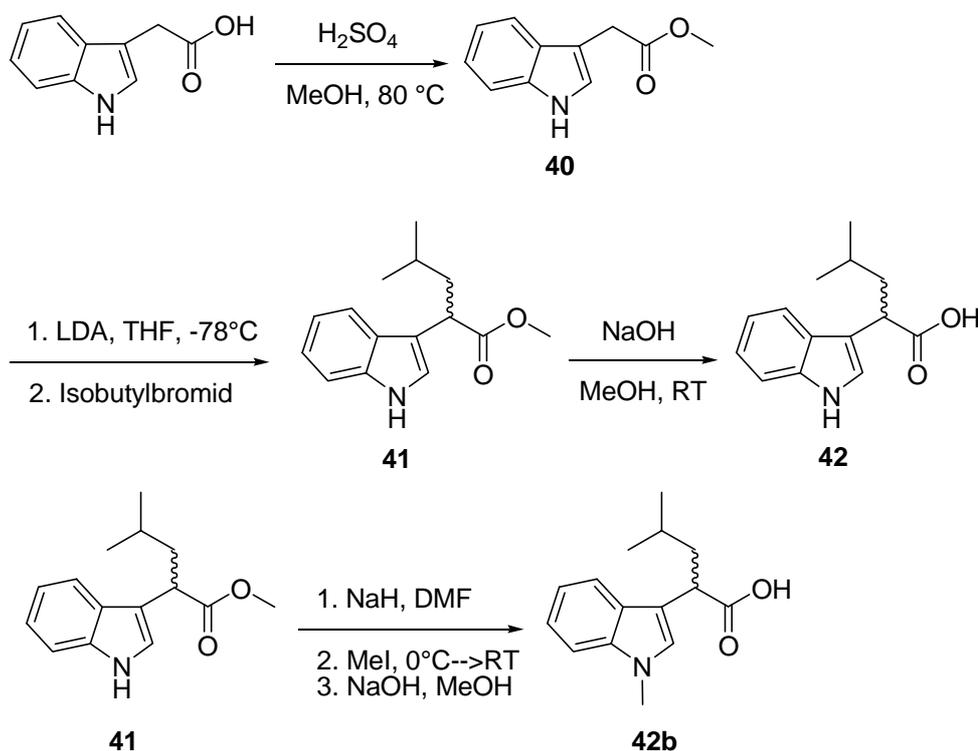


Abbildung 4.27: Darstellung von 2-(1H-Indol-3-yl)-4-methylpentansäure (**42**).

Nach Schützen des aciden NH-Protons als *tert*-Butylcarbammat (Boc) und anschließender Deprotonierung mit LDA, führte die Alkylierung des Enolats des Indolessigsäuremethylesters (**40**) ebenfalls zu der Boc-geschützten Zielverbindung, jedoch in deutlich schlechteren Ausbeuten und mit Nebenprodukten. Der Versuch der Alkylierung des ungeschützten Indols nach Deprotonierung mit NaH in DMF führte ausschließlich zum *N*-alkyliertem Produkt. Überraschenderweise konnte nach Deprotonierung der Boc-geschützten Verbindung **43** mit Natriumhydrid in Analogie zu den Hydroxyphenylessigsäuren das Produkt mit geringerer Ausbeute erhalten werden (Abb. 4.28).

Zur Einschränkung der freien Drehbarkeit des Aromaten sollte die analoge 2-substituierte 2-(2-Methyl-1H-indol-3-yl)-essigsäure hergestellt und in die Liganden eingebaut werden. Der Methylrest wurde über eine *Fischer*-Indol-Synthese aus Phenylhydrazin und Ethyllävulinat in siedendem Ethanol unter Säurekatalyse eingeführt.²⁹⁵ Anschließende Alkylierung des Enolats nach der oben beschriebenen, optimierten Methode führte jedoch nur zur Isolierung des gewünschten Produkts in sehr geringeren Ausbeuten und zum Ausschluss dieses Syntheseziels. Dieses Ergebnis kann vermutlich durch die CH-acide Position des Methylsubstituenten erklärt werden.

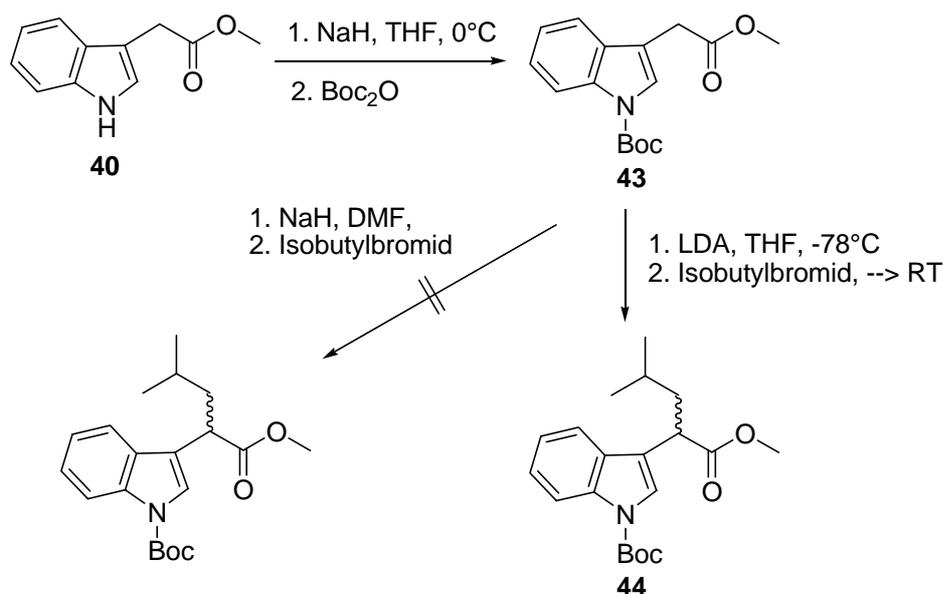


Abbildung 4.28: Weitere Möglichkeiten zur Alkylierung der Indolessigsäure.

Als nächstes Surrogat für die Amidbindung wurde 2-(1*H*-Pyrrol-3-yl)-essigsäure ausgewählt, die durch Einführung eines Benzoylsubstituenten in 5-Position den Erfordernissen gerecht werden sollte (Abb. 4.29).

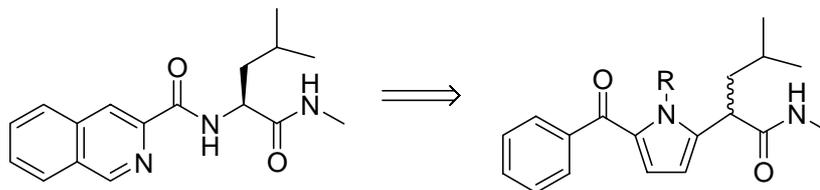


Abbildung 4.29: 2-(1*H*-Pyrrol-3-yl)essigsäure-Derivate als Surrogat für die Amidbindung.

Der 2-(1*H*-Pyrrol-3-yl)-essigsäuremethylester wurde über die nucleophile Substitution des Magnesiumbromid-Salzes von Pyrrol, welches durch Deprotonierung von Pyrrol mit Ethylmagnesiumbromid generiert werden kann, an Bromessigsäureethylester erhalten.²⁹⁶ Anschließend sollte die Verbindung mit Benzoylchlorid in 2-Position des Pyrrolringes unter Verwendung von AlCl_3 als Katalysator acyliert werden. Auf Grund der schlechten Ausbeuten bei der Acylierung des Pyrrols, welche wahrscheinlich auf die Koordination an den Ester zurückzuführen waren, erschien ein anderer Syntheseweg sinnvoll, welcher von Phenyl-(1*H*-pyrrol-2-yl)-keton (**45**) als Ausgangsverbindung ausgeht.

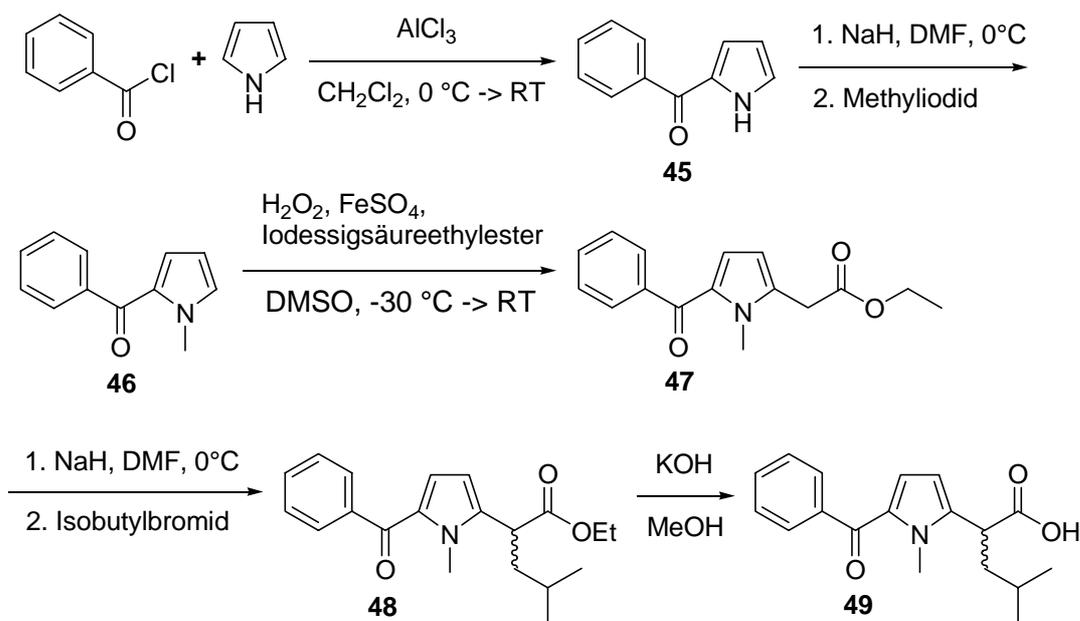


Abbildung 4.30: Synthese von 2-(5-Benzoyl-1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)-4-methylpentansäure (**49**).

Phenyl-(1H-pyrrol-2-yl)-keton (**45**) wurde ausgehend von käuflich erhältlichen Substanzen hergestellt. Hierzu wurde Pyrrol mit 2.0 Äquivalenten Aluminiumtrichlorid in absolutem DCM bei einer Temperatur von -10°C mit 1.5 Äquivalenten Benzoylchlorid versetzt und über einen Zeitraum von 2.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.²⁹⁷⁻²⁹⁹ Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung erhielt man Phenyl-(1H-pyrrol-2-yl)-keton (**45**) als zähflüssige Substanz in befriedigender Ausbeute. Es folgte eine Methylierung am Stickstoffatom. Phenyl-(1H-pyrrol-2-yl)-keton (**45**) wurde mit 1.1 Äquivalenten Natriumhydrid in absolutem DMF und 1.3 Äquivalenten Iodmethan bei einer Temperatur von 0°C versetzt und über einen Zeitraum von 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Wässrige Aufarbeitung und säulenchromatographische Reinigung lieferte (1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)-phenylketon (**46**). Eine Methode zur Synthese von α -Heteroarylessigsäureestern durch homolytische Substitution an fünfatomigen Heteroaromaten durch elektrophile Kohlenstoffradikale wurde in der Literatur beschrieben.^{300,301} In Anlehnung an diese Literaturvorschrift wurde (1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)-phenylketon (**46**) regioselektiv in der 5-Position des substituierten Pyrrolringes alkyliert. Die Umsetzung von (1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)-phenylketon (**46**) mit 0.5 Äquivalenten Iodessigsäureethylester (**50**) unter Zusatz katalytischer Mengen Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat sowie eines Überschusses an Wasserstoffperoxid in DMSO bei einer Temperatur von -30°C und Rühren über einen Zeitraum von 3 Stunden bei Raumtemperatur führte zur Bildung von (5-Benzoyl-1-

methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-essigsäureethylester (**47**). Des Weiteren wurden 82% des in einfachem Überschuss eingesetzten Edukts (1-Methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-phenylketon (**46**) reisoliert (Abb. 4.30). Die Reaktion wird durch einen radikalischen Mechanismus beschrieben. Dabei wird das Radikal durch homolytische Spaltung der C-I-Bindung von Iodessigsäureethylester unter Verwendung des Oxidationsmittels Wasserstoffperoxid sowie Eisen(II)-Ionen in DMSO erzeugt.

Die homolytische Substitution erfolgt über eine reversible Addition des Radikals an die C-C-Doppelbindung des Pyrrols. Das Additionsprodukt wird durch die in der Radikalerzeugung entstandenen Eisen(III)-Ionen oxidiert, wobei die als Kettenträger fungierenden Eisen(II)-Ionen regeneriert werden. Nach der Abstraktion eines Protons entsteht der α -Heteroarylessigsäureester **47** (Abb. 4.31).

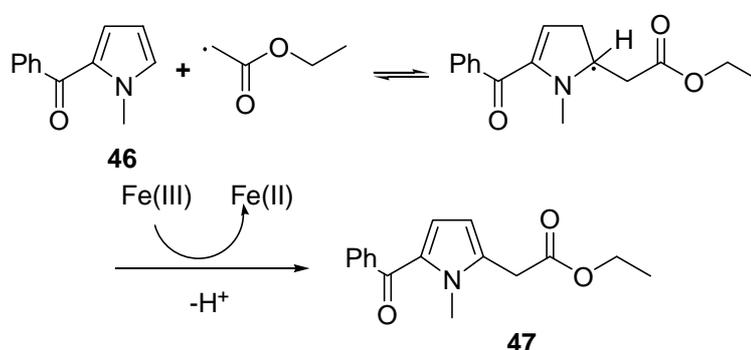


Abbildung 4.31: Mechanismus der radikalischen Substitution.

Der für die Synthese von (5-Benzoyl-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-essigsäureethylester (**47**) eingesetzte Iodessigsäureethylester (**50**) wurde aus seinem Chloranalogon hergestellt. Die Reaktion von Chloressigsäureethylester mit 1.3 Äquivalenten Natriumiodid in Aceton über Nacht bei Raumtemperatur lieferte nach wässriger Aufarbeitung ohne weitere Reinigung Iodessigsäureethylester (**50**) über eine *Finkelstein*-Reaktion in quantitativer Ausbeute.

Die Einführung der Isobutylgruppe gelang durch Reaktion von (5-Benzoyl-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-essigsäureethylester (**47**) in absolutem DMF bei einer Temperatur von 0°C mit 1.2 Äquivalenten Natriumhydrid und Abfangen des entstandenen Enolats mit 4.0 Äquivalenten 1-Brom-2-methylpropan, wobei über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung erhielt man 2-(5-Benzoyl-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-4-methylpentansäureethylester (**48**). Es folgte die Umwandlung des alkylierten Carbonsäureesters **48** in die entsprechende Carbonsäure **49** durch Hydrolyse mit KOH. Nach wässriger saurer Aufarbeitung erhielt man 2-(5-Benzoyl-1-methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-4-methylpentansäure (**49**) in quantitativer Ausbeute. Über keinen der oben beschriebenen Synthesewege ist es gelungen (5-Benzoyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-

essigsäureethylester ohne vorhergehende Methylierung des Pyrrolstickstoffs zu alkylieren.

Als nächstes Surrogat wurde 2-(Thiophen-2-yl)-essigsäure verwendet. Ein ausgedehntes aromatisches System wurde ebenfalls durch die Acylierung mit Benzoylchlorid erreicht (Abb. 4.32).

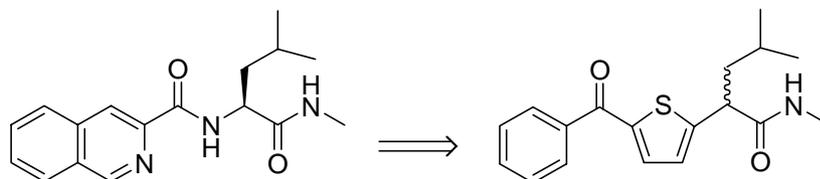


Abbildung 4.32: 2-(Thiophen-2-yl)-essigsäure-Derivat als Surrogat für die Amidbindung.

Zu Beginn der Synthese wurden Versuche durchgeführt, 2-(Thiophen-3-yl)-essigsäuremethylester nach Deprotonierung mit verschiedenen Basen - unter anderem mit Lithiumdiisopropylamid, Natriumhydrid und Natriummethanolat - unter Generierung des Enolats mit Isobutylbromid zu alkylieren. Die Deprotonierung führte jedoch jeweils zur Zersetzung der Ausgangsverbindung, welche über eine DC-Kontrolle während der Reaktion beobachtet werden konnte. Aus diesem Grund wurde die Synthese mit 2-(Thiophen-2-yl)-essigsäure fortgesetzt. Die Einführung des elektronenziehenden Benzoylrestes über eine *Friedel-Crafts*-Acylierung vor der Alkylierung am α -Kohlenstoffatom zur Carbonylgruppe war erforderlich. Die Bedeutung stark elektronenziehender Gruppen wird verdeutlicht durch den Versuch, die Alkylierung mit Brom-substituierten 2-(Thiophen-2-yl)-essigsäure-Derivaten zu ermöglichen. Die Alkylierung der Bromderivate führte ebenfalls zu keinem Produkt in isolierbaren Mengen. Auf Grund der schlechten Ausbeuten bei der Alkylierung der 2-(Thiophen-2-yl)-essigsäure, erschien ein anderer Syntheseweg, ausgehend von einem Phenyl-(thiophen-2-yl)-keton-Derivat **51** sinnvoll (Abb. 4.33).

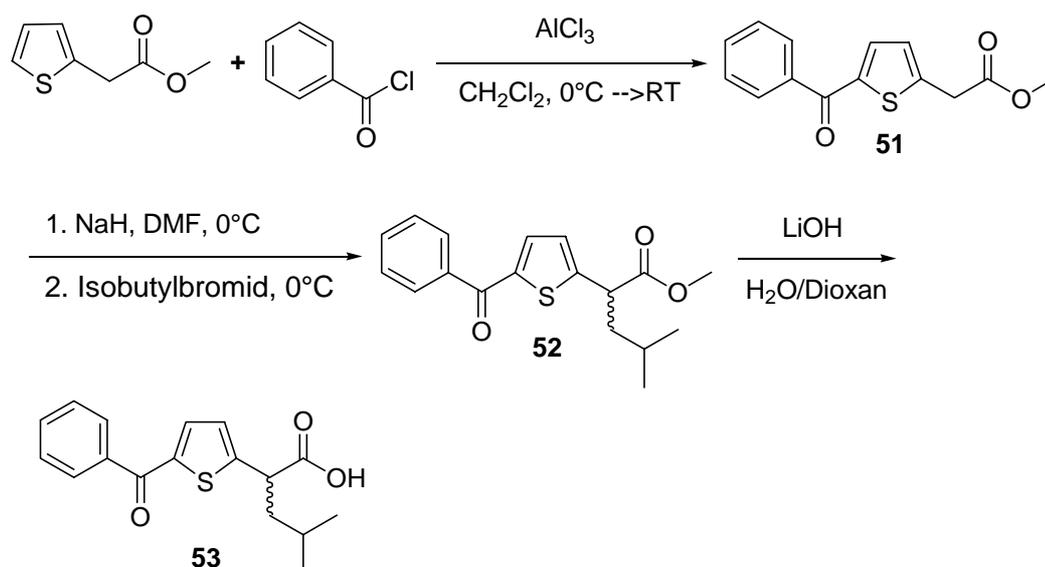


Abbildung 4.33: Synthese von 2-(5-Benzoyl-thiophen-2-yl)-4-methylpentansäure (**53**).

Phenyl-(thiophen-2-yl)-keton (**51**) wurde ausgehend von kommerziell erhältlichen Substanzen hergestellt. Hierzu wurde 2-(Thiophen-2-yl)-essigsäure zusammen mit 2.0 Äquivalenten Aluminiumtrichlorid in absolutem DCM bei einer Temperatur von 0°C mit 1.5 Äquivalenten Benzoylchlorid versetzt und über einen Zeitraum von 2.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.²⁹⁷⁻²⁹⁹ Die Einführung der Isobutylgruppe gelang durch Reaktion von (5-Benzoyl-thiophen-2-yl)-essigsäuremethylester (**51**) in absolutem DMF bei einer Temperatur von 0°C mit 1.05 Äquivalenten Natriumhydrid und Abfangen des entstehenden Enolats mit 1.3 Äquivalenten 1-Brom-2-methylpropan, wobei über einen Zeitraum von 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung erhielt man 2-(5-Benzoyl-thiophen-2-yl)-4-methylpentansäuremethylester (**52**) in befriedigender Ausbeute. Anschließend wurde der alkylierte Carbonsäureester **52** in die korrespondierende Carbonsäure **53** überführt (Abb. 4.33). Der Versuch der alkalischen Hydrolyse des Methylesters **52** mit NaOH in Methanol schlug fehl. Die Hydrolyse des Carbonsäureesters unter sauren Bedingungen blieb ebenfalls ohne Erfolg. Die Reaktion des substituierten (5-Benzoyl-thiophen-2-yl)-essigsäuremethylesters (**52**) mit 5.0 Äquivalenten wässriger Salzsäure in Dioxan über Nacht bei Raumtemperatur führte nach wässriger Aufarbeitung zur Isolierung der Ausgangsverbindung **52**. Schließlich gelang die Hydrolyse des Esters **52** unter milden, alkalischen Bedingungen. Wurde (5-Benzoyl-thiophen-2-yl)-essigsäuremethylester (**52**) mit 3.5 Äquivalenten Lithiumhydroxid als wässrige Lösung in Dioxan über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, erhielt man nach wässriger Aufarbeitung und

säulenchromatographischer Reinigung 2-(5-Benzoyl-thiophen-2-yl)-4-methylpentansäure (**53**) in guter Ausbeute. Mechanistisch lässt sich die Reaktion analog der Esterhydrolyse mit Kaliumhydroxid beschreiben. Im Vergleich zu Kaliumhydroxid zeichnet sich Lithiumhydroxid durch einen höheren kovalenten Anteil der Li-O-Bindung aus, was eine geringere Basizität und damit eine geringere Reaktivität gegenüber dem elektrophilen Carboxyl-Kohlenstoffatom zur Folge hat.

Die Zielverbindungen **54a**, **54b**, **55** und **56** wurden durch Kupplung in Lösung unter Standardbedingungen mit EDCI und HOBT²⁵⁴ und anschließender basischer Hydrolyse mit Natriumhydroxid erhalten und über präparative HPLC aufgereinigt. Als C-terminales Ende wurde 3-Amino-3-tolyl-propionsäure (**20**) verwendet, welche sich schon zuvor bei der Synthese von Integrin-Peptidmimetika bewährt hatte (Abb. 4.34).^{13,246}

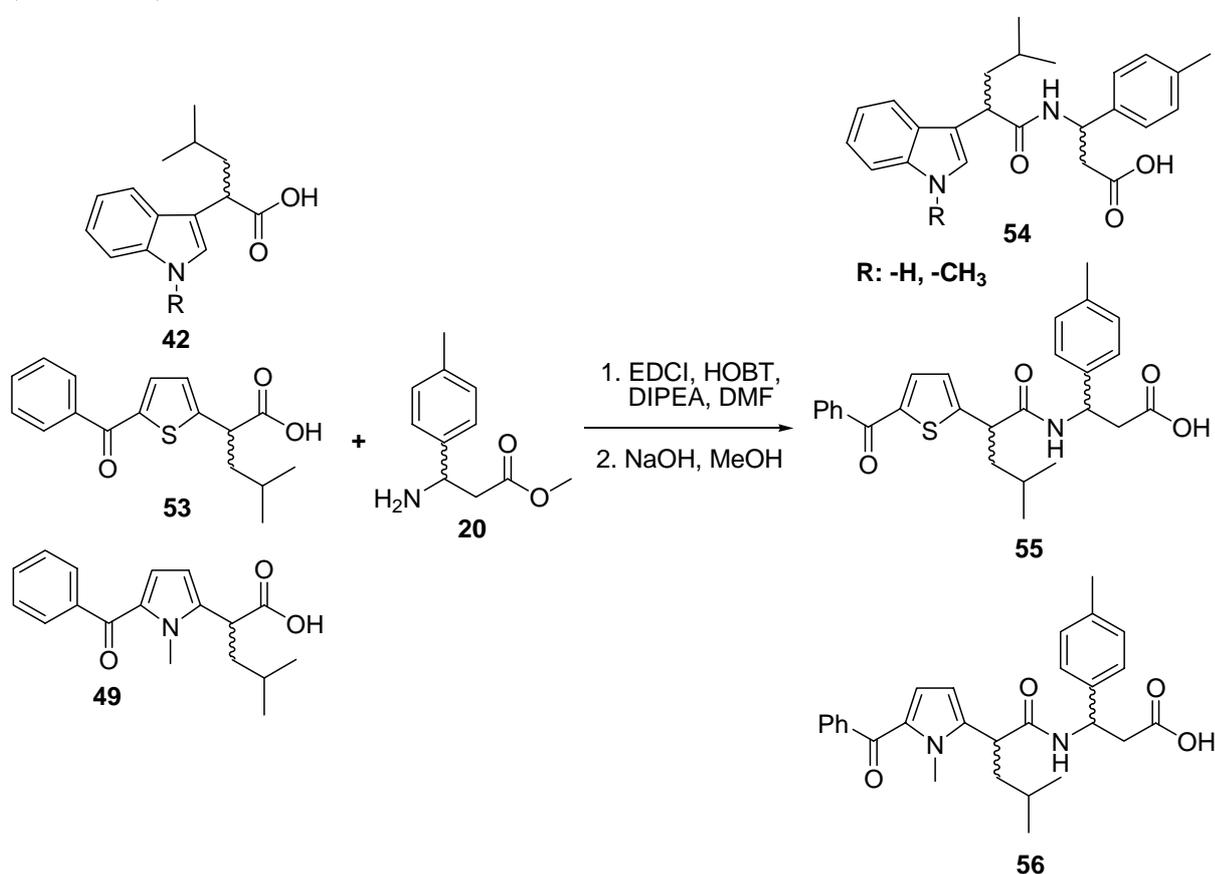


Abbildung 4.34: Synthese der Zielverbindungen **54**, **55**, **56** welche jeweils als Charakteristikum ein heterozyklischen Surrogat zur Amidbindung aufweisen.

4.3 Modifikation des C-terminalen Endes durch aromatische Surrogate

4.3.1 Einleitung

Die Leitstrukturoptimierung von $\alpha_4\beta_7$ -Integrinantagonisten nahm ihren Anfang in der Darstellung verschiedener *N*-acylierter Tripeptide, die sich von der minimalen Erkennungssequenz LDT des MAdCAM-1 ableiteten.^{210,211} In Folge der schrittweisen Modifikation des *C*-Terminus mit aromatischen Gruppen wurde schließlich das Threonin vollständig ersetzt und die Position der verbrückenden Amidbindung zwischen Asparaginsäure und Threonin von aromatischen Seitenketten eingenommen (Abb. 4.35).

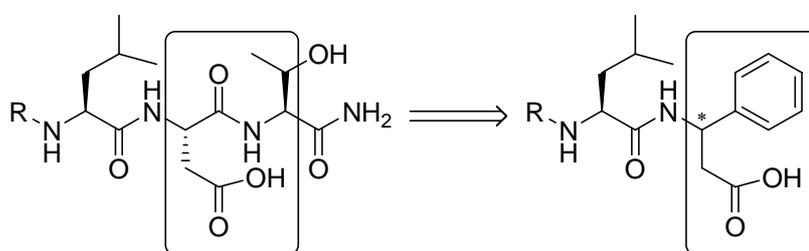


Abbildung 4.35: Ersatz der Amidbindung zwischen Leu-Thr durch ein aromatisches System.

Somit wäre die Schlussfolgerung nahe liegend, dass die biologisch aktive Konfiguration am C-3-Kohlenstoff derjenigen am natürlichen Liganden MAdCAM-1 folgt und dementsprechend *S*-Konfiguration aufweisen sollte. Diese Annahme sollte sich natürlich nur im Falle von vergleichbaren Bindungsmodi bewahrheiten. Eine enantioselektive Synthese der *C*-terminalen β -Aminosäure wäre aus diesem Grunde wünschenswert, da die 3-Amino-3-aryl-propionsäure bei den bisherigen Darstellungen der teils hochaktiven Integrinliganden stets in ihrer kommerziell erhältlichen racemischen bzw. der über die nicht-stereoselektive *Radionov*-Reaktion²⁵⁵ zugänglichen Form eingesetzt wurden (Abb. 4.36) und somit keine Aussage über die biologische aktive Konstitution am C-3-Atom möglich war.

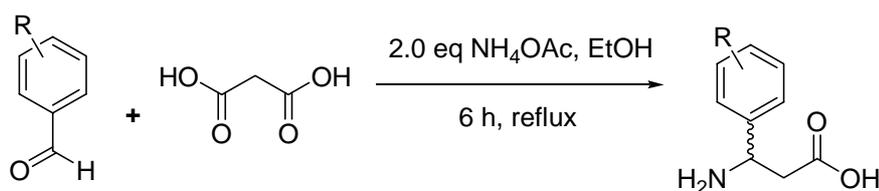


Abbildung 4.36: Radionov-Reaktion zur Synthese von β -Amino-aryl-propansäuren.

In der Tat ist die Frage nach der aktiven Konfiguration am asymmetrischen Kohlenstoffatom der β -Aminosäure wichtig, da dieselbe Baueinheit auch für die in diesem Arbeitskreis synthetisierten $\alpha_V\beta_3$ -Integrinliganden verwendet wird und biologische Assays in beiden Fällen mit racemischen Mischungen durchgeführt werden. Die Einführung eines zweiten Stereozentrums am C(α) des Leucins bzw. Leucin-analoger Bausteine führt jeweils zur Bildung von Diastereomeren, welche mittels präparativer HPLC häufig trennbar sind. Die Ergebnisse des biologischen Assays waren jedoch ernüchternd, da beide Diastereomere die gleiche Aktivität zeigten. Dies würde sogar nahe legen, dass die Stereochemie am asymmetrischen Kohlenstoffatom der β -Aminosäure vollkommen ohne Einfluss auf die Aktivität wäre und nicht derjenigen des natürlichen Liganden folgt. Dies Ergebnis lässt vermuten, dass die inhibierende Wirkung dieser Substanzklasse auf anderen, unspezifischen Wechselwirkungen beruht oder sogar auf eine eventuelle Zytotoxizität, die auf Grund der stark verminderten ligandenbindenden Eigenschaften ebenfalls zu einer Aktivitätssteigerung führt. Da sich bei der Synthese von Peptidmimetika - insbesondere wenn nicht auf die natürlichen Aminosäuren zurückgegriffen werden kann - eine racemische Synthese als ökonomischer erweist, werden die folgenden Synthesen in der Regel auf diese Art durchgeführt.

4.3.2 Verwendung von 2-Amino-2-(phenylethyl)-propionsäure als C-terminales Surrogat

Um den Einfluss des aromatischen Restes als Ersatz der Amidbindung zwischen Leucin und Threonin zu bewerten, wurde der Phenylrest durch eine Methylen- (-CH₂-) bzw. Ethylenbrücke (-CH₂CH₂-) verlängert. Diese Modifikationen führten nicht nur zur Verlängerung der Kette und Erhöhung der Lipophilie, sondern auch zur Erhöhung der Flexibilität durch mehr freie rotierbare Bindungen. Die Synthese der Phenylethyl-substituierten β -Aminosäure nach der Methode von Radionov²⁵⁵ führte zu keinem Erfolg, da vermutlich nur elektronenreiche aromatische Aldehyde verwendet werden

können. Es wurde nach einem anderen Lösungsansatz gesucht. Die Synthese beruht auf der *Michael*-Addition von sekundären Aminen wie Dibenzylamin in Form ihrer Lithiumamide an (*E*)-4-Phenylbut-2-ensäure- (**57**) bzw. (2*E*,4*E*)-5-Phenylpenta-2,4-diensäure-*tert*-butylester (**60**).^{302,303} Die Verwendung von *tert*-Butylestern in dieser Synthese wird als vorteilhaft beschrieben, da die Nebenreaktionen der Carbonsäureamidbildung bei sterisch weniger gehinderten Methyl- bzw. Ethylestern zu geringeren Ausbeuten führt (Abb. 4.37). Durch Verwendung von Ethylestern konnte das Produkt jedoch ebenfalls in guten Ausbeuten isoliert werden.

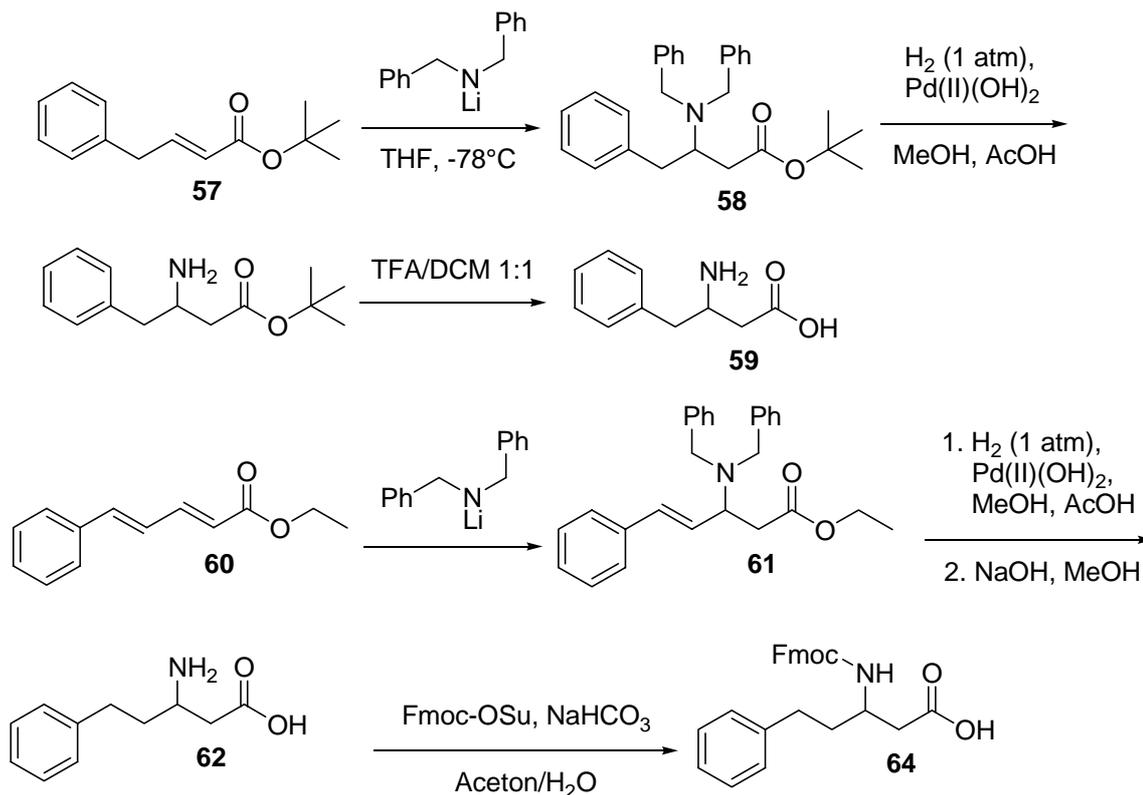


Abbildung 4.37: Synthese von β -Aminosäuren.

Die Lithiumamide wurden in diesem Falle bei -78°C in THF mittels *n*-BuLi hergestellt und nach 15 Minuten tropfenweise mit den *tert*-Butylestern der ungesättigten aromatischen Säuren **57** und **60** versetzt. Nach der Hydrolyse mit gesättigter NH₄Cl-Lösung und wässriger Aufarbeitung erhielt man die tertiären Amine in guten Ausbeuten. Die reduktive Debenzylierung zu den 3-Amino-3-phenyl-propionsäure-*tert*-butylestern verlief bei einer H₂-Atmosphäre von 1 atm mittels des *Pearlman*-Katalysators (Pd(II)[OH]₂) in einer Mischung aus Methanol/H₂O/Essigsäure (40:4:1) über 24 Stunden quantitativ.³⁰⁴ Außerdem wurde die C-C-Doppelbindung in der Seitenkette quantitativ zu einer aliphatischen Kette reduziert.

Der Schlüsselschritt zur Synthese von (*E*)-4-Phenylbut-2-ensäure- (**57**) bzw. (2*E*,4*E*)-5-Phenylpenta-2,4-diensäure-*tert*-butylester (**60**) ist eine *Wittig-Horner-Emmons*-

Reaktion, über welche das Alken durch Reaktion mit 2-Phenylacetaldehyd bzw. Zimtaldehyd und dem Phosphonsäureester **63** gebildet wurde. Eine Standardprozedur zur Darstellung von Phosphonsäureestern ist die *Arbuzov*-Reaktion von Alkylhalogeniden mit Trialkylphosphit bei erhöhter Temperatur (Abb. 3.38).

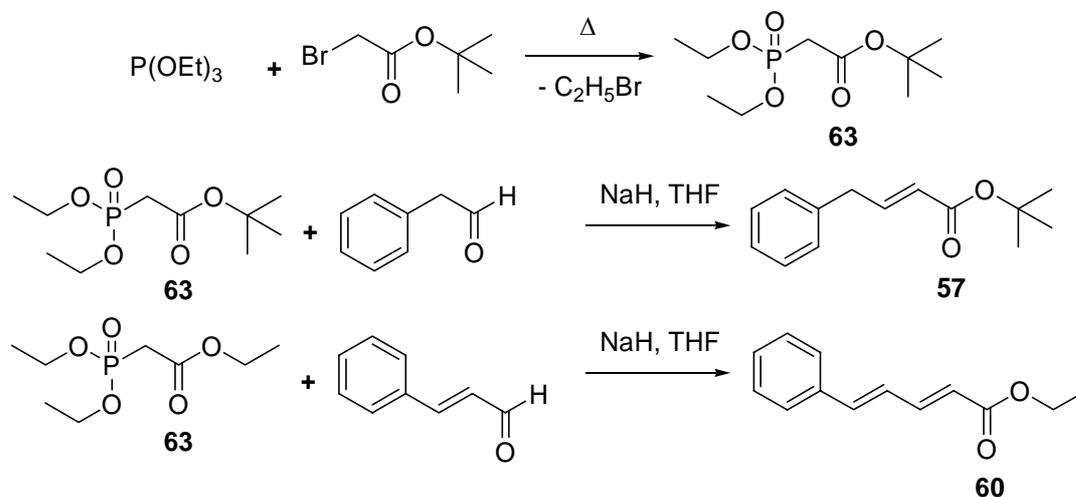


Abbildung 4.38: Synthese der ungesättigten aromatischen Alkene.

Nach Spaltung des Esters unter sauren Bedingungen wurde die freie β -Aminosäure **62** in die Fmoc-geschützte Verbindung **64** überführt und somit nach Kupplung an TCP-Harz für die Festphasensynthese zugänglich gemacht. Die Fmoc-Schützung der 3-Amino-4-phenylbutansäure wurde auf Grund der geringen Eduktmenge nicht durchgeführt. Die Kupplung von Fmoc-(L)-Leucin und anschließend Isochinolin-3-carbonsäure nach der Fmoc-Strategie lieferte das Produkt **65** nach Abspaltung unter sauren Bedingungen (Abb. 4.39).²⁵¹

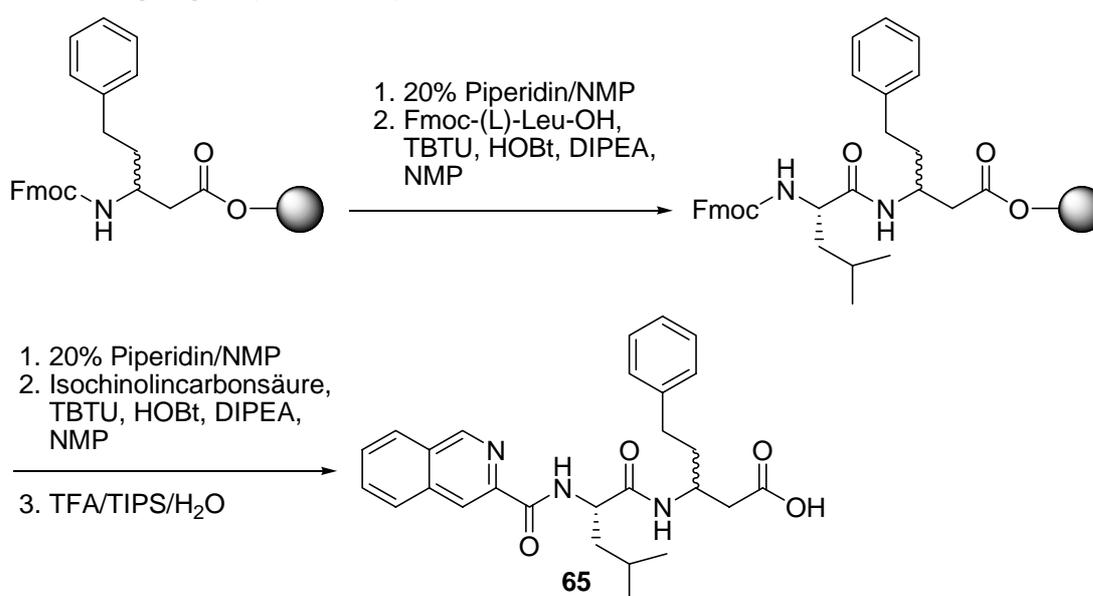


Abbildung 4.39: Synthese der Zielverbindung **65**.

4.3.3 Verwendung von 3-Amino-3-(pyridyl)-propansäure und Methoxy-substituierten Derivaten

Ein Ziel der Strukturoptimierung ist es, die Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe zu steigern. Aus diesem Grund soll im Folgenden auf die Synthese von hydrophilen β -Aminosäuren besonderer Wert gelegt werden.^{305,306} Der Ersatz des Phenyl-Restes durch (substituierte) Pyridinderivate scheint ein viel versprechender Weg zu sein, wobei die Synthese von 3-Amino-3-(pyridyl)-propansäure diese Anforderungen erfüllen könnte. Die im Arbeitskreis entwickelte Leitverbindung **11** hat einen schwerlöslichen, zwitterionischen Charakter, der möglicherweise durch die Einführung einer weiteren basischen Gruppe wie zum Beispiel durch Pyridin aufgehoben werden kann.

Der Schlüsselschritt bei der Synthese der 3-Amino-3-(pyridyl)-propansäure-Derivate war jeweils eine *Wittig-Horner-Emmons*-Reaktion zwischen den verschiedenen Pyridincarbaldehyden und dem Phosphonsäureester **66**. Die erhaltenen, ungesättigten aromatischen Verbindungen **67** wurden durch eine *Michael*-Addition von sekundären Aminen wie Dibenzylamin in Form ihrer Lithiumamide in die *N*-Dibenzyl-geschützten β -Aminosäuren **68** überführt.³⁰⁷ Die oben beschriebene reduktive Debenzylierung zu den 3-Amino-3-pyridyl-propionsäureestern bei einer H_2 -Atmosphäre von 1 atm mittels des *Pearlman*-Katalysators führte ausschließlich zur Isolierung der reduzierten Verbindungen unter Verlust der Aromatizität. Der Versuch die Benzyl-Schutzgruppen mit Cer-Ammoniumnitrat $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$ oxidativ zu entschützen lieferte einfach *N*-benzylierte Produkte **69**.³⁰⁸ Unabhängig vom Substitutionsmuster konnten die gewünschten 3-Amino-3-(pyridyl)-propansäure-Derivate nicht isoliert werden (Abb. 3.40).

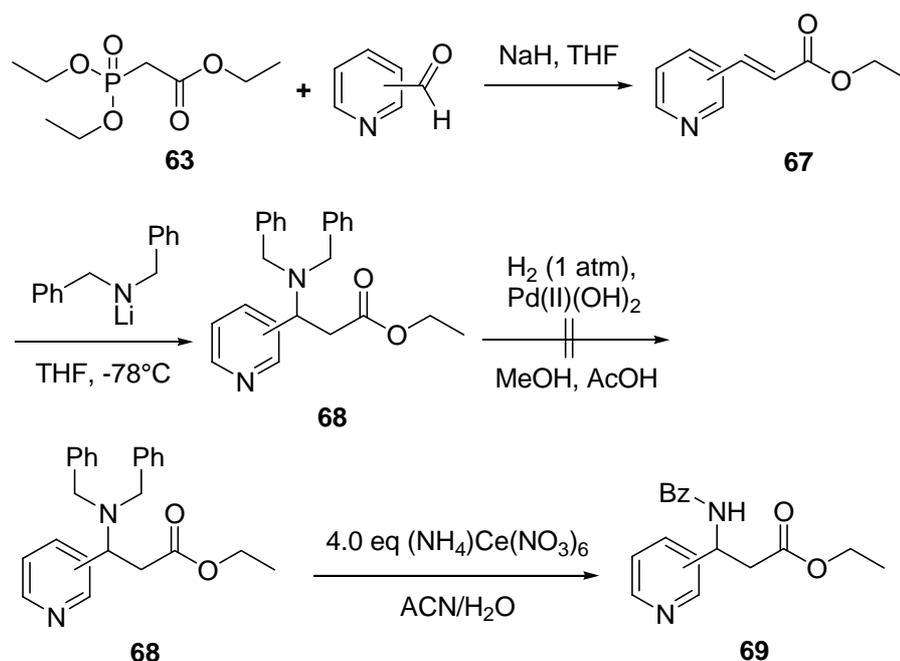


Abbildung 4.40: Fehlgeschlagene Synthese der 3-Amino-3-(pyridyl)-propansäure-Derivate.

Die Synthese der β -Aminosäuren über eine *Radionov*-Reaktion aus den entsprechenden Aldehyden und Malonsäure verlief ohne Erfolg. Bei der Verwendung von Malonsäureestern konnte man ausschließlich die *Knoevenagel*-Produkte isolieren. Die Erhöhung der Elektronendichte durch Einführung eines Methoxy-Substituenten am aromatischen Pyridinsystem sollte die Debenzylierung gegenüber der Reduktion des aromatischen Systems begünstigen und außerdem die Bioverfügbarkeit erhöhen.³⁰⁷ Ausgangsverbindungen für die Synthese der benötigten Aldehyde **70** stellten die entsprechenden Bromverbindungen dar, welche nach einem Brom-Lithium Austausch bei -78°C mit *n*-BuLi und Abfangen der metallorganischen Spezies mit DMF zu einer *Vilsmeier-Haack*-analogen Verbindungen durch wässrige Hydrolyse zu den Aldehyden 6-Methoxypyridin-2-carbaldehyd (**70a**) bzw. 6-Methoxypyridin-3-carbaldehyd (**70b**) reagierten. Die Reaktion verlief in quantitativer Ausbeute und das Rohprodukt konnte ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt eingesetzt werden.^{309,310} Im nächsten Schritt wurden die Aldehyde in einer *Wittig-Horner-Emmons*-Reaktion zu den entsprechenden Alkenen **71** umgesetzt, welche im weiteren Verlauf über eine *Michael*-Reaktion mit Lithium-Dibenzylamid zu den Dibenzyl-geschützten β -Aminosäuren **72** umgesetzt wurden. Die Verwendung von *tert*-Butyl-bromessigsäureester zur Darstellung der Phosphonsäureester über eine *Arbuzov*-Reaktion ist empfehlenswert, da der Ester sehr leicht unter sauren Bedingungen gespalten werden konnte. Das Produkt **73** konnte nach

hydrogenolytischer Debenzylierung bei einer H_2 -Atmosphäre von 1 atm mittels des *Pearlman*-Katalysators in einer Mischung aus Methanol/ H_2O /Essigsäure (40:4:1) über 24 Stunden quantitativ erhalten werden (Abb. 4.41).

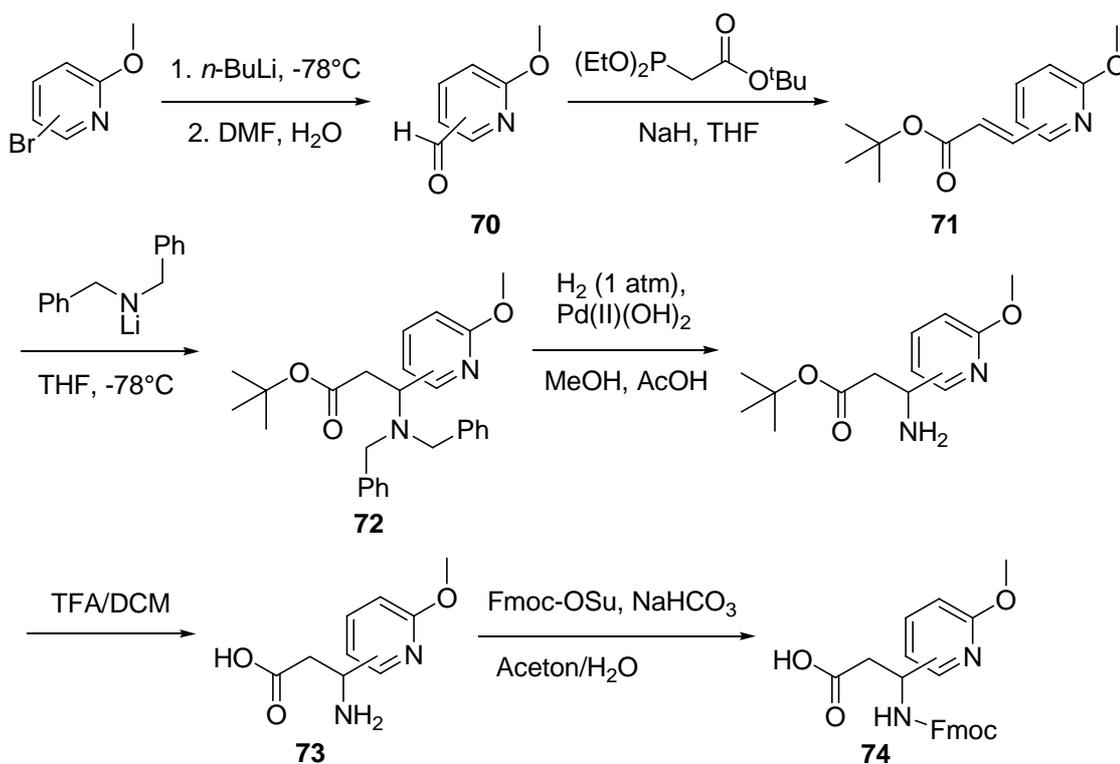


Abbildung 4.41: Synthese von 3-Amino-3-(6-methoxypyridin-2-yl)- und 3-Amino-3-(6-methoxypyridin-3-yl)-propionsäure (73).

Die so erhaltenen β -Aminosäuren konnten nach Fmoc-Schützung in der Festphasensynthese verwendet werden. Die Kupplung von Fmoc-(L)-Leucin und anschließend Isoquinolin-3-carbonsäure nach der Fmoc-Strategie lieferte das Produkt 75 nach Abspaltung unter sauren Bedingungen (Abb. 4.42).²⁵¹

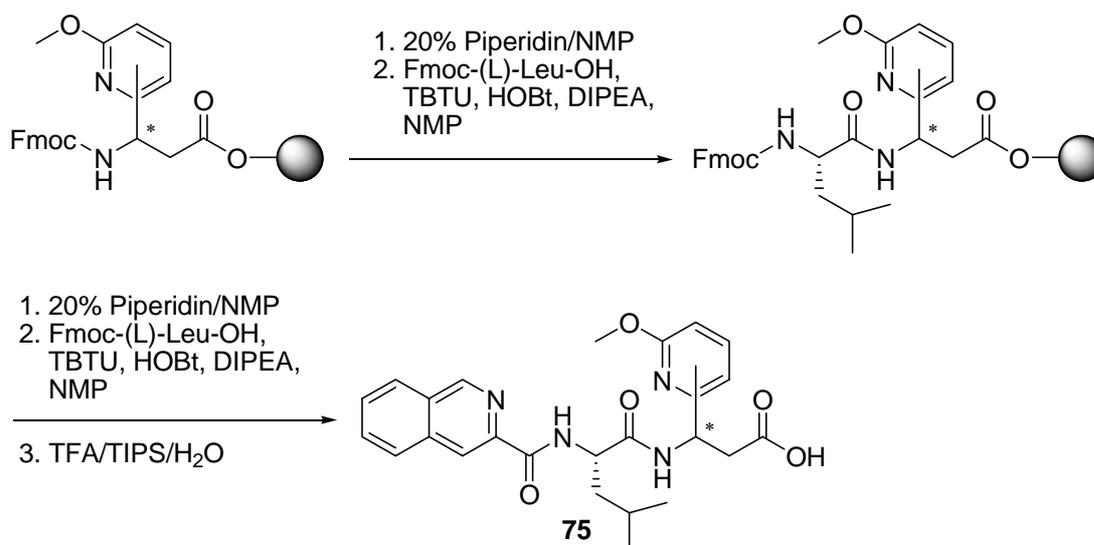


Abbildung 4.42: Synthese der Zielverbindungen **75** mit zwei Amidbindungen.

4.3.4 Reduzierte Amidbindung

Szelke *et al.* zeigten anhand der von ihnen synthetisierten Angiotensinogen-analogen Peptiden, dass der Ersatz einer proteolytisch spaltbaren Amidbindung durch die reduzierte Amidbindung (-CH₂-NH-) zu hochaktiven Renin-Inhibitoren führen kann und demonstrierten so zum ersten Mal die Möglichkeit des isosteren Austausches von Peptidbindungen durch nicht-hydrolysierbare Analoga des tetraedrischen Übergangszustandes während der Spaltung.³¹¹ Im Rahmen der systematischen Optimierung der tripeptidischen Leitstruktur von $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden konnte gezeigt werden, dass die Amidbindung zwischen den beiden Aminosäuren Leucin und Asparaginsäure nicht zur Bindung beiträgt und ohne Aktivitätsverlust durch die reduzierte Amidbindung ersetzt werden kann.¹³ Die Untersuchung beschränkte sich auf die C-terminale Amidbindung der auf ein Dipeptid reduzierten Leitstruktur.

An das mit der 3-Amino-3-(6-methoxypyridin-2-yl)- bzw. 3-Amino-3-(6-methoxypyridin-3-yl)-propansäure (**73**) belegte Wang-Harz wurde an dessen freier Aminofunktion die Iminbildung mit frisch hergestelltem *N*-Boc-(L)-Leucinal **78** unter wasserentziehenden Bedingungen ermöglicht. Das an der festen Phase immobilisierte Imin wurde im Anschluß mit Natriumtriacetoxyborhydrid in DCM reduziert³¹² und die Zwischenstufe **79** schließlich mit Trifluoressigsäure abgespalten (Abb. 4.44) *N*-Boc-(L)-Leucinal **78** wurde über eine *Swern*-Oxidation aus *N*-Boc-(L)-Leucinol **77** erhalten, welches durch Reduktion des entsprechenden Methylesters **76** mit Natriumborhydrid³¹³ in Methanol nach Schützen der freien Aminofunktion als *tert*-Butylcarbammat (Boc) generiert werden konnte (Abb. 4.43).

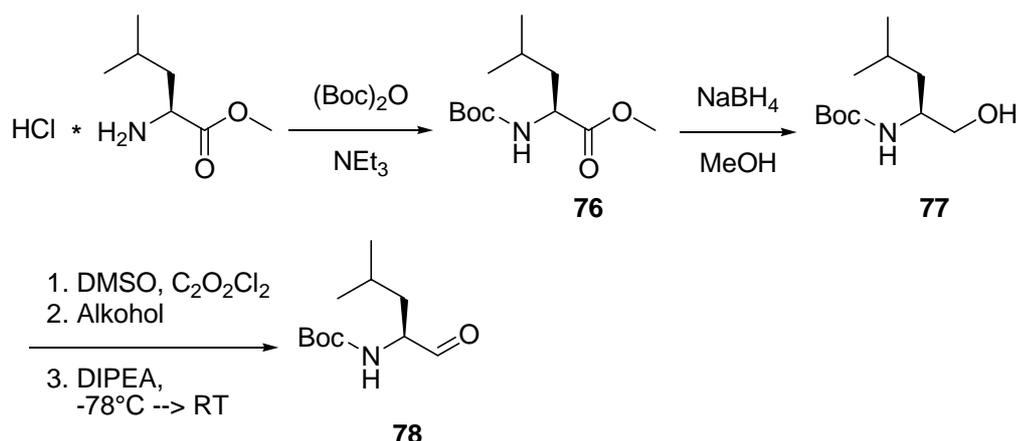


Abbildung 4.43: Synthese von *N*-Boc-(*L*)-Leucinal (**78**).

Bei der Verwendung von *N*-Fmoc-(*L*)-Leucinal könnte man das Zielmolekül **80** komplett an der festen Phase aufbauen. Da die *Swern*-Oxidation aber unter basischen Bedingungen verläuft, was zur Entschützung der Fmoc-Gruppe führt, erschien die Boc-Schutzgruppe sinnvoller und dadurch die Kombination von Festphasensynthese und anschließende Kupplung in Lösung. Eine selektive Entschützung der Boc-Gruppe am Wang-Harz ist nicht sicher belegt.

Die freie, primäre Aminofunktion der Zwischenstufe **79** wurde anschließend mit OSu-aktivierter Isochinolincarbonsäure, welche durch eine Standard-Kupplungsreaktion aus Isochinolinsäure und *N*-Hydroxy-succinimid mit DCC als Kupplungsreagenz ohne weitere Aufreinigung erhalten wurde²⁵⁴, selektiv zu dem entsprechendem Amid **80** überführt. Die Verwendung von Carbonsäurechloriden oder starken Aktivierungsreagenzien könnte auch die Reaktion mit dem sekundären Amin ermöglichen (Abb. 4.44).

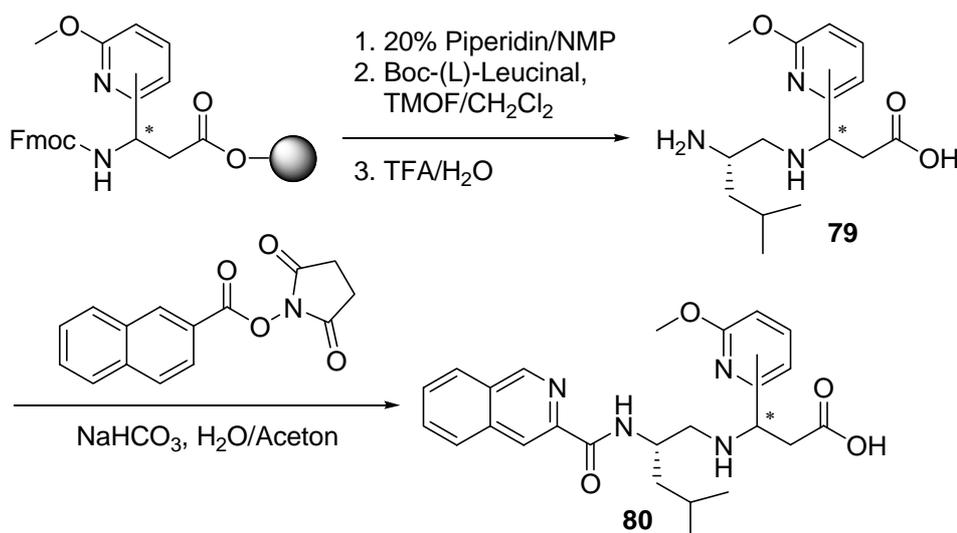


Abbildung 4.44: Synthese von $[CH_2-NH]$ -Isosteren der C-terminalen Amidbindung.

Außerdem wurden Versuche unternommen, nach Quarternisierung des Pyridinstickstoffs zu dem entsprechenden Pyridiniumylid, über eine [2+3]-Cycloaddition mit elektronenarmen Alkenen und anschließende Oxidation an der festen Phase, Indolizin-substituierte β -Aminosäuren aufzubauen. Diese Synthesestrategie scheiterte jedoch schon bei der Quarternisierung des Stickstoffes mit Bromessigsäuren.

4.3.5 Biaryle als C-terminales Surrogat

Die Synthese von Biarylfunktionalitäten in Peptidmimetika ist von besonderem Interesse, da bei der Evaluierung von Wirksamkeitseigenschaften die Biphenylgruppe und Biaryle im Allgemeinen eine besondere Häufung in proteinbindenden Substanzen aufweisen. Diese Struktureinheiten werden unter diesen Gesichtspunkten als „privilegierte Strukturen“ angesehen und besitzen eine hohe Wahrscheinlichkeit, als Vorlage für Therapeutika mit hoher Affinität und Spezifität zu dienen.³¹⁴ Außerdem wurden auch einige Phenylalanin-Biarylderivate als $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden vorgestellt.^{209,214}

Im Folgenden ist die Festphasensynthese von Biaryl-funktionalisierten LDT-Mimetika beschrieben, die nach Kupplung von in Lösung synthetisierten Brom-substituierten 3-Amino-3-aryl-propansäuren mit Boronsäuren über eine *Suzuki*-Biaryl-Kupplung am Wang-Harz zugänglich waren.

4.3.5.1 Die Suzuki-Reaktion

Der relativ kleine Elektronegativitätsunterschied zwischen Kohlenstoff (2.55) und Bor (2.04) im Vergleich mit Lithium, Magnesium und den Übergangsmetallen bedeutet, dass Organoborverbindungen normalerweise nicht mit Elektrophilen wie organischen Halogenverbindungen reagieren. Suzuki und Miyaura beschrieben 1979 die Kupplung von Alkenylboranen in der Gegenwart eines Pd(0)-Katalysator mit Alkenyl-, Alkinyl-, Aryl- und Benzyl-Halogeniden (Abb. 4.45).^{315,316}

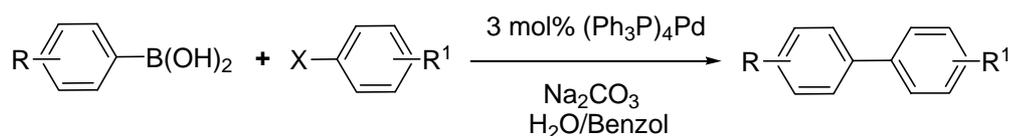


Abbildung 4.45: Biaryl-Kreuzkupplung.

Früher wurde für solche Synthesen die Kupplung von hochreaktiven organometallischen Reagentien (Grignard, Organolithium, Organozink etc.) mit Arylhalogeniden häufig in der Gegenwart von verschiedenen Katalysatoren benutzt, die normalerweise streng wasserfreie Bedingungen und inerte Atmosphäre benötigen. Außerdem kam als limitierender Faktor dazu, dass die Anwesenheit von funktionellen Gruppen die Reaktion stört. Im Gegensatz dazu wird die *Suzuki*-Kupplung von Boronsäuren normalerweise in der Gegenwart von Wasser durchgeführt, wobei eine Vielzahl funktioneller Gruppen toleriert wird. Unter den Standard-*Suzuki*-Reaktionsbedingungen werden meist Arylbromide oder -iodide als Elektrophile benutzt, wobei die Iodide reaktiver sind.³¹⁷ Die erfolgreiche Kupplung von leichter erhältlichen, jedoch normalerweise unreaktiven Arylchloriden wird unter modifizierten Bedingungen entweder mit Palladium-³¹⁸⁻³²² oder Nickel-Katalysatoren erreicht.^{323,324} Wegen ihrer Vielseitigkeit und den milden Reaktionsbedingungen findet die *Suzuki*-Reaktion (Abb. 4.46) breite Anwendung in der Festphasensynthese.³²⁵⁻³²⁷

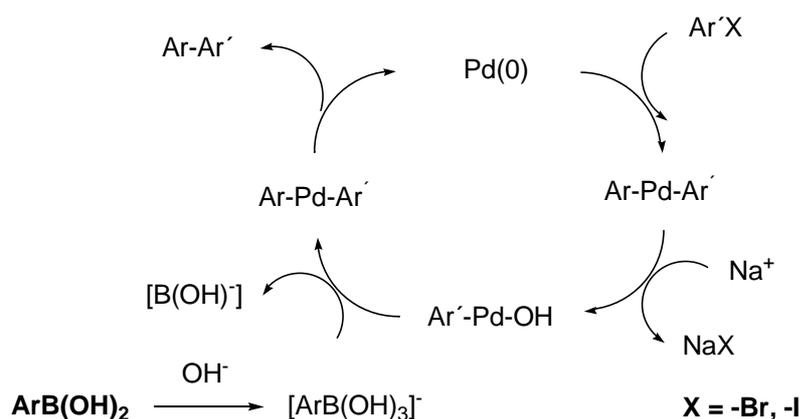


Abbildung 4.46: Katalytischer Kreislauf der Suzuki-Biaryl-Kupplung.

4.3.5.2 Festphasensynthese von 3-Amino-3-((pyridyl)phenyl)-propansäure-Derivaten

Im Folgenden ist die Festphasensynthese von Biaryl-funktionalisierten LDT-Mimetika beschrieben, die nach Kupplung von in Lösung synthetisierten 3-Amino-3-(bromphenyl)-propansäuren über die *Suzuki*-Biaryl-Kupplung am Wang-Harz zugänglich waren. Primäres Ziel der Synthese von Biarylen ist wiederum die Einführung von polaren, aromatischen Resten, um die Löslichkeit und die Bioverfügbarkeit zu erhöhen. Deshalb werden in dieser Arbeit nur Kupplungen mit Pyridin-2-yl-2-boronsäure als Reaktionspartner in der *Suzuki*-Reaktion beschrieben. Die Kupplung mit Phenylboronsäure diente als Testsystem und lieferte das entsprechende Biaryl in guten Ausbeuten. Die Kupplung mit 3-Amino-3-(4-bromphenyl)-propansäure führte bei Verwendung von (Pyridin-2-yl)-boronsäure ausschließlich zur Debromierung, während mit Phenylboronsäure die Kupplung in befriedigenden Ausbeuten zu beobachten war.

Die aus einer *Radionov*-Reaktion²⁵⁵ mit verschiedenen substituierten Brombenzaldehyden erhaltenen β -Aminosäuren **81** konnten nach Fmoc-Schützung unter Standardbedingungen und Immobilisierung an der festen Phase in der Kupplungsreaktion eingesetzt werden (Abb. 4.47).

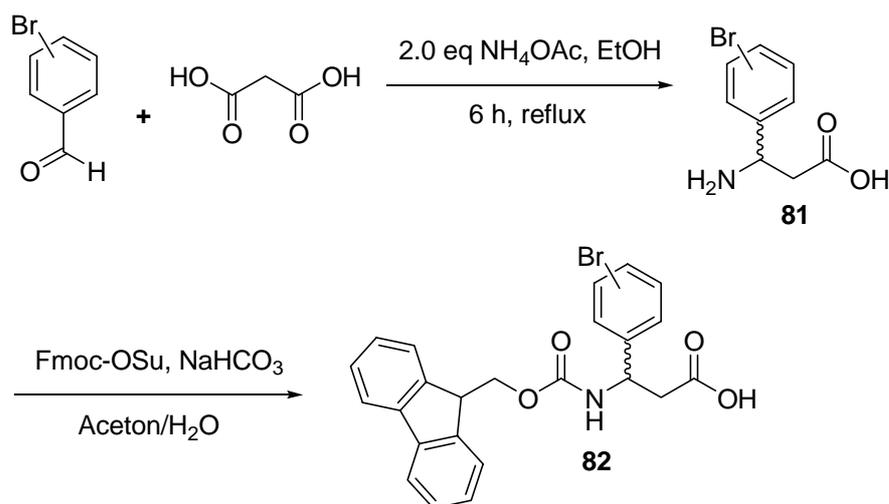


Abbildung 4.47: Darstellung der 3-Amino-3-(bromphenyl)-propansäure-Derivate (**82**).

Vor der parallelen kombinatorischen Synthese mit verschiedenen Arylboronsäuren wurden die optimalen Reaktionsbedingungen evaluiert, indem systematisch verschiedene Lösungsmittelsysteme (DMF bzw. DMF/ H_2O), Basen (NEt_3 bzw. K_2CO_3) und Palladiumkatalysatoren (Palladium-tetrakis-(triphenylphosphin) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$), Tris-(dibenzylidenaceton)-dipalladium ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$) bzw. Palladium(diphenylphosphinoferrocen)-(II)-chlorid ($\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$)) getestet wurden. Die Verwendung von 2-Thienylboronsäure als Modellkupplungskomponente erbrachte jedoch niemals das gewünschte Produkt. Stattdessen konnten in verschiedenen Ansätzen stabile Insertionsprodukte des Pd-Katalysators in die Kohlenstoff-Brom-Bindung massenspektroskopisch nachgewiesen werden. Die Verwendung von $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$ (20 mol%) in DMF unter Zuhilfenahme von Triethylamin erwies sich als Methode der Wahl. Alle Reaktionen wurden im Folgenden unter diesen Bedingungen mit 5 Äquivalenten Arylboronsäure durchgeführt (Abb. 4.48).

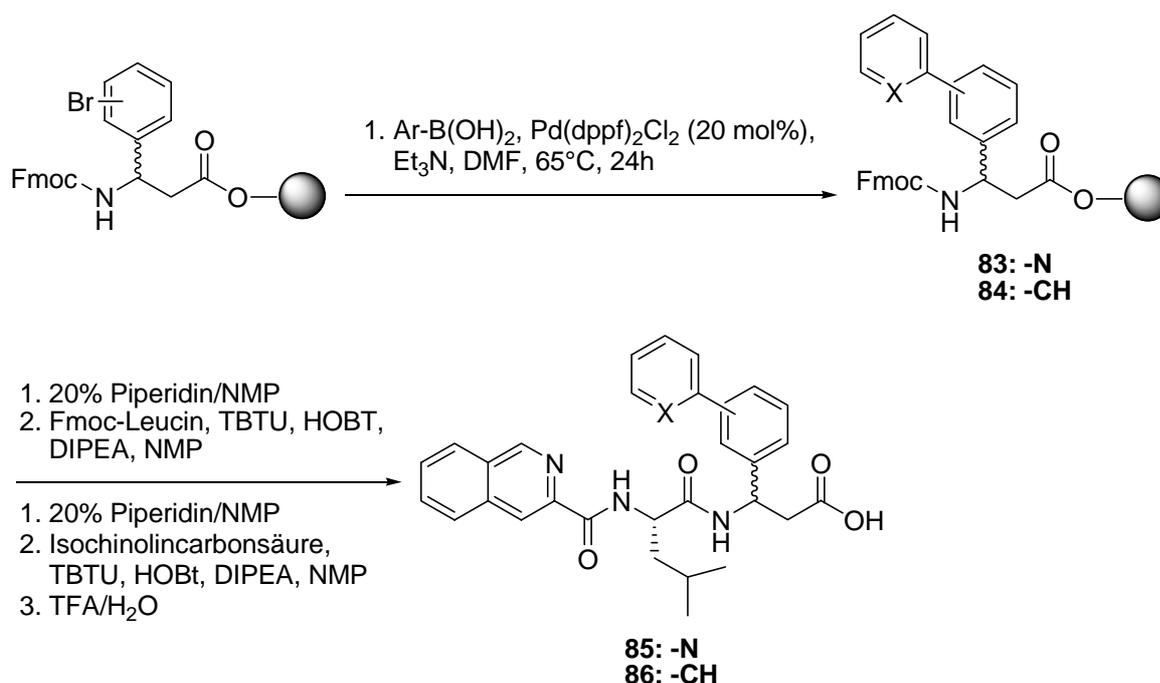


Abbildung 4.48: Suzuki-Reaktion an der festen Phase.

4.4 Beiträge zur Synthese von Alken-Dipeptid-Isosteren

Bei den Alken-Dipeptid-Isosteren handelt es sich um Peptidmimetika mit eingeschränkter Rotation um die Doppelbindung, wodurch eine *cis-trans*-Isomerisierung auszuschließen ist (Abb. 4.49). Die *trans*-Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung erscheint ein naheliegendes Mimetikum zu sein, da sie sehr ähnliche Eigenschaften in Bezug auf Bindungsgeometrie und -länge besitzt. So nimmt die Amidbindung in Peptiden eine planare Konformation ein und besitzt wie die C-C-Doppelbindung eine Bindungslänge von ungefähr 3.8 Å. Im Gegensatz zur Amidbindung, die eine gewisse Flexibilität und die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen besitzt, ist die C-C-Doppelbindung in einer Konformation fixiert und verliert die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken. Deshalb können *trans*-Doppelbindungsisostere von Peptiden wertvolle Informationen über die Rolle der Amidbindung an einer bestimmten Stelle des Peptids liefern, da im Falle des Aktivitätserhalts die Beteiligung der Amidbindung an der Ligandenbindung ausgeschlossen wäre.

Alken-Dipeptid-Isostere werden häufig benutzt, um die Bedeutung der Amid-Bindungs-Polarität zu untersuchen³²⁸⁻³³⁰, als Baustein für β -turn-Substrukturen^{329,331} und um die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptid-Bindungen zu unterdrücken.³³²⁻³³⁴ In linearen Peptiden liegen die sekundären Amidbindungen gewöhnlich als *trans*-Isomer vor ($\omega = 180^\circ$), während die Population des *cis*-Isomers von 0.1 bis 1.0% variiert.^{335,336}

Es wurden mehrere erfolgreiche Beispiele bei der Synthese von Analoga des Enkephalins^{183,337}, ACE-Inhibitoren³³⁸ und Proteinkinase-Inhibitoren beschrieben.³³⁹

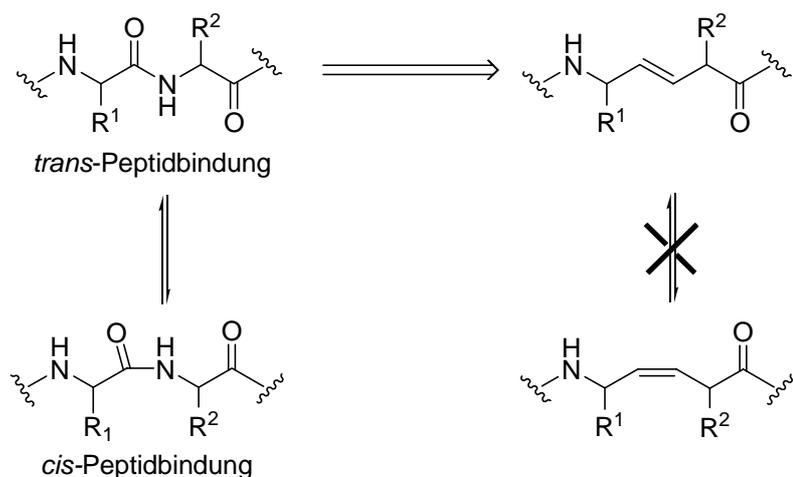


Abbildung 4.49: Eingeschränkte *cis/trans*-Konformationsänderung bei Alkeno-Dipeptidisosteren.

Der Synthesevorschlag folgt in diesem Fall nicht den vielfältig literaturbeschriebenen Vorschriften, da die C-terminale Aminosäure in diesem Fall im Verlauf der rationalen Optimierung schon auf eine β -Aminosäure reduziert worden ist. Die Abbildung 4.50 zeigt die geplante Synthesestrategie über eine Metathese-Reaktion³⁴⁰⁻³⁴² im Schlüsselschritt, durch welche das Alken-Surrogat der Amidbindung zwischen Leucin und dem β -Phenylalanin gebildet werden sollte.³⁴³⁻³⁴⁵

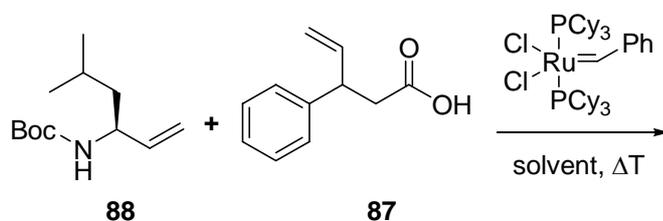


Abbildung 4.50: Synthesevorschlag für Alkeno-Isostere zwischen α - und β -Aminosäuren.

3-Amino-5-methylhex-1-en (**88**) konnte über eine *Wittig-Horner-Emmons*-Reaktion mit Methyltriphenylphosphoniumiodid aus der entsprechenden Aldehyd-Vorstufe gewonnen werden. Das Boc-geschützte Leucinal **78** ist wie andere Aminoaldehyde leicht aus dem entsprechenden enantiomerenreinen Aminoalkohol **77** über eine *Swern*-Oxidation zugänglich. Ausgangsverbindung für die Synthese von 3-Phenylpent-4-ensäure (**87**) war Zimtalkohol, welcher unter saurer Katalyse mit Pivalinsäure zu einem Enolester-Intermediat reagierte. Dieses Intermediat ging anschließend über eine *Claisen-Ireland*-Reaktion in den Methylester des Zielprodukts über, der ohne weitere

Aufreinigung in einem Schritt mit KOH zur freien Säure **87** hydrolysiert werden konnte (Abb. 4.51).³⁴⁶

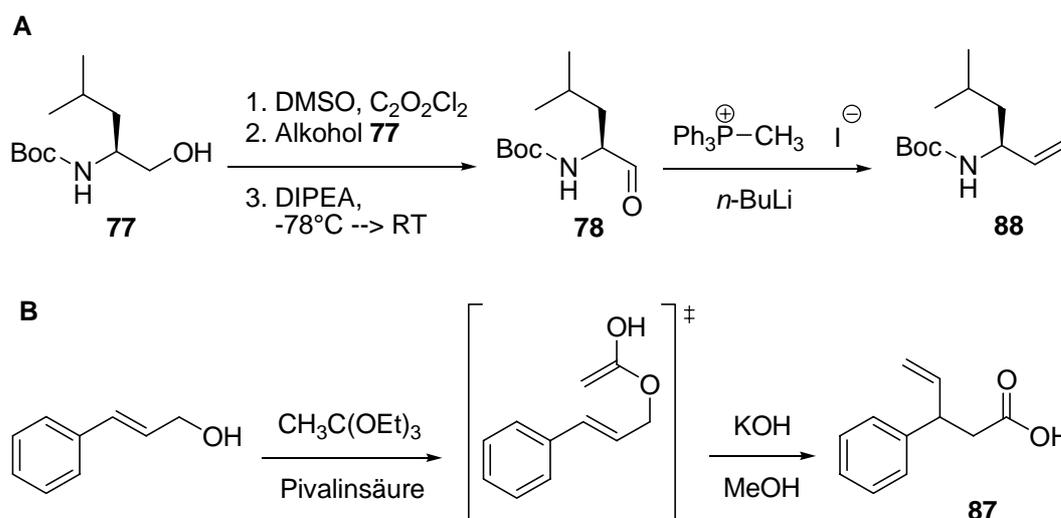


Abbildung 4.51: Synthese von (*N*-Boc)-5-Methylhex-1-en-3-amine (**88**) (A) und 3-Phenylpent-4-ensäure (**87**) (B).

Die angestrebte Metathese-Reaktion des folgenden Schrittes war unter keinen Reaktionsbedingungen möglich. Die Verwendung des *Grubbs-I*-Katalysators (Abb. 4.49) unter verschiedenen Reaktionsbedingungen führte nicht zur Zielverbindung, während die Edukte reisoliert werden konnten.³⁴⁷⁻³⁴⁹ Dieses Ergebnis könnte durch die fehlende Reaktivität der freien Säure erklärt werden. Anzunehmen ist auch ein koordinativer Effekt der Carboxylgruppe oder des Boc-geschützten Amins. Durch Verwendung des Methylesters der Verbindung **87** konnte ebenfalls kein Produkt isoliert werden.

4.5 Lactam-verbrückte Dipeptide

Durch Verbrückung zweier benachbarter Aminosäuren eines Dipeptids entsteht ein Dipeptidmimetikum, dessen konformative Flexibilität im Vergleich zu regulären Dipeptiden stark eingeschränkt ist. Es konnte gezeigt werden, dass Lactame eine sinnvolle konformationelle Einschränkung in Peptiden darstellen.^{219,350,351} In mehreren Fällen führte der Einbau solcher Struktur motive in Peptide zu biologisch aktiven Verbindungen.⁸ Auch Synthesen, bei denen Seitenketten eingebaut werden können, wurden beschrieben. Durch Verkleinerung oder Vergrößerung des Lactamringes, Einbau von Heteroatomen^{352,353} oder durch Benz Kondensation³⁵⁴ konnte die strukturelle Vielfalt der Verbindungen erweitert werden. Ein potenter Inhibitor des *Angiotensin-Converting-Enzyms* (ACE) gehört zu dieser Klasse.³⁵⁵

Die *trans*-Amidbindung wird nicht nur durch Lactame in ihrer Konformation fixiert, sondern der Ringschluss zum Lactam führt auch strukturelle Verzerrungen ein, welche die Anzahl der Konformationen durch nicht-kovalente Wechselwirkungen stark einschränken. Durch konformationelle Einschränkung sollte die spezifische bioaktive Konformation während der Rezeptorbindung bestätigt werden, welche in einem *matched case* zu einem aktiven Liganden führen würde. Die Torsionswinkel (ψ , ϕ) werden durch die Lactamisierung stark eingeschränkt (Abb. 4.52).³⁵⁶ Wenn man die Torsionswinkel des Peptidrückgrats durch ein 4,5-Spirolactam, welches die Amidbindung zwischen einem Prolin und einer weiteren Aminosäure durch ein γ -Lactam überbrückt, einschränkt, so hat man die Möglichkeit β II-*turns* zu induzieren.³⁵⁷⁻³⁶⁰ Die verschiedenen *turns* werden hauptsächlich durch die Torsionswinkel charakterisiert.²²³ In der Literatur finden sich viele Beispiele von β -*turn*-Mimetika, welche bereits ausgiebig erforscht wurden.^{224,225}

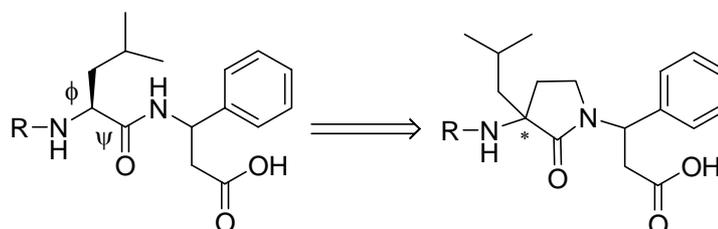


Abbildung 4.52: Lactam-verbrückte Dipeptide.

Eine elegante Methode zur Synthese von γ -Lactam-verbrückten Dipeptiden basiert auf einer intramolekularen Alkylierung, bei der geschützte Methionin-Dipeptide nach Überführung der Thiomethylfunktion in eine Abgangsgruppe verwendet werden.^{31,361} Ein achiraler Syntheseweg erschien notwendig, da die Alkylierung von geschütztem Methionin unter Standard-Alkylierungsbedingungen mit Isobutylbromid zu keinem Erfolg führte. Frühere Versuche *N*-(Boc)-geschützten Prolinmethylester mit Isobutylbromid zu alkylieren waren ebenfalls fehlgeschlagen. Den Schlüsselschritt der γ -Lactambildung stellte eine reduktive Aminierung^{356,362} zwischen der freien Aminofunktion der 3-Amino-3-phenyl-propansäure und der Aldehydfunktion des (Formylmethyl)-substituierten, geschützten Leucinderivats **91** an der festen Phase dar. Dabei wurde das intermediär gebildete Imin mit Natriumcyanoborhydrid in DCM reduziert.³¹² Die Zyklisierung zu dem γ -Lactam wurde ebenfalls an der festen Phase mit DIPEA in NMP ermöglicht. Die Kupplung mit der Isochinolincarbonsäure und der am Harz synthetisierten Vorstufe sollte unter Standard-Kupplungsbedingungen in Lösung²⁵⁴ durchgeführt werden, da die selektive Abspaltung der Boc-Schutzgruppe am Wang-Harz nicht ohne Belegungsverluste möglich ist. Bei der Entschützung der

N-(Boc)₂-geschützten Aminofunktion konnte jedoch nur vollständige Eliminierung zu dem ungesättigtem, 1,3-disubstituiertem 1*H*-Pyrrol-2(5*H*)-on-Derivat **92** beobachtet werden (Abb. 4.53).

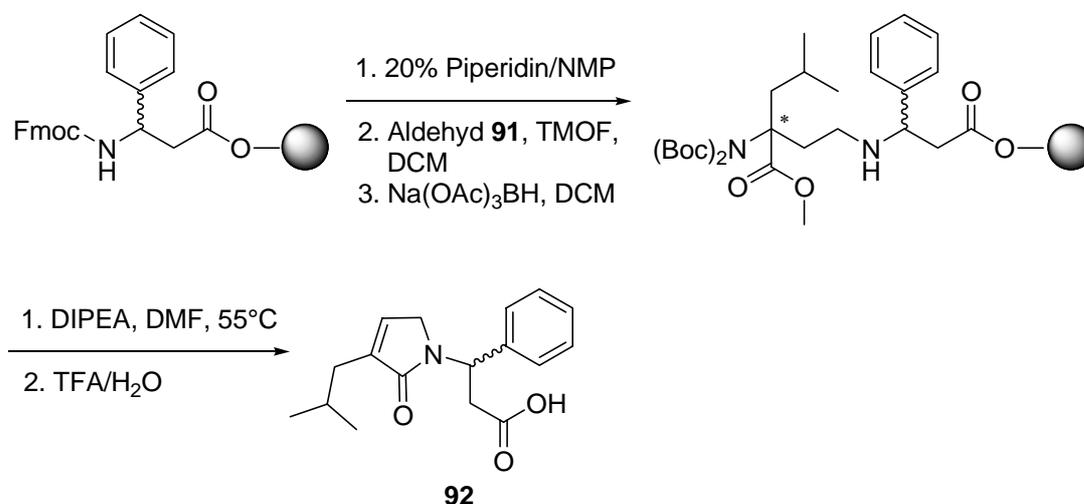


Abbildung 4.53: Strategie zur Synthese des γ -Lactams. Das 1*H*-Pyrrol-2(5*H*)-on-Derivat **92** entsteht als Hauptprodukt nach saurer Abspaltung vom Harz.

Das (Formylmethyl)-substituierte Leucinderivat **91** wurde nach Generierung des Enolats der Verbindung **89** mit Lithiumdiisopropylamin über eine Alkylierung in α -Position mit Allylchlorid³⁵⁶ und anschließender Osmiumtetroxid-katalysierter, oxidativer Spaltung des Alkens erhalten.³⁶³ Zur Alkylierung des Leucins musste die Aminofunktion des Leucins doppelt durch die Boc-Gruppe geschützt werden. Dazu wurde Leucinmethylesterhydrochlorid mit Boc₂O in *N*-Boc-Leucin **88** überführt, welches anschließend nach Deprotonierung mit LDA erneut mit Boc₂O zu dem *N*-(Boc)₂-Derivat **89** umgesetzt wurde und somit zur Alkylierung zur Verfügung stand.³⁶⁴

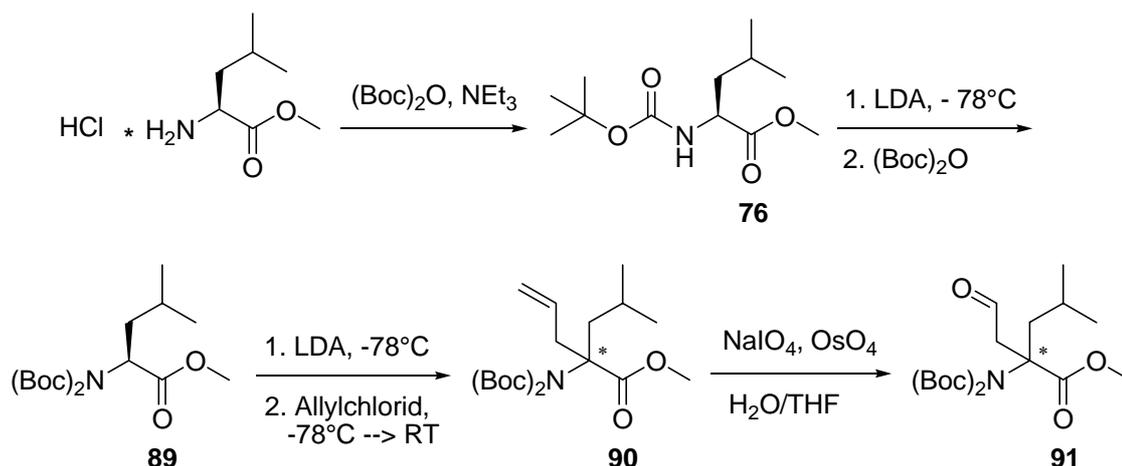


Abbildung 4.54: Synthese des *N*-(*Boc*)₂-(Formylmethyl)-Leucin-methylesters (91).

Nach dieser unerwarteten Nebenreaktion stellte sich die Frage, ob eine andere Schutzgruppenstrategie, wie zum Beispiel die Umschützung zu einem *N*-(Fmoc)-geschütztem (Formylmethyl)-Leucinmethylester, zum Erfolg führen würde. Weitere Versuche wurden jedoch nicht durchgeführt, da die Verwendung von anderen, bekannten wirkstoffbasierten Strukturen sich zu diesem Zeitpunkt als deutlich sinnvoller erwies.

4.6 Piperazin-2-one und Piperazine als Peptidmimetika

Eine weitere Möglichkeit zur Verbrückung einer Peptidbindung wird mit der Strukturmodifikation an der Leitstruktur **10** gezeigt, wobei in diesem Fall auf den Einbau von Piperazinonen bzw. Piperazinen besonders eingegangen werden soll (Abb. 4.55). Unterschiedlich substituierte 2-Oxopiperazine sind Bestandteile von *Leu-Enkephalin*-Analoga³⁶⁵, bzw. finden Anwendung als selektive Antagonisten des Neurokinin(NK)-2-Rezeptors³⁶⁶. Ein bibasischer GPIIb/IIIa-Integrinligand (RGD-Erkennungssequenz) auf der Basis eines 2-Oxopiperazin-Gerüsts, welches für den passenden Abstand zwischen den beiden ionischen pharmakophoren Gruppen verantwortlich ist, wurde vor kurzem in der Literatur beschrieben.³⁶⁷ Allgemein kann man behaupten, dass die Natur die Flexibilität des Glycinrestes dazu benutzt, verschiedene Liganden hervorzubringen, welche unterschiedliche RGD-Konformationen enthalten.²⁵⁰ Das 2-Oxopiperazin-Gerüst andererseits schränkt die Anzahl der Konformationen ein.

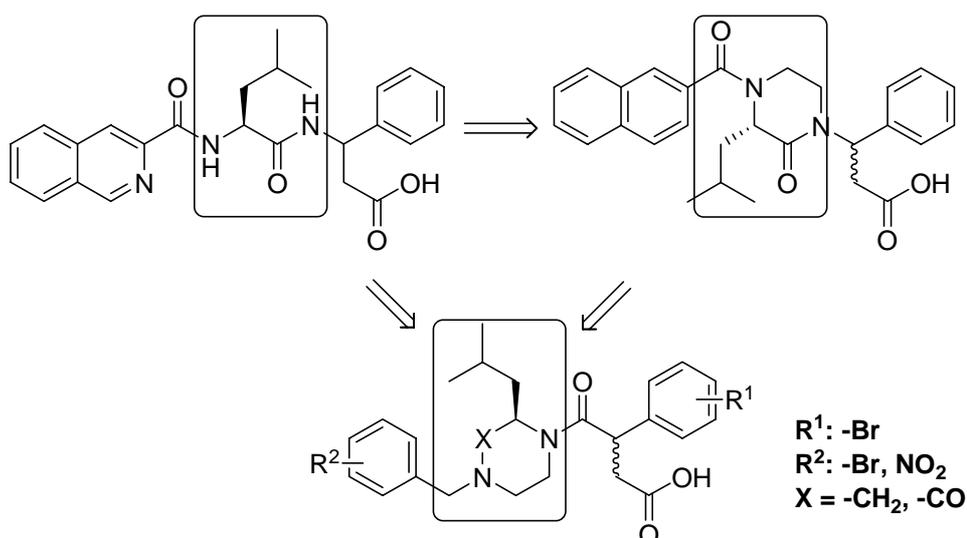


Abbildung 4.55: 2-Oxopiperazin bzw. Piperazin als Dipeptidmimetikum.

In den folgenden Syntheseschritten wird der Isochinolinrest der Leitstruktur durch einen Benzylrest ersetzt, der die Funktion des hydrophoben *N*-Terminus übernehmen sollte. Das *C*-terminale Ende wurde um eine Carbonylgruppe erweitert, da eine freie sekundäre Aminofunktion zu einer zwitterionischen Verbindung führen würde. Außerdem bietet das Piperazin-2-on-basierte Peptidmimetikum im Falle einer Aktivität gegenüber $\alpha_4\beta_7$ -Integrinen eine große Variationsvielfalt, zum Beispiel über die Einführung verschiedener Substituenten an den Aromaten. Dazu wurden sowohl Brom- als auch Nitro-substituierte 2-(Benzylamino)-ethanol-Derivate synthetisiert, die jedoch auf Grund des ungenauen Testsystems nicht bis zum Zielmolekül verfolgt wurden (Abb. 4.55). Eine Derivatisierung sollte über Palladium-katalysierte C-C-Kupplungsreaktionen oder Bildung von Amidbindungen nach Reduktion der Nitrogruppe an der festen Phase ermöglicht werden. Die 3-(Methoxycarbonyl)-2-phenylpropansäure des *C*-terminalen Endes wurde ebenfalls durch Bromsubstitution derivatisiert.

Die Synthese der Zielverbindung erfolgte über die Knüpfung der Amidbindung zwischen der sekundären Aminofunktion des 1-Benzylpiperazin-2-on-Derivats **97** und der freien Carboxylgruppe von 3-(Methoxycarbonyl)-2-phenylpropansäure (**101**) (Abb. 4.56).

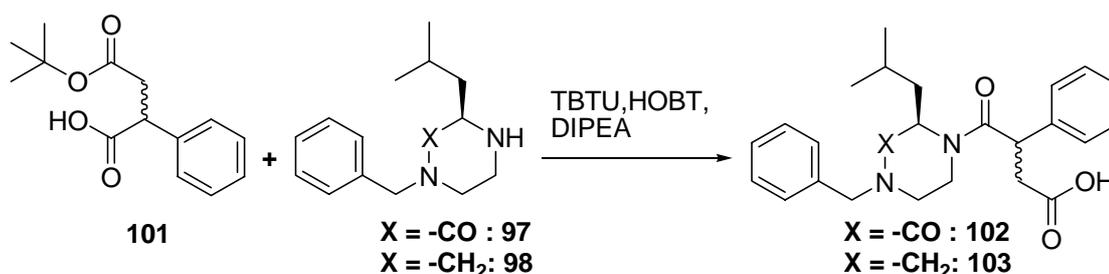


Abbildung 4.56: Schlüsselschritt der Synthese der Zielverbindungen **102** und **103**.

Das 1-Benzylpiperazin-2-on-Derivat kann retrosynthetisch in 2-(Benzylamino)-ethanol (**93**) und das *N-ortho*-Nitrosulfonamid des Leucins-OH **94** zerlegt werden.^{368,369} Zuerst wurde die Amidbindung nach Aktivierung der Säurefunktion des Leucinderivats mit Carbonyldiimidazol (CDI) zwischen der sekundären Aminofunktion des 2-(Benzylamino)-ethanols (**93**) und der freien Säure des Sulfonamidderivats **94** gebildet. Anschließend wurde die Möglichkeit der Aminierung und Ringschlussreaktion über eine *Mitsunobu*-Reaktion untersucht. Diese konnte mit sehr guten Ausbeuten durch *N*-Alkylierung des von Leucin abgeleiteten Sulfonamids **94** unter Verwendung von Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) und Triphenylphosphin erreicht werden. Das gewünschte 1-Benzylpiperazin-2-on-Derivat **97** wurde nach Entschützung der *N*-Arylsulfongruppe mit Thiophenol über eine nukleophile aromatische Substitution unter Verwendung von K_2CO_3 als Base in DMF erhalten (Abb. 4.57). Das entsprechende Sulfonamidderivat **94** war über eine *N*-Sulfonierung von Leucinmethylesterhydrochlorid und anschließende basische Hydrolyse mit NaOH in Methanol zugänglich. 2-(Benzylamino)-ethanol (**93**) wurde über eine reduktive Aminierung aus Aminoethanol und Benzaldehyd erhalten.³⁷⁰

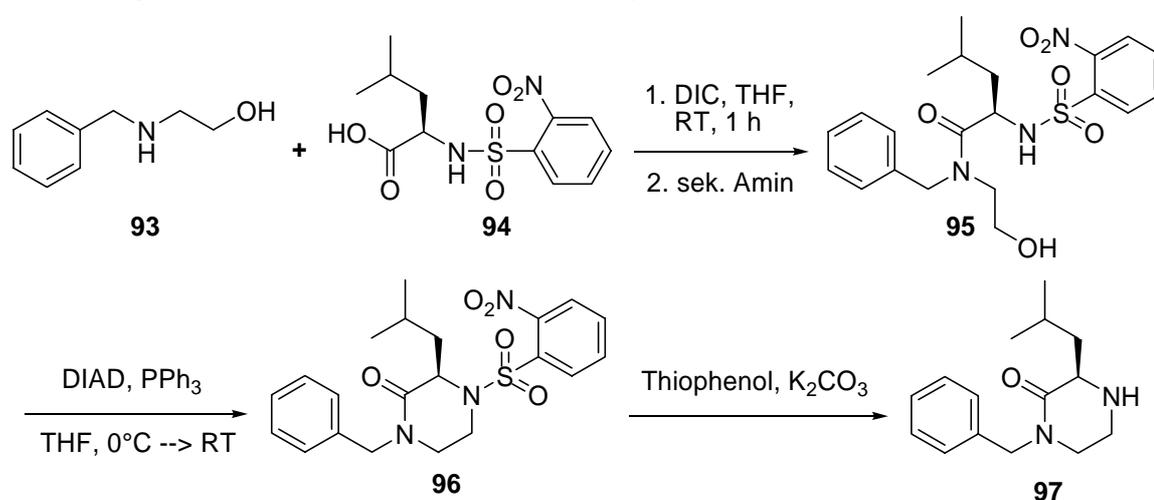


Abbildung 4.57: Synthese des *N*-Benzylpiperazin-2-on-Derivats **97**.

Ziel der Synthese von Peptidmimetika ist, die Anzahl der Amidbindungen zu verringern, was zur Erhöhung der metabolischen Stabilität der Verbindungen beitragen soll. Um diese Anforderungen zu erfüllen, wurde die Amidbindung des Piperazin-2-on-Derivats **97** mit Lithiumaluminiumhydrid in Ether zu einem Piperazinderivat **98** mit einer reduzierten Amidbindung (-NRCH₂-) reduziert und anschließend mit dem C-terminalen Rest **101** zu der Zielverbindung **103** umgesetzt (Abb. 4.56).

3-(*tert*-Butoxycarbonyl)-2-phenylpropansäure (**101**) wurde aus 2-Phenylessigsäure-*tert*-butylester (**99**) durch Alkylierung der CH-aciden Position mit α -Bromessigsäure-*tert*-butylester nach Generierung des Enolats mit Natriumhydrid in DMF erhalten. Selektive saure Hydrolyse des Methylresters mit NaOH in Methanol lieferte die für die Amidkupplung benötigte freie Säure **101** (Abb. 4.58).

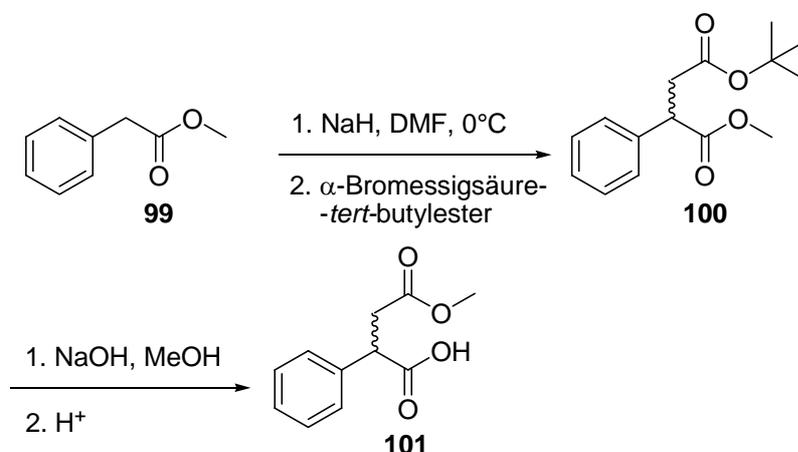


Abbildung 4.58: Synthese von 3-(*tert*-Butoxycarbonyl)-2-phenylpropansäure (**101**).

4.6.1 Beiträge zur Synthese von RGD-Mimetika

Das *N*-Alkyl-Piperazin-2-on-Gerüst sollte nun für die RGD-Erkennungssequenz verwendet werden und als Verbindungsstück für die ionischen pharmakophoren Gruppen dienen. Ein Aminopyridin sollte die Funktion des Guanidinmimetikums übernehmen^{246,371,372}, während ein Sulfonamid des Aspartats den C-terminalen Säurerest imitieren sollte.³⁷³⁻³⁷⁵ Das Aminopyridin kann über eine reduktive Aminierung der Aminofunktion des Pyridins und einem aliphatischen Aldehyd dargestellt werden. Als Schlüsselverbindung der Synthesestrategie sollte der 2-(2-Oxopiperazin-1-yl)-acetaldehyd dienen, welcher über eine Osmiumtetroxid-katalysierte oxidative Spaltung von 1-Allylpiperazin-2-on zugänglich sein sollte. Das 1-Allylpiperazin-2-on sollte über eine Alkylierung von 4-(*N*-*ortho*-Nitrosulfonamido)-2-Oxopiperazin **107** erhalten werden (Abb. 4.59).

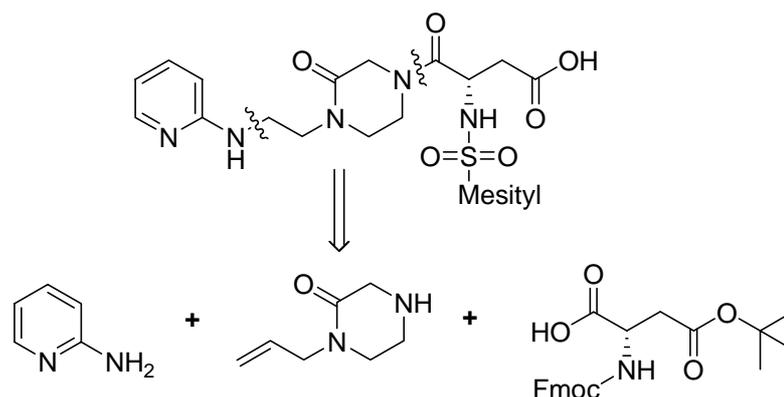


Abbildung 4.59: Retrosynthetische Zerlegung des RGD-Mimetikums.

Zur Synthese des 1-Allylpiperazin-2-ons musste ein Umweg beschritten werden, da die Synthese des 2-(Allylamino)-ethanols aufwändiger ist. Versuche, 2-Aminoethanol mit α -Bromessigsäureestern zu alkylieren, führten ebenfalls zu keinem Erfolg. Das 1-Allylpiperazin-2-on sollte aus dem *N-ortho*-Nitrosulfonamid des Glycins **104** und *tert*-Butyl-2-hydroxyethylcarbammat (**105**), welches durch *N-tert*-Butylcarbammat-Schutzung der Aminofunktion des Aminoethanols synthetisiert wurde³⁷⁶, erhalten werden. Nach der Aminierung des Sulfonamids mit dem *tert*-Butyl-2-hydroxyethylcarbammat (**105**) über eine *Mitsunobu*-Reaktion wurde die Boc-Schutzgruppe sauer abgespalten. Anschließend wurde das freie Amin unter basischen Bedingungen zum entsprechenden 4-(*N-ortho*-Nitrosulfonamido)-2-oxopiperazin (**107**) zyklisiert. Jedoch führte die Deprotonierung des Amids mit Natriumhydrid in DMF zur Zerstörung des Edukts (Abb. 4.60).^{377,378} Dies ist verwunderlich, läßt sich aber durch den sehr stark elektronenziehenden Substituenten erklären.

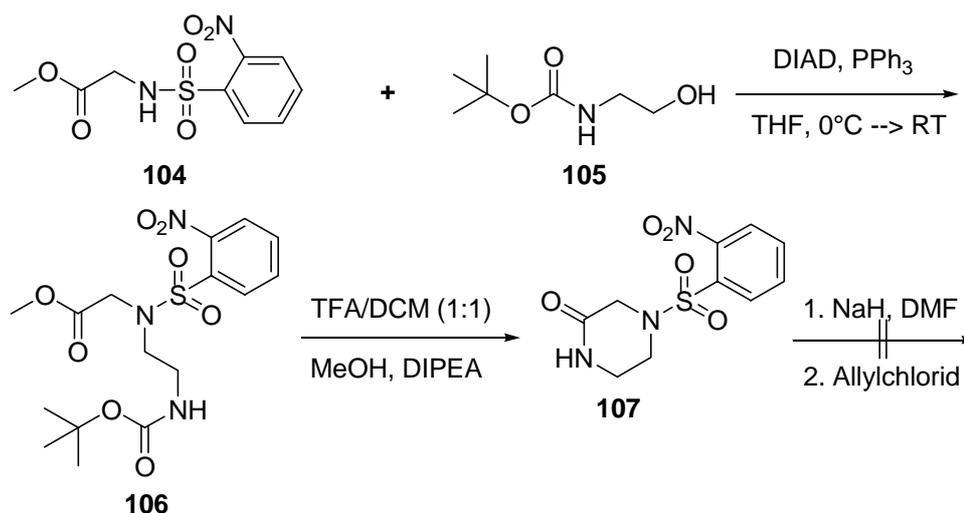


Abbildung 4.60: Synthese von 4-(N-ortho-Nitrosulfonamido)-2-Oxopiperazin (**107**).

Da die Allylierung bzw. Alkylierung mit α -Bromessigsäureestern unter keinen Bedingungen möglich war, wurde eine andere Synthesestrategie verfolgt, die auf der Allylierung der Zwischenstufe **106** beruht, welche über die Aminierung des Glycinderivats **104** mit *tert*-Butyl-2-hydroxyethylcarbammat (**105**) erhalten wurde. Dazu wurde die freie Aminofunktion nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe in das entsprechende Sulfonamid **108** überführt, welches anschließend mit Allylchlorid alkyliert wurde. Diese Synthesestrategie erschien auf Grund der Bildung von Produktgemischen bei der direkten Alkylierung von primären Aminen sinnvoll. Das Allylderivat **109** wurde anschließend durch eine Osmiumtetroxid-katalysierte Spaltung des Alkens in den Aldehyd überführt, der direkt ohne weitere Aufreinigung mit Aminopyridin reaktiv aminiert werden sollte (Abb. 4.61).³⁷⁵ Das Zielmolekül konnte jedoch nur in Spuren nachgewiesen werden. Die Abspaltung der *o*-Nitrosulfonamidgruppen und die Zyklisierung unter basischen Bedingungen wie oben beschrieben waren dadurch nicht möglich.

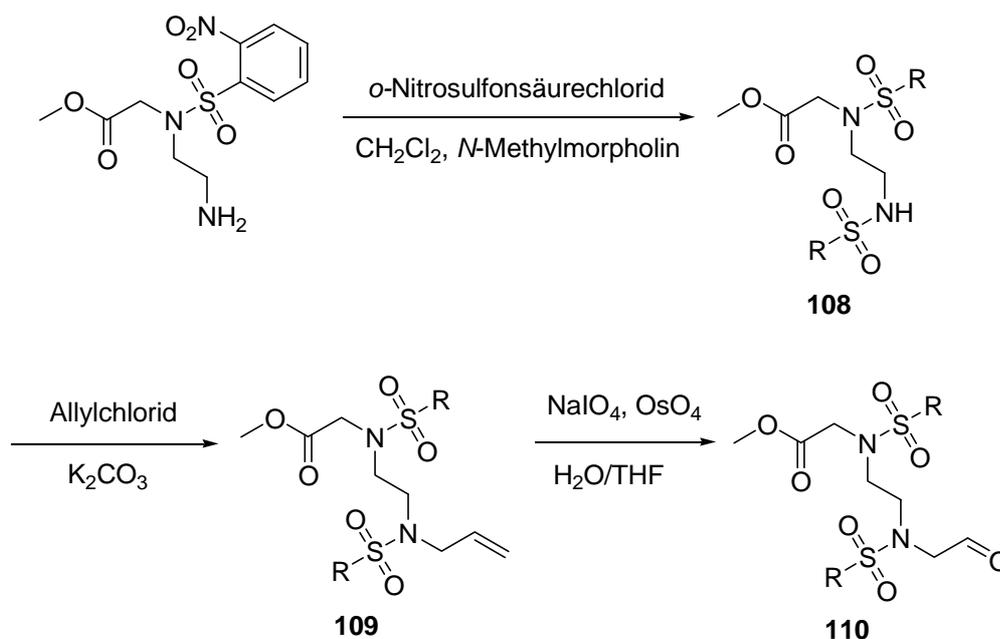


Abbildung 4.61: Alternative Synthesestrategie zur Darstellung von **110**.

Eine alternative Synthesestrategie ging von einem 1-(4-Nitrobenzyl)-piperazin-2-on-, bzw. 1-(3-Nitrobenzyl)-piperazin-2-on-Derivat **112** aus, welches analog des in Abbildung 4.57 beschriebenen Synthesewegs aus dem *N*-Sulfonamid des Glycins **104** und einem Nitro-substituierten 2-(Benzylamino)-ethanol dargestellt werden konnte (Abb. 4.62). Da eine teilweise Reduktion der Nitrogruppe zu erwarten war, wurden die 2-(Nitrobenzylamino)-ethanol-Derivate **111** jedoch nicht über eine reduktive Aminierung hergestellt, sondern durch *N*-Alkylierung des Aminoethanols mit den entsprechenden Benzylbromiden in Acetonitril mit Na_2CO_3 als Base. Nach Abspaltung der *o*-Nitrosulfonamidgruppe wurde die sekundäre Aminofunktion der Verbindung **112** mit der freien Säuregruppe von Fmoc-Asp(O^tBu)-OH unter Standardbedingungen in Lösung gekuppelt.²⁵⁴ Anschließend wurde der *tert*-Butylester durch saure Hydrolyse gespalten und die freie Säure **113** an Wang-Harz gekuppelt, an dem im Anschluß an die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit einem Überschuss von Mesitylsulfonsäurechlorid die Aminofunktion in das korrespondierende Sulfonamid **114** überführt wurde. Die Aminopyridin-Funktionalität wurde nach Reduktion der Nitrogruppe mit Zinn(II)chlorid²⁵³ durch eine nukleophile aromatische Substitution²⁵² mit 2-Chloro-3-nitropyridin an der festen Phase gebildet. Die Verbindungen zeigten jedoch gegenüber dem $\alpha_5\beta_1$ - und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin keine Aktivität.

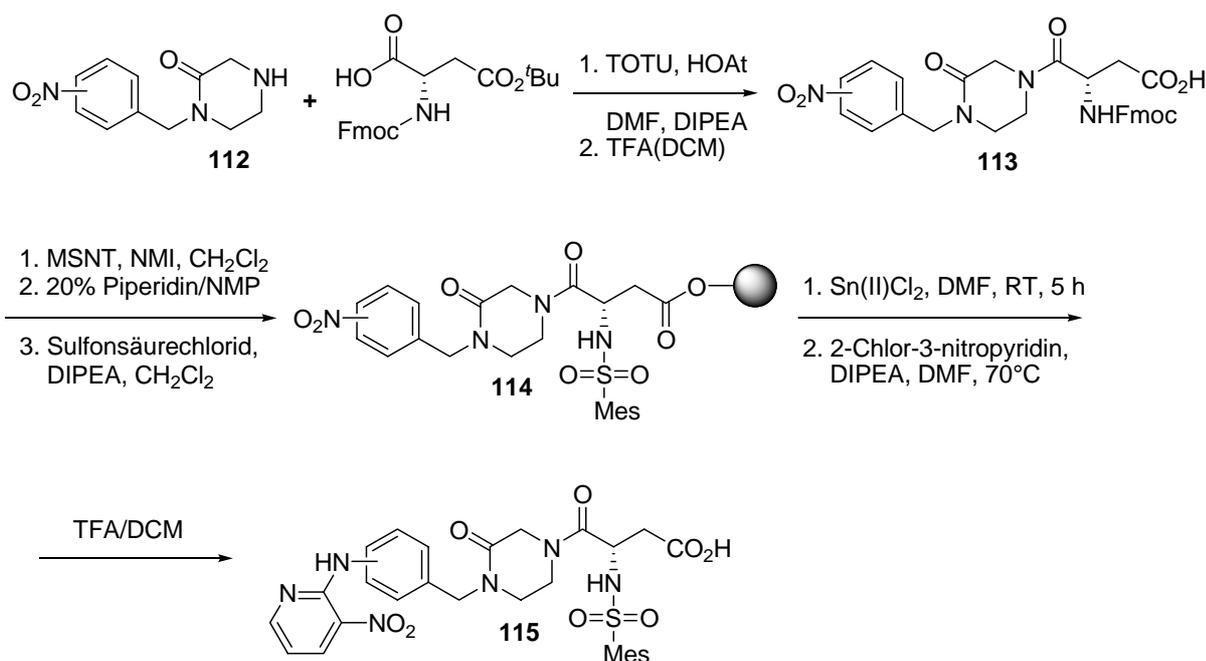


Abbildung 4.62: *Synthese eines RGD-Mimetikums mit einem 2-Oxopiperazin-Baustein.*

4.7 Fusionierte Bicyklische Ringsysteme als Mimetika

4.7.1 Einleitung

Allgemein kann man nicht sagen, dass ein Ligand in einer einzigen Konformation an den Rezeptor bindet, sondern verschiedene Typen von β - und γ -turns als rezeptorgebundene Konformationen postuliert werden. Um die strukturellen Erfordernisse der Erkennungssequenz aufzuklären, wurden einige Mimetika der tripeptidischen Leitstruktur synthetisiert. Strukturen, welche eine durch ein vielfältiges Grundgerüst getrennte Säuregruppe und hydrophobe Gruppe enthalten, sind dafür geeignet, die räumliche Konfiguration der LDT-Erkennungssequenz nachzuahmen. Bei einem nicht passenden Abstand zwischen den funktionellen Gruppen sollte keine Integrininhibierung zu beobachten sein. Diese Annahmen suggerieren, dass die Rolle des Peptidrückgrates darin besteht, die richtige Orientierung der pharmakophoren Gruppen zu diktieren, wobei hydrophobe Wechselwirkungen nicht auszuschließen sind. Allgemein kann man von einem zentralen Grundgerüst ausgehen, an dem sowohl die Säurefunktionalität als auch die Isobutylgruppe angehängt sind.

Sehr gute Erfolge bei der Entwicklung nicht-peptidischer Grundgerüste, welche die rezeptorgebundene Konfiguration nachahmen, wurden für $\alpha_{11b}\beta_3$ -selektive Liganden

erzielt.^{86,379} Dabei wurde versucht die gebogene, hohle Gestalt der RGD-Erkennungssequenz auf ein rigides, pharmazeutisch toleriertes 6,7-Benzodiazepin-Gerüst zu übertragen.^{248,380-384} Analog zu den zuvor vorgestellten Versuchen diente ein zyklisches Peptidanalogen von *Eptifibatide*, ein Disintegrin aus dem Sekret von Schlangen, als Vorlage dazu, einen β -turn um die Gly-Asp-Position mit einem fusioniertem 6,6-Ringsystem zu imitieren (Abb. 4.63).^{249,385,386}

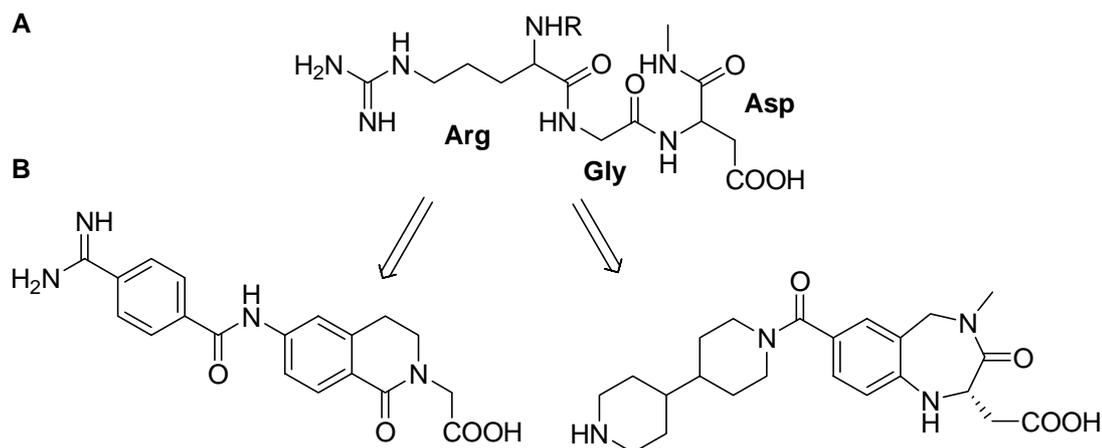


Abbildung 4.63: Schematische Darstellung des β -turns der RGD-Sequenz (A). Nicht-peptidische Mimetika, welche die gebogene, hohle Gestalt nachahmen (B).

4.7.2 Benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dion als Grundgerüst

Zur Darstellung eines Benzodiazepin-Gerüsts wurde ein 3,4-Dihydro-1*H*-benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dion-Derivat ausgewählt, welches an der 2-Position mit der Isobutylgruppe und einem Säurerest funktionalisiert ist (Abb. 4.64). Der aromatische, annelierte Rest sollte dabei die Funktion des hydrophoben Bereichs übernehmen.

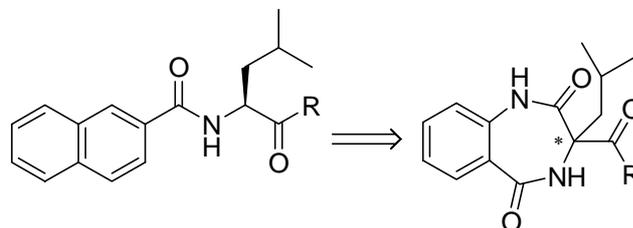


Abbildung 4.64: Benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dion als LDT-Mimetikum.

Ausgangsverbindung zur Synthese des Benzodiazepin-Grundgerüsts war 2-Nitrobenzoesäure, welche nach Überführung in das entsprechende Säurechlorid **116** ohne weitere Aufreinigung mit 2-Amino-2-isobutylmalonsäureethylester (**118**) zu dem Amid **119** reagierte. 2-Amino-2-isobutylmalonsäureethylester (**118**) wurde aus

2-Aminomalonsäureethylester nach Schützen der freien Aminofunktion als *tert*-Butylcarbammat **117** und Alkylierung des mit Natriumhydrid generierten Enolats mit Isobutylbromid erhalten. Anschließende Reduktion der Nitrogruppe unter H_2 -Atmosphäre von 1 atm mittels Palladium führte zur Isolierung sowohl des freienamins als auch der zyklisierten Verbindung **120**. Die vollständige Zyklisierung wurde im nächsten Schritt mit Natriumethanolat in absolutem Ethanol erreicht. Basische Hydrolyse des Ethylesters mit Natriumhydroxid in Methanol lieferte die freie Säure, welche somit für die Kupplung mit 3-Amino-3-phenyl-propansäuremethylester (**20**) zugänglich war (Abb. 4.65).

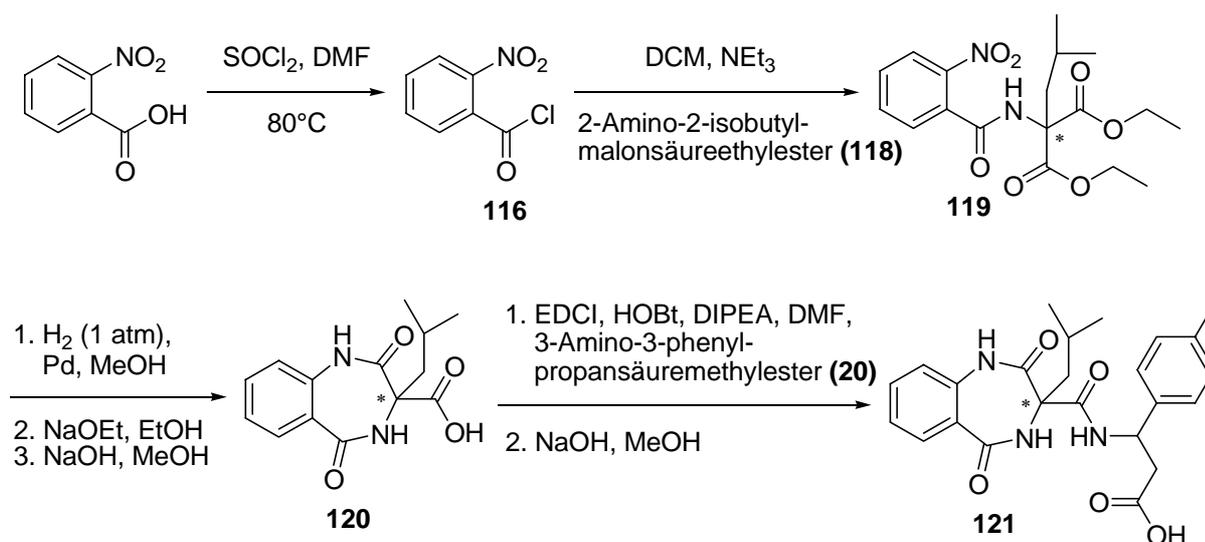


Abbildung 4.65: Synthese des 3,4-Dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dions (**120**).

4.7.3 2H-Benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-on-Derivate als 6,6-bizyklisches Grundgerüst

Eine weitere Synthesestrategie ging von einem 4-Methyl-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-on Grundgerüst aus, welches an der 2-Position mit einem Säure-funktionalisierten Benzylbromid substituiert wurde. Der aromatische, annelierte Rest sollte dabei die Funktion des hydrophoben *N*-Terminus übernehmen, welcher bekanntermaßen für die Aktivität des Liganden wichtig ist. Die Rolle der pharmakophoren Isobutylgruppe sollte dabei von dem 4-Methylmorpholin-3-on übernommen werden (Abb. 4.66). In der Literatur sind einige Beispiele von Pyrrolidinon-substituierten *N*-Acylphenylalaninen bekannt.^{213,387,388} Außerdem wurde die Verwendung von sulfonylierten (L)-Prolyl-biphenylalanin-Dipeptidderivaten als potente VLA-4

Liganden untersucht.^{209,214,389-394} In einigen Beispielen wurde sogar vollständig auf ein (L)-Prolyl-biphenylalanin-Dipeptid verzichtet und der (L)-Prolylrest durch ein N-Cycloalkanoyl- bzw. N-Aroyl-(L)-Phenylalaninderivat ersetzt.^{395,396}

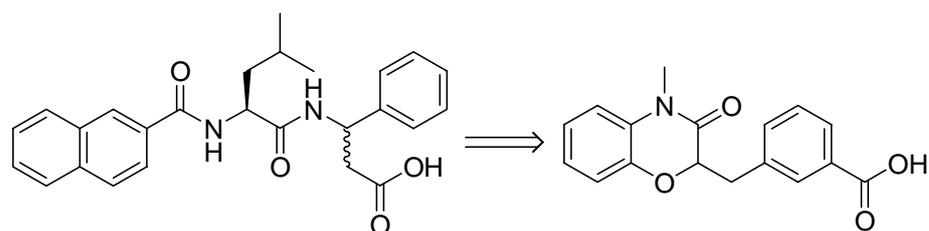


Abbildung 4.66: 2H-Benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-on als Mimetikum.

Die stereoselektive Alkylierung von substituierten Morpholin-2-onen ist eine bekannte Reaktion und wurde besonders von Williams *et al.* untersucht.³⁹⁷ Im Gegensatz dazu fanden substituierte Morpholin-3-one keine große Anwendung als CH-acide Verbindungen, bis die entsprechenden Lithiumenolate erfolgreich mit Alkylhalogenverbindungen alkyliert wurden.³⁹⁸⁻⁴⁰¹ Im Verlauf der fortschreitenden Forschung in der medizinischen Chemie dienten Derivate von 2H-Benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-onen als nützliche Peptidmimetika auf Grund ihrer Fähigkeit, leicht in 2- und 4-Position und am aromatischen Rest funktionalisiert zu werden.⁴⁰²⁻⁴⁰⁷ Einerseits können 2-substituierte Benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-on-Derivate über zwei Stufen durch Kondensation von *ortho*-Aminophenol mit α -Halogenacyl-Halogeniden⁴⁰⁴ oder alkylsubstituierten α -Halogenessigsäureestern⁴⁰⁸⁻⁴¹⁰ und anschließender Zyklisierung des Intermediates hergestellt werden. Andererseits ist eine Alkylierung von Nitrophenol mit alkylierten α -Halogenessigsäureestern und Lactonisierung des Intermediates nach Reduktion der Nitrogruppe möglich.^{402,411-413} Bisher gibt es erst wenige Berichte über die nukleophile Addition von 2H-Benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-onen an Carbonylverbindungen, welche sich mit der Reaktivität der resultierenden Aryliden- und Aroylderivate sowohl gegenüber C- und N-Nukleophilen als auch 1,3-Dipolen beschäftigen.⁴¹⁴⁻⁴¹⁶ Der folgende Schlüsselschritt zur Synthese der Zielverbindungen beschreibt die direkte Alkylierung von Benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-on über das intermediär gebildete Enolat. Anschließende Alkylierung der Enolatzwischenstufe mit einem Elektrophil, wie zum Beispiel substituierten Brombenzyl, führte zur bequemen Einführung eines Substituenten in 2-Position. Der Vorteil der direkten Alkylierung liegt in der Darstellung von 2-substituierten Benzoxazinen, ohne sie ausgehend von azyklischen Vorstufen aufbauen zu müssen. Die direkte Alkylierung in 2-Position wurde bis *dato* nicht dokumentiert. Trotzdem untersuchten Kikelj *et al.* die Alkylierung von Benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-on-2-carboxylester und entdeckte die 2-Hydroxylierung

der gleichen Verbindung nach Deprotonierung mit Natriumhydrid.^{417,418} Für die gewählte Synthesestrategie erbrachte diese direkte Alkylierung große Vorteile, da das Elektrophil sehr leicht in wenigen Stufen zugänglich war (Abb. 4.67).

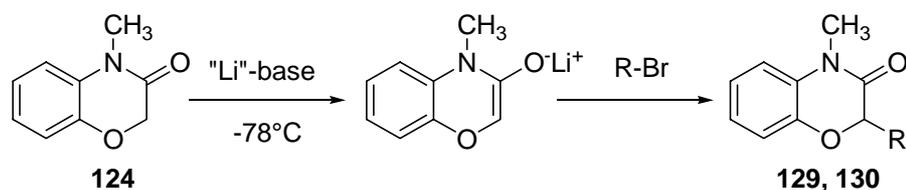


Abbildung 4.67: Allgemeine Synthesestrategie.

Die Synthese der Benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-on-Derivate erfolgte über eine Kombination von veröffentlichten Prozeduren^{402,412}, die von 2-Nitrophenol als Startverbindung ausgingen. 2-Nitrophenol wurde in refluxierendem Aceton mit α -Bromessigsäuremethylester in Anwesenheit von Kaliumcarbonat zu dem *O*-alkyliertem Produkt **122** umgesetzt. Anschließende Reduktion der Nitrogruppe und Lactamisierung lieferte 2*H*-Benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-on (**123**) in sehr guter Ausbeute von 80% über zwei Stufen. Letztere Verbindung wurde durch Reaktion mit Methyljodid in Natriumhydrid/DMF in das gewünschte *N*-methylierte 4-Methylbenzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-on (**124**) überführt und somit für die Alkylierung in 2-Position zugänglich (Abb. 4.68).

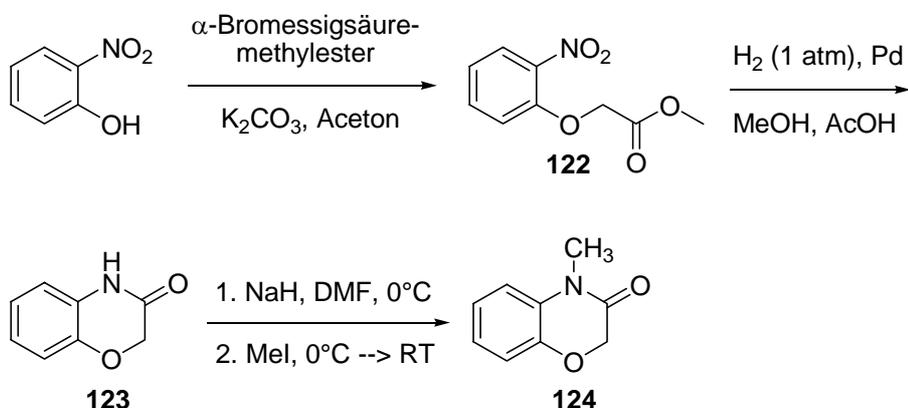


Abbildung 4.68: Synthese von 4-Methyl-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-on (**124**).

Die Benzylbromide **126** und **128** wurden als elektrophile Alkylierungsreagenzien aus kommerziell erhältlichen Vorstufen synthetisiert. Schlüsselreaktion ist jeweils eine radikalische Bromierung mit NBS in refluxierendem Tetrachlorkohlenstoff.⁴¹⁹ *Meta*-Tolylsäure konnte nach der Seitenkettenbromierung und anschließender Überführung der freien Säurefunktion in den *tert*-Butylester **126** mit *tert*-Butyltrichloracetimidat unter $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ -Katalyse⁴²⁰ direkt zur Alkylierung des Enolats von 4-Methyl-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-on (**124**) eingesetzt werden

(Abb. 4.69). Außerdem wurde das Ziel verfolgt, die Säurefunktionalität um eine Methylen-Einheit zu verlängern. Dazu wurde 2-*meta*-Tolylessigsäure verwendet, welche nach Überführung in den Methylester an der α -Position nach Generierung des Enolats mit LDA zweifach methyliert wurde. Die Methylierung war auf Grund der selektiven radikalischen Seitenkettenbromierung erforderlich, da die Bromierung ohne vorhergehenden Schutz der α -Position zur Bromierung derselben geführt hätte. Anschließende radikalische Bromierung der Verbindung **127** und basische Hydrolyse des Methylesters lieferte die freie Säure, welche nach Überführung in den *tert*-Butylester **128** in der Alkylierungsreaktion verwendet werden konnte (Abb. 4.69).

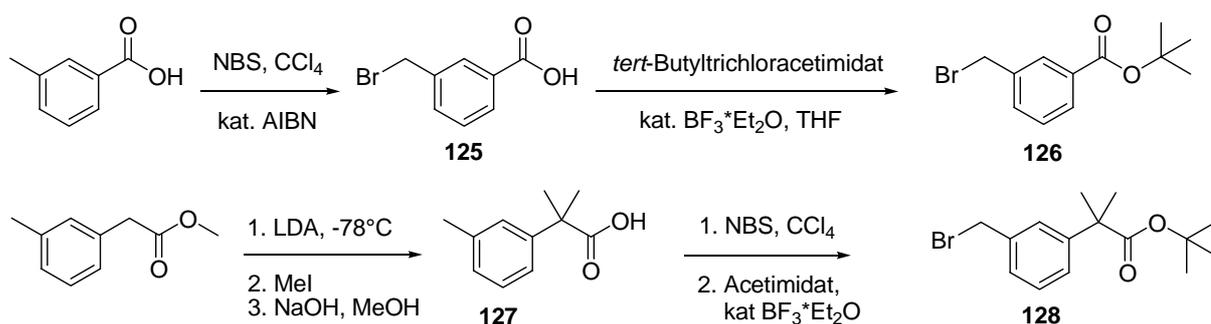


Abbildung 4.69: Synthese der Benzylbromid-Derivate **126** und **128**.

Es wurde außerdem die Substitution in 2-Position unter verschiedenen literaturbekannten Reaktionsbedingungen untersucht.⁴¹⁴⁻⁴¹⁶ Das Enolat, sofern es überhaupt gebildet wurde, konnte aber unter keinen Bedingungen – wie zum Beispiel mit Natriumhydrid in refluxierendem Toluol oder Natriummethanolat in Methanol – alkyliert werden. Darüberhinaus berichteten Babudri *et al.* über die Alkylierung von 2*H*-Benzo[*b*][1,4]thiazin-3(4*H*)-on nach Generierung des Enolats mit Lithiumdiisopropylamid in THF bei -78°C .⁴²¹ Das Amid-Enolat konnte schließlich in DME/THF 5:1 bei -78°C unter Verwendung von $\text{LiN}(\text{SiMe}_3)_2$ als Base hergestellt werden und lieferte nach Reaktion mit den Elektrophilen **126** und **128** bei gleicher Temperatur die gewünschten Zielverbindungen **129** und **130** in guten Ausbeuten. Sowohl die Verwendung von DME als auch einer sperrigen Lithiumbase - mit Lithiumdiisopropylamid konnte keine Umsetzung verzeichnet werden - war für die Darstellung des Produkts entscheidend (Abb. 4.70).

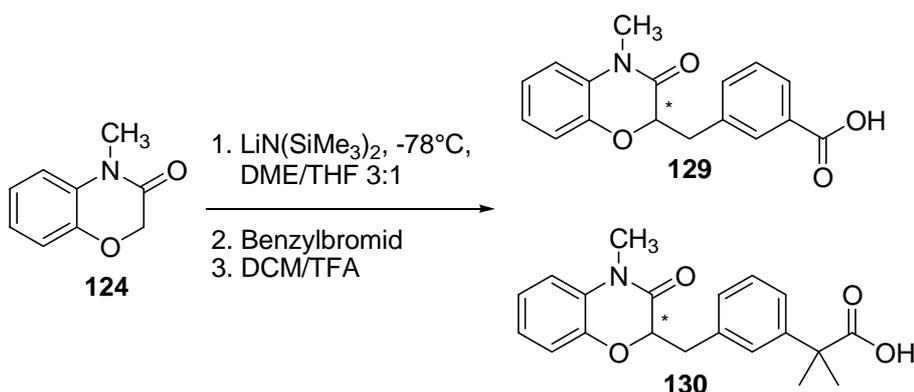


Abbildung 4.70: Synthese der Zielverbindungen **129**, **130** über die direkte 2-Substitution.

Um den Einfluss eines weiteren Wasserstoff-Akzeptors zu untersuchen und die Wasserlöslichkeit zu erhöhen, wurde die Alkylierung mit von 2-Nitropyridin-3-ol abgeleitetem 4-Methyl-2*H*-pyrido[3,2-*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-on (**131**) zu dem entsprechenden Produkt **132** durchgeführt (Abb. 4.71). Die Darstellung der Verbindung **131** erfolgte analog der in Abbildung 4.68 beschriebenen Synthesestrategie.

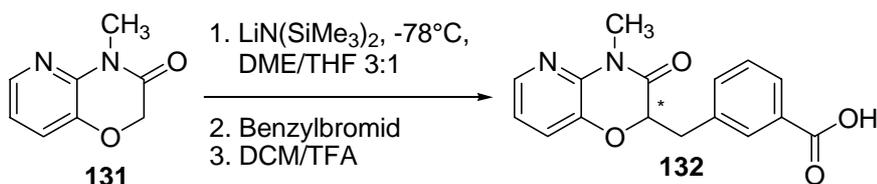


Abbildung 4.71: Synthese der Zielverbindung **132** über die direkte 2-Substitution.

In Analogie zu den 2*H*-Benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-onen sollten auch *N*-Benzyl-oxazin-3(4*H*)-one untersucht werden, welche anschließend durch Alkylierung⁴²² mit den oben dargestellten säurefunktionalisierten Benzylbromiden zu den entsprechenden Zielverbindungen umgesetzt wurden. Als Ausgangsverbindung für die Synthese von *N*-Benzyl-oxazin-3(4*H*)-on (**133**) diente 2-(Benzylamino)-ethanol (**93**), der über eine reduktive Aminierung aus Benzaldehyd und Aminoethanol dargestellt wurde.³⁷⁰ Selektive *N*-Alkylierung mit α -Bromessigsäure in Toluol unter Verwendung von DIPEA als Base und nachfolgende Lactonisierung in siedendem, absolutem Toluol mit einer katalytischen Menge *para*-Toluolsulfonsäure lieferte das Oxazin-3(4*H*)-on **133** in quantitativer Ausbeute über zwei Stufen (Abb. 4.72).⁴²³ Bei der Verwendung von Nitro-substituiertem 2-(Benzylamino)-ethanol als Ausgangsverbindung konnte man bei der Alkylierung des Oxazin-3(4*H*)-ons nur eine Zersetzung des Enolats beobachten. Nach Reduktion der Nitrogruppe sollte die gebildete freie Aminofunktion

über eine nukleophile, aromatische Substitution mit 2-Chloro-3-nitropyridin umgesetzt werden. Ein Aminopyridin als Guanidinmimetikum führt bei einer Reihe von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinliganden zur Aktivitätssteigerung und wurde deshalb verwendet.^{371,372}

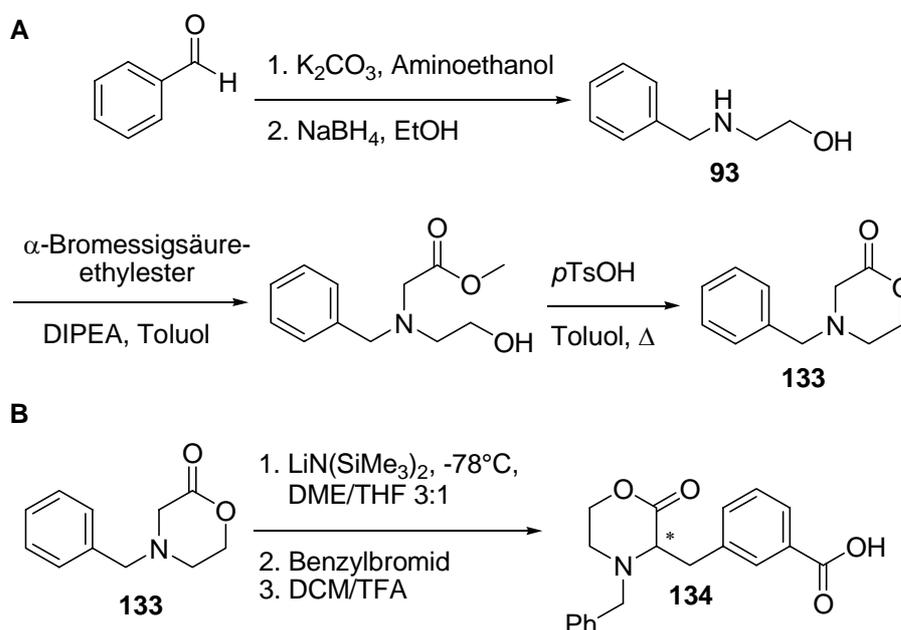


Abbildung 4.72: Synthese von *N*-Benzyl-oxazin-3(4*H*)-on (**133**) (A). Synthese der Zielverbindungen **134** (B).

4.7.4 2*H*-Benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-on-2-carbonsäure-Derivate als 6,6-bizyklisches Grundgerüst

Das Benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-on-Grundgerüst scheint auf Grund der guten Löslichkeit und der Applikation in der medizinischen Chemie ein geeignetes Mimetikum zu sein. Im Gegensatz zu den oberen Beispielen, bei denen Morpholin-2-on bzw. Morpholin-3-on ein Leucinmimetikum darstellen sollte, wurde nun das 2*H*-Benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-on-2-carbonsäure-Gerüst in 2-Position mit dem pharmakophoren Leucinrest substituiert. Zusätzlich zu dem Leucinrest wird auch die Fähigkeit zur Ausbildung einer weiteren Wasserstoffbrücken-Bindung geboten, da der pharmakophore Säurerest über eine Amidbindung zwischen der Carboxylatgruppe des Benzoxazin-3-on und der 3-Amino-3-phenylpropansäure gekuppelt wurde (Abb. 4.73).

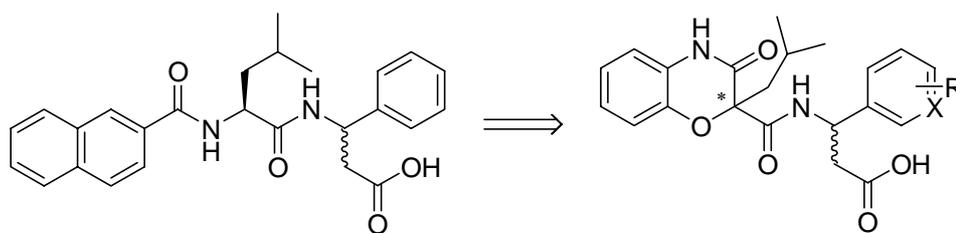


Abbildung 4.73: 2*H*-Benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-on-2-carbonsäure-Derivate als Grundgerüst.

Die Synthese der 2-Alkyl-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-on-2-carbonsäure-Derivate erfolgte analog zum beschriebenen Syntheseweg. Ausgangsverbindungen für die *O*-Alkylierung waren jedoch 2-Alkyl-2-brommalonsäuremethylester **138** und **139** und 2-Nitrophenol.^{402,412} Nach der Alkylierung erfolgte die Lactamisierung in einem Schritt unter Reduktion der Nitrogruppe bei einer H₂-Atmosphäre von 1 atm mittels eines Palladium(0)-Katalysators in Methanol zu dem gewünschten Methylester, der durch basische Hydrolyse mit NaOH in MeOH bei RT in die Säure **140** und **141** überführt wurde (Abb. 4.74). Die 2-Alkyl-2-brommalonsäuremethylester **138** und **139** wurden über eine Alkylierung des Malonsäureesterenolats mit Methyljodid bzw. Isobutylbromid hergestellt. Bromierung in α -Position zur Carboxylgruppe mit elementarem Brom lieferte die für die *O*-Alkylierung zugänglichen Verbindungen **138** und **139** ohne weitere Aufreinigung. Die Alkylierung mit 2-Bromo-2-methylmalonsäuremethylester **138** verlief quantitativ zu dem *O*-alkylierten Produkt 2-(2-Nitrophenoxy)-2-methylmalonsäuremethylester, während die Umsetzung mit 2-Bromo-2-isobutylmalonsäuremethylester vermutlich auf Grund der sterischen Hinderung in sehr schlechten Ausbeuten verlief. Die anschließende Lactamisierung stellte in keinem Fall ein Problem dar.

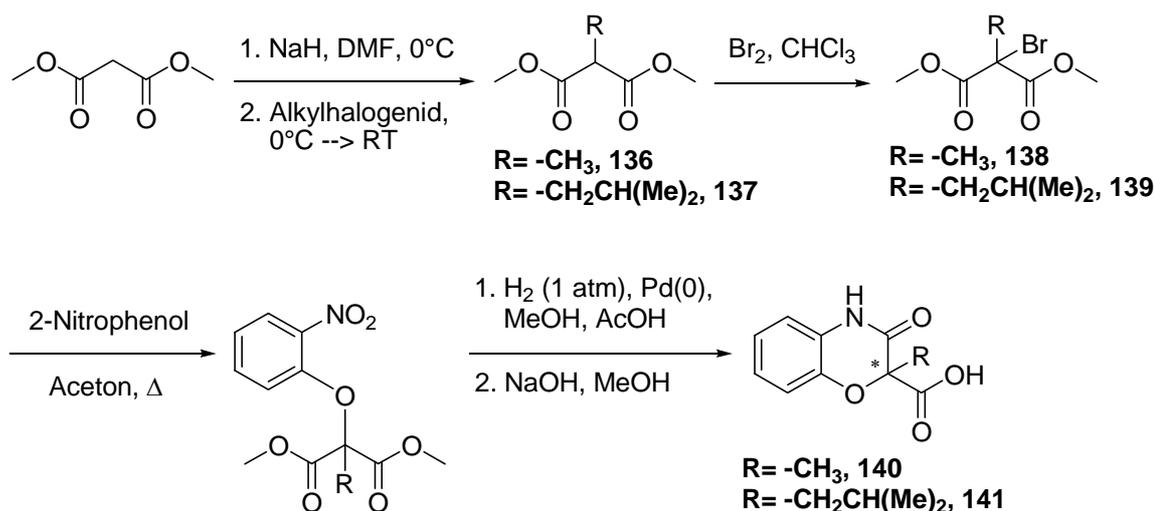


Abbildung 4.74: Synthese der 2-Alkyl-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-on-2-carbonsäure-Derivate **140** und **141**.

Mit dem Ziel, die Ausbeute bei der *O*-Alkylierung zu verbessern, wurden auch Methoden untersucht, die unter milderer Bedingungen verlaufen. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Verwendung von Kaliumfluorid gelegt, welches aufgrund seines basischen Charakters in nicht-polaren Lösungsmitteln⁴²⁴ und der Tendenz Wasserstoffbindungen auszubilden, große synthetische Anwendung bei *C*-, *O*- und *S*-Alkylierungen gefunden hat.^{425,426} Diese Ergebnisse veranlassten dazu, Kaliumfluorid bei der Synthese der 2-Isobutyl-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-on-2-carbonsäure (**141**) zu verwenden (Abb. 4.75).^{413,418,427} Die *O*-Alkylierung wurde in DMF unter Zusatz von KF bei 60°C über 5 Stunden durchgeführt. Eine Steigerung der Ausbeute konnte jedoch nicht beobachtet werden. Der schlechte Umsatz ist schließlich auf die sterische Hinderung des Isobutylrestes zurückzuführen.

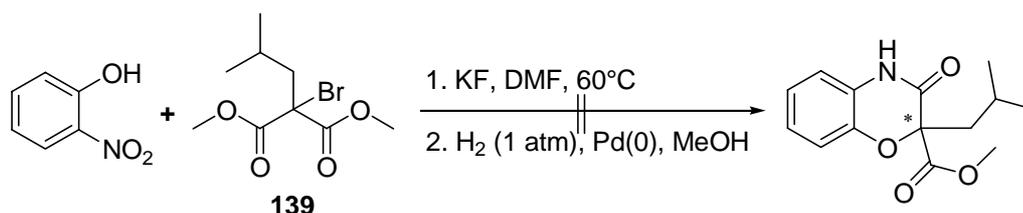


Abbildung 4.75: Alternative Syntheseroute zur Darstellung von 3,4-Dihydro-2-isobutyl-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-on-2-carbonsäure (**141**).

Die Zielverbindungen wurden schließlich durch Kupplung der 2-Alkyl-2H-benzo[b][1,4]oxazin-3(4H)-on-2-carbonsäure-Derivate **140** und **141** mit jeweils 3-Amino-3-phenyl-propansäure (**20**), 3-Amino-3-(6-methoxypyridin-2-yl)- und 3-Amino-3-(6-methoxypyridin-3-yl)-propansäure (**73**) unter Standard-Fmoc-Kupplungsbedingungen an der festen Phase erhalten (Tab. 3).²⁵¹ Um den Einfluss der

β -Aminosäure auf die Aktivität zu untersuchen, wurde die Säure **141** mit 3-(Aminomethyl)benzoesäure-*tert*-butylester (**142**) umgesetzt. Letztere wurde aus 3-(Bromomethyl)benzoesäure-*tert*-butylester (**126**) über eine nukleophile Substitution mit Natriumazid in DMF und anschließende Reduktion bei einer H_2 -Atmosphäre von 1 atm mittels Pd(0) in Methanol erhalten. Nach saurer Hydrolyse der *tert*-Butylester erhielt man die Zielverbindungen als freie Säuren.

Tabelle 4: Liganden mit 2*H*-Benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-on-2-carbonsäure-Grundgerüst.

Verbindung	Strukturformel	Verbindung	Strukturformel
143		146	
144		147	
145		148	
149			

4.8 Biologische Evaluation

Die Synthese der Endverbindungen diente der Entwicklung neuer $\alpha_4\beta_7$ -Integrinantagonisten. Die dabei gewonnenen Informationen sollten für die Entwicklung neuartiger $\alpha_4\beta_7$ -Integrinantagonisten verwendet werden. Die biologischen Tests wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Bernhard Holzmann und Dr. Monika Semmrich, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar durchgeführt.

4.8.1 Zelladhäsionsassay - Allgemeine Testbedingungen

Die Untersuchung der Verbindungen auf ihre biologische Aktivität erfolgte mit Zelladhäsionsassays. Dazu wurden 96er Mikrotiterplatten mit dem entsprechenden natürlichen Liganden MAdCAM-1 beschichtet. $\alpha_4\beta_7$ -Integrin-exprimierende Zellen wurden fluoreszenzmarkiert und mit der Testsubstanz inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Mikrotiterplatte aufgebracht und die Intensität der Fluoreszenz bestimmt. Nach halbstündiger Inkubation wurden nicht adhärierte Zellen durch inverse Zentrifugation entfernt. Adhärierte Zellen konnten durch erneutes Messen der Fluoreszenz quantifiziert werden. Dabei ist die Abnahme der Fluoreszenz ein Maß dafür, wie stark die Verbindung die Ligand-Protein-Wechselwirkung inhibieren kann. Die Zelladhäsion wurde bei einer Konzentration von 1 mg/mL gemessen. Die so erhaltenen Werte stellen keine Fixgrößen dar, sondern sie erlauben auf Grund der Streuung des Testsystems nur generelle Aussagen über aktive und nicht-aktive Verbindungen. Dabei repräsentiert jeder Messwert den Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, bestehend aus drei Einzelmessungen.

Bei der Beschichtung der Mikrotiterplatten kann durch Variation der Ligandkonzentration die Empfindlichkeit des Testsystems eingestellt werden. Die Empfindlichkeit des Testsystems steigt, wenn die Ligandkonzentration verringert wird. Um stets reproduzierbare Werte zu erhalten ist es wichtig, dass sich bei der biologischen Testung das Verhältnis Zellen/Ligand entweder im Sättigungsbereich bzw. knapp unterhalb davon befindet. Alle Verbindungen wurden mit einem Testsystem untersucht, bei dem das Verhältnis Zellen/Ligand im Sättigungsbereich lag.

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um $\alpha_4\beta_7$ -Integrin-exprimierende 38C13 β_7 -Zellen (B Lymphoma-Zelllinie). Da bei der Entwicklung eines Wirkstoffes die Selektivität oftmals eine entscheidende Rolle spielt, wurden die synthetisierten Verbindungen in den folgenden Testsystemen evaluiert: 38C13 β_7 -Lymphoma-Zellen/MAdCAM-1 und Jurkat-Zellen/VCAM-1. Sowohl VCAM-1 als auch MAdCAM-1 gehören zu den endogenen Liganden der $\alpha_4\beta_7$ -Integrine. Die Bindungsmotive beider Liganden sind sehr ähnlich. $\alpha_4\beta_7$ -Integrine erkennen in MAdCAM-1 die (-GLDTS-)-Sequenz, in VCAM-1 die (-QIDSP-)-Sequenz. $\alpha_4\beta_1$ -Integrine binden ebenfalls über die (-QIDSP-)-Sequenz an VCAM-1. Die Selektivitätstests stellen auch einen internen Kontrollversuch dar. Weist eine Verbindung nur in einem Testsystem eine biologische Aktivität auf und in einem anderen nicht, so kann davon ausgegangen werden, dass diese Verbindung einen

spezifischen Effekt hervorruft. Zudem wurden alle *wells* einer Mikrotiterplatte unter dem Mikroskop überprüft, ob sich während der biologischen Testung ein Niederschlag bildete oder die Zellen deformiert waren.

Oftmals werden in der Literatur Integrinliganden an aktivierten Integrinrezeptoren getestet. Die Ergebnisse dieser Tests sind aber hinsichtlich ihrer *in vivo* Aussagekraft fraglich. Zum einen fehlen isolierten Integrinrezeptoren wichtige Funktionen, wie etwa die Möglichkeit zur Signaltransduktion oder auch die Möglichkeit andere Ligand/Rezeptor-Wechselwirkungen auszubilden. Darüber hinaus liegen unter physiologischen Bedingungen weniger als 10% der VLA4-Integrine in einem aktivierten Zustand vor. Viele α_4 -Integrinantagonisten, die selektiv für aktivierte Integrine sind, binden um Größenordnungen schlechter an nicht-aktivierte Integrine. Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit zelluläre Testsysteme verwendet, die auf eine Aktivierung der Integrine verzichteten. Allerdings sei noch angemerkt, dass auch den α_4 -Integrinliganden, die selektiv nur an aktivierte Integrine binden, eine Rolle bei der Behandlung von Krankheiten zukommen kann.

4.8.2 Kritische Betrachtung von Zell-Adhäsionsassays

Beim Vergleich der Wirksamkeit von Antagonisten ist zu beachten, dass die beschriebenen Affinitäten keine wahren Gleichgewichtskonstanten darstellen. Die IC_{50} -Werte hängen stark von der Konzentration, dem Assayformat und dem Expressionsmuster der Zellen ab, und spiegeln eventuell die wahren Affinitäten der getesteten Verbindungen für die Integrinrezeptoren nicht exakt wieder. Die verschiedensten Assay-Bedingungen, die in verschiedenen Laboratorien etabliert wurden, um Integrinliganden zu evaluieren, lassen den Vergleich der verschiedenen Verbindungen untereinander nur bedingt zu. Zudem betrachten die meisten Bindungsassays eine kompetitive Hemmung der Antagonisten mit zwei verschiedenen Liganden – VCAM und MAdCAM – an zwei unterschiedlichen Integrinrezeptoren, woraufhin die Bestimmung von Selektivitäten auf $\alpha_4\beta_1$ bzw. $\alpha_4\beta_7$, die sich auf die bestimmten IC_{50} -Werte bezieht, irreführend sein kann.

Trotzdem können verschiedene Schlüsse aus den ermittelten Daten gezogen werden. Meist liefern Zell-Adhäsionsassays höhere IC_{50} -Werte im Vergleich zu Testsystemen an isolierten Rezeptoren, da es an der Zelloberfläche zu multiplen Rezeptor-Wechselwirkungen kommen kann. Die IC_{50} -Werte von Verbindungen aus der gleichen Testreihe spiegeln gewöhnlich verlässliche relative Affinitäten wieder. Dagegen

variieren die Werte aus unterschiedlichen Laboratorien teils beträchtlich, weshalb die Daten mit Vorsicht interpretiert werden sollten.

4.8.3 Selektivität

Die unterschiedlichen Expressionsprofile von α_4 -Integrinen und ihren Liganden implizieren, dass eine selektive Inhibierung eines bestimmten α_4 -Integrins wünschenswert wäre. Die Tatsache, dass MAdCAM spezifisch an $\alpha_4\beta_7$, VCAM jedoch sowohl an $\alpha_4\beta_1$ als auch an $\alpha_4\beta_7$ bindet, deutet auf therapeutisch relevante Unterschiede zwischen diesen beiden Proteinen hin. Dies beeinflusst letztlich die Auswahl von klinischen Kandidaten. Zum Beispiel würden $\alpha_4\beta_1$ -selektive Antagonisten die Migration von Leukozyten in VCAM exprimierendes Gewebe inhibieren, während $\alpha_4\beta_7$ -selektive Antagonisten deren Wanderung in den Magen-Darm-Trakt verhindern kann. MAdCAM-Überexpression kann mit Koliken in Verbindung gebracht werden. Es muss darauf hingewiesen werden, dass eine unselektive Inhibierung von beiden α_4 -Integrinen den größten Nutzen bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen bringen würde, da ein allgemeiner α_4 -Integrinantagonist ein breiteres Anwendungsgebiet abdecken könnte. Ob die Spezifität für $\alpha_4\beta_1$ bzw. $\alpha_4\beta_7$ wünschenswert ist, ist umstritten. Diese Frage wird erst dann zu beantworten sein, wenn die entsprechenden Verbindungen nach weiteren klinischen Untersuchungen bewertet werden können.

4.8.4 Biologische Evaluation und Diskussion der synthetisierten Mimetika

Bei der Durchführung der biologischen Assays wurden die Substanzen zunächst in wenig DMSO gelöst und anschließend mit der wässrigen Zellsuspension inkubiert. Dabei zeigten die Lösungen der Verbindungen der Tabelle 5 eine sofortige Trübung nach Zugabe der Zellsuspension. Somit ließ sich bei diesen schwer löslichen Verbindungen keine Aussage über ihre biologische Aktivität treffen. Das Ausfallen der Substanzen in wässriger Lösung führte zu einer zu geringen beobachteten Zelladhäsion, welche eine zu große Aktivitätsmessung zur Folge hatte. Die erhaltenen Werte für die Adhäsion von MAdCAM-1 an $\alpha_4\beta_7$ -Integrine sind daher nur wenig aussagekräftig. Eine Übersicht über die getesteten Verbindungen gibt Tabelle 5. Auffällig ist außerdem, dass die modifizierten Dipeptid-Leitstrukturen **11a** und **11b**, welche Zwitterionen darstellen, bei der Inkubation mit der wässrigen Zellsuspension

ebenfalls ausfallen und dadurch ihre Eignung als Leitstruktur angezweifelt werden sollte. Ein Grad für die Wasserlöslichkeit einer Verbindung kann durch seinen LogP-Wert beschrieben werden, der generell unter 5 liegen sollte und bei der Bioverfügbarkeit eine große Rolle spielt.^{42,43} Bei den Verbindungen **80a** und **80b** kann man die geringe Löslichkeit mit dem Vorhandensein eines Zwitterions begründen, da der berechnete LogP-Wert eine gute Löslichkeit vermuten läßt. Der Ersatz des üblichen Phenylrestes der 3-Amino-3-aryl-propansäure durch einen Methoxypyridin-Substituenten hatte eigentlich das Ziel, den zwitterionischen Charakter durch die Einführung einer zweiten, schwach basischen Funktion aufzuheben. Die bevorzugte Verwendung von Methoxypyridinen zu unsubstituierten Pyridinen begründet sich mit der deutlich besseren Bioverfügbarkeit.³⁰⁷ Die Schwerlöslichkeit der Verbindung **102** läßt sich an Hand des berechneten LogP-Wertes nicht vorhersagen. Die logP-Werte, Logarithmen der Verteilungskoeffizienten zwischen *n*-Octanol und Wasser, wurden mit Hilfe der Software ChemDraw Ultra 8.0 nach der von Crippen *et al.* vorgeschlagenen Fragmentierungsmethode berechnet.⁴²⁸

Tabelle 5: Evaluierung von $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden, welche durch ihre geringe Löslichkeit auffielen.

Verbindung	Strukturformel	Zelladhäsion [%] $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM-1	LogP
21a		Verbindung fiel aus	6.7
21b		“	7.4
39		“	6.5
35b		“	4.7
80a		“	3.7
80b		“	3.3
86		“	5.7
102		“	3.2

Die Synthese weiterer $\alpha_4\beta_7$ -Liganden stand schließlich unter dem Aspekt der Erniedrigung des LogP-Wertes. Der Verwendung von Pyridin-substituierten Derivaten und *N,O*-Heterozyklen wurde dabei ein besonderes Interesse gewidmet, wobei der Einbau von bekannten wirkstoffbasierten Grundstrukturen als LDT-Mimetika die Suche nach aktiven Verbindungen, welche sich auch durch eine gute Bioverfügbarkeit auszeichnen sollten, deutlich erleichtern sollte. Die erste Serie dieser optimierten Verbindungen zeigte jedoch selbst Absorptions- bzw. Fluoreszenzeigenschaften, welche die Auswertung des Fluoreszenztests unmöglich gestalteten. Versuche, einen

anderen Fluoreszenzmarker zu verwenden, schlugen fehl. Die beiden Verbindungen **35a** und **35aEster** mit dem Indolizingrundgerüst stellten sich bei der Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop als zelltoxisch heraus.

Tabelle 6: *Evaluierung von $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden, welche durch ihre Farbe auffielen.*

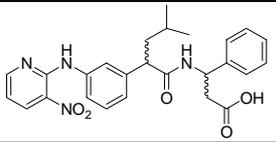
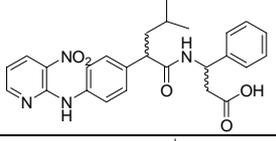
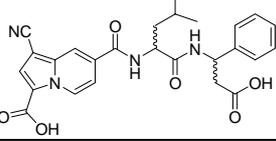
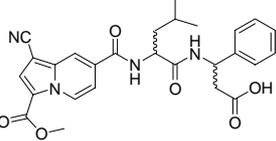
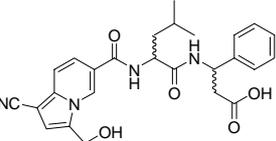
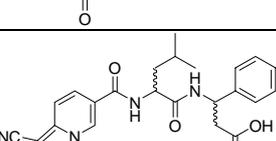
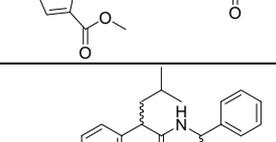
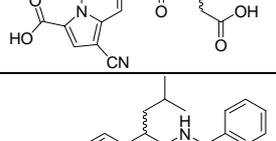
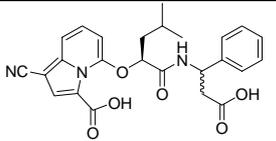
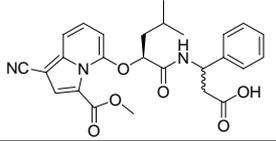
Verbindung	Strukturformel	Zelladhäsion [%] $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM-1	LogP
16a		farbig	3.9
16b		“	3.9
25a		“	2.12
25aEster		“	2.4
25b		“	2.12
25bEster		“	2.4
30		“	3.2
30Ester		“	3.5

Tabelle 7: *Zelltoxische Liganden mit Indolizingrundgerüst.*

Verbindung	Strukturformel	Zelladhäsion [%] $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM-1	LogP
35a		zelltoxisch	3.0
35aEster		“	3.3

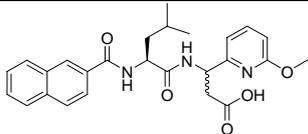
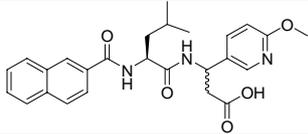
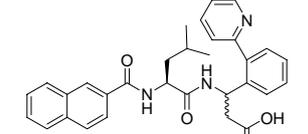
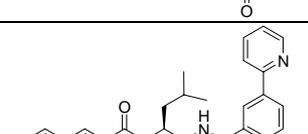
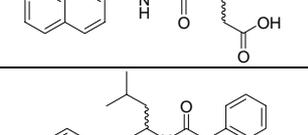
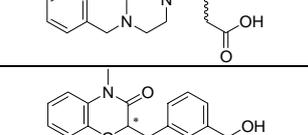
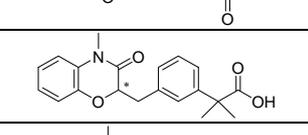
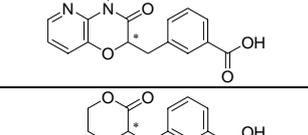
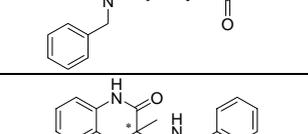
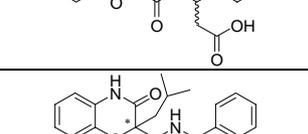
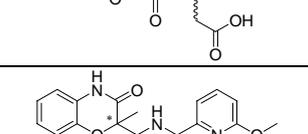
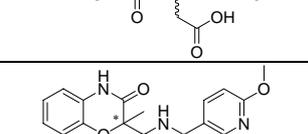
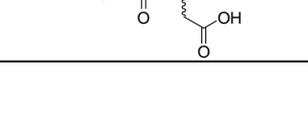
Bezüglich ihrer Bioverfügbarkeit scheinen die heterozyklischen Arylessigsäuren **54**, **55** und **56** ein gutes Mimetikum darzustellen. Die Aktivitäten lagen jedoch im inaktiven Bereich. Die Verbindungen konnten in die beiden Diastereomere aufgetrennt werden, welche innerhalb der Fehlergrenze die gleiche Aktivität zeigen.

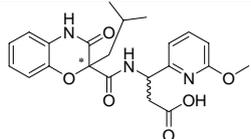
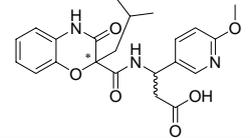
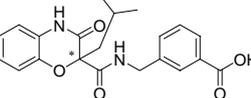
Tabelle 8: *Evaluierung von $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden, mit heterozyklischen Arylessigsäuren. Adhäsion in [%] bei einer Ligand-Konzentration von 1 mg/mL.*

Verbindung	Strukturformel	Zelladhäsion [%] $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM-1	LogP
54a		a) 56 ± 5 b) 57 ± 8	3.7
54b		a) 50 ± 9 b) 51 ± 8	4.0
55		inaktiv	4.2
56		a) 86 ± 8 b) 90 ± 4	5.3
65		68 ± 4	4.7
121		a) 95 ± 7 b) 87 ± 6	1.9

In der folgenden Tabelle wird die biologische Evaluierung der Verbindungen dargestellt, für welche auf Grund ihrer guten Löslichkeit und des guten Wirkprofils bei einer Konzentration von 1mg/mL sich die Bestimmung des IC_{50} -Wertes als sinnvoll herausstellte. Die Fehlerwerte bei den Messungen waren zum Teil sehr hoch, was eine genaue Auswertung der Daten erheblich einschränkt. Innerhalb dieser Fehler ergaben sich etwa vergleichbare Werte für alle Verbindungen (siehe Anhang). Viele IC_{50} -Kurven zeichneten sich auch durch einen linearen, anstatt reziproken Abfall aus. Die Verbindungen **75b** und **85b** zeigten dabei die höchste biologische Aktivität. Eine genaue Interpretation bzw. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen dieser Verbindungen lassen sich auf Grund der unbefriedigenden Ergebnisse nicht verwirklichen.

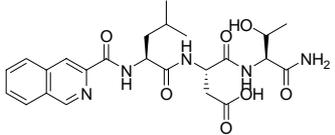
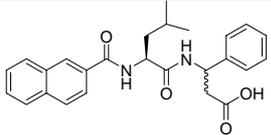
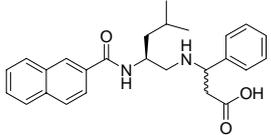
Tabelle 9: Evaluierung von $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden.

Verbindung	Strukturformel	IC ₅₀ [mM] $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM-1	LogP
75a		a) 1.27 ± 0.09 b) 1.19 ± 0.08	3.7
75b		a) 0.73 ± 0.15 b) 0.45 ± 0.18	3.3
85a		1.25 ± 0.35	4.8
85b		1.00 ± 0.22	4.8
103		a) 1.03 ± 0.19 b) 1.23 ± 0.15	4.0
129		1.81 ± 0.36	2.4
130		1.39 ± 0.41	3.6
132		2.04 ± 0.25	1.7
134		1.57 ± 0.27	3.0
146		1.97 ± 0.36	1.4
143		1.01 ± 0.24	2.6
147		1.63 ± 0.29	1.1
148		Keine Auswertung möglich	0.7

144		a) 1.68 ± 0.40 b) 1.50 ± 0.43	2.3
145		a) 1.50 ± 0.39 b) 1.17 ± 0.47	1.9
149		1.44 ± 0.17	2.7

Die erhaltenen Werte für die Adhäsion von MAdCAM-1 an $\alpha_4\beta_7$ -Integrinen sind dabei nur bedingt aussagekräftig, da selbst die in der Literatur als aktiv beschriebene Verbindung **9** eine um den Faktor 1000 geringere Aktivität für $\alpha_4\beta_7$ hatte.^{210,211} Außerdem wurde die Verbindung **11**^{13,14} als Referenz herangezogen, dessen Wert jedoch wegen der Unlöslichkeit nicht reproduziert werden konnte. Die Lösung der Verbindung **11** zeigte eine sofortige Trübung nach Zugabe der Zellsuspension. Es scheint, dass im Falle der Verbindung **10** die Konfiguration am C-terminalen Ende für die Aktivität nicht wichtig ist, da das entsprechende Diastereomer im Rahmen der Fehlergrenze die gleiche biologische Aktivität aufwies. In Folge der schrittweisen Modifikation des C-Terminus mit aromatischen Gruppen wurde schließlich das (L)-Threonin vollständig ersetzt und die Position der verbrückenden Amidbindung zwischen Asparaginsäure und Threonin von aromatischen Seitenketten eingenommen. Somit wäre die Schlussfolgerung naheliegend, dass die biologisch aktive Konfiguration am C-3-Kohlenstoffatom derjenigen am natürlichen Liganden MAdCAM-1 folgt und dementsprechend s-Konfiguration aufweisen sollte. Diese Annahme sollte sich natürlich nur im Falle von vergleichbaren Bindungsmodi der Verbindungen bewahrheiten.

Tabelle 10: *Evaluierung der modifizierten dipeptidischen Leitstruktur 10, 11^{13,14} und des literaturbekannten Tripeptids 9.^{210,211}*

Verbindung	Strukturformel	IC ₅₀ [mM] $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM-1	LogP
9		0.34	- 1.0
10		a) 0.97 ± 0.25 b) 0.90 ± 0.21	4.0
11		Verbindung fiel aus	4.6

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese von niedermolekularen α_4 -Integrinantagonisten. $\alpha_4\beta_7$ - und $\alpha_4\beta_1$ -Integrinliganden spielen bei einer Vielzahl von pathologischen Prozessen wie chronischen Entzündungen und Autoimmunkrankheiten eine wichtige Rolle. Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Inhibierung der $\alpha_4\beta_7$ /MAdCAM-1-Wechselwirkung, da diese einen sehr spezifischen Ansatzpunkt zur Therapie der *inflammatory bowel disease* (IBD) bietet. Ausgehend von einer in unserem Arbeitskreis bereits auf ein dipeptidisches Leitmotiv reduzierten Verbindung wurden strukturell vielseitige, niedermolekulare Gerüste unter dem Gesichtspunkt eines verbesserten pharmakologischen Profils und wirkstoffbasierter Mimetika synthetisiert.

Zu Beginn wurde der Schwerpunkt auf die Modifizierung des C-terminalen Endes der Leitverbindung gelegt, da in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass das C-terminale Ende durch eine β -Aminosäure ohne Aktivitätsverlust ersetzt werden kann. Die Verwendung von heterozyklischen 3-Amino-3-aryl-propansäuren erschien auf Grund der geringeren Lipophilie sinnvoll. Eine kleine Bibliothek von Phenylpyridin-substituierten Liganden wurde über eine *Suzuki*-Reaktion an der festen Phase synthetisiert, während die Methoxypyridin-substituierten β -Aminosäuren des C-terminalen Endes über eine *Wittig*- und *Michael*-Reaktion zugänglich waren.

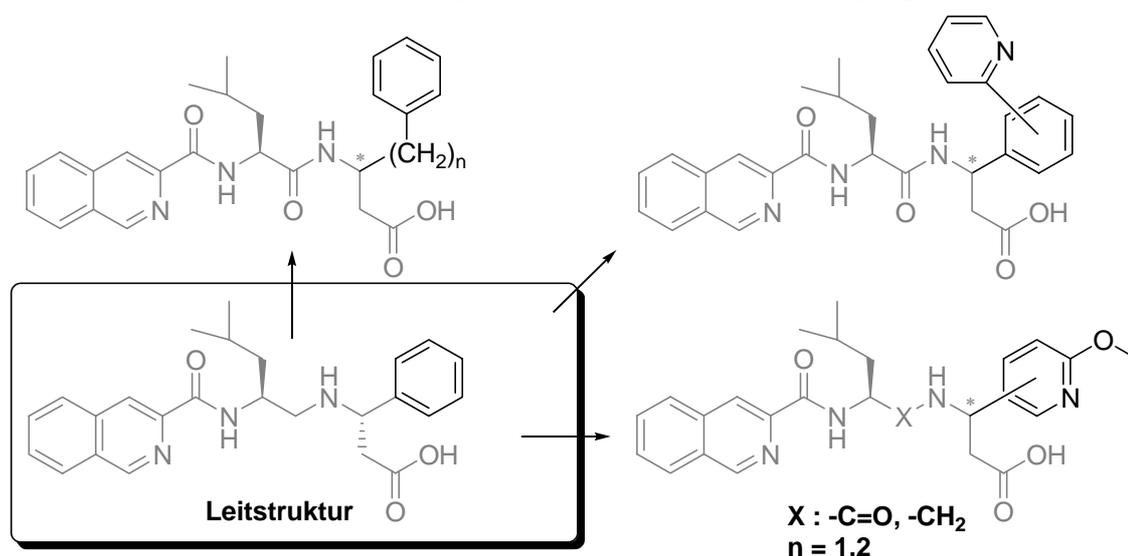


Abbildung 5.1: C-terminale Modifikation der dipeptidischen Leitstruktur.

Da sich ein N-terminaler aromatischer Rest als essentiell für die biologische Aktivität erwiesen hatte, wurden Isobutyl-substituierte Thiophen-, Pyrrol- und Indolessigsäurederivate mit unterschiedlichen Substitutionsmustern eingeführt

(Abb. 5.2). Die Synthese der heterozyklischen Vorstufen wurde unter Verwendung von verschiedenen Alkylierungsmethoden ermöglicht. Des Weiteren konnten über eine Festphasen-gekoppelte, nukleophile aromatische Substitution an 2-(Aminophenyl)-essigsäurederivaten *N*-Phenylpyridin-2-amin-substituierte Liganden dargestellt werden. Die Übertragung der pharmakophoren Gruppen auf ein Benzodiazepin-Grundgerüst konnte darüber hinaus zur Synthese von wirkstoffbasierten Mimetika beitragen.

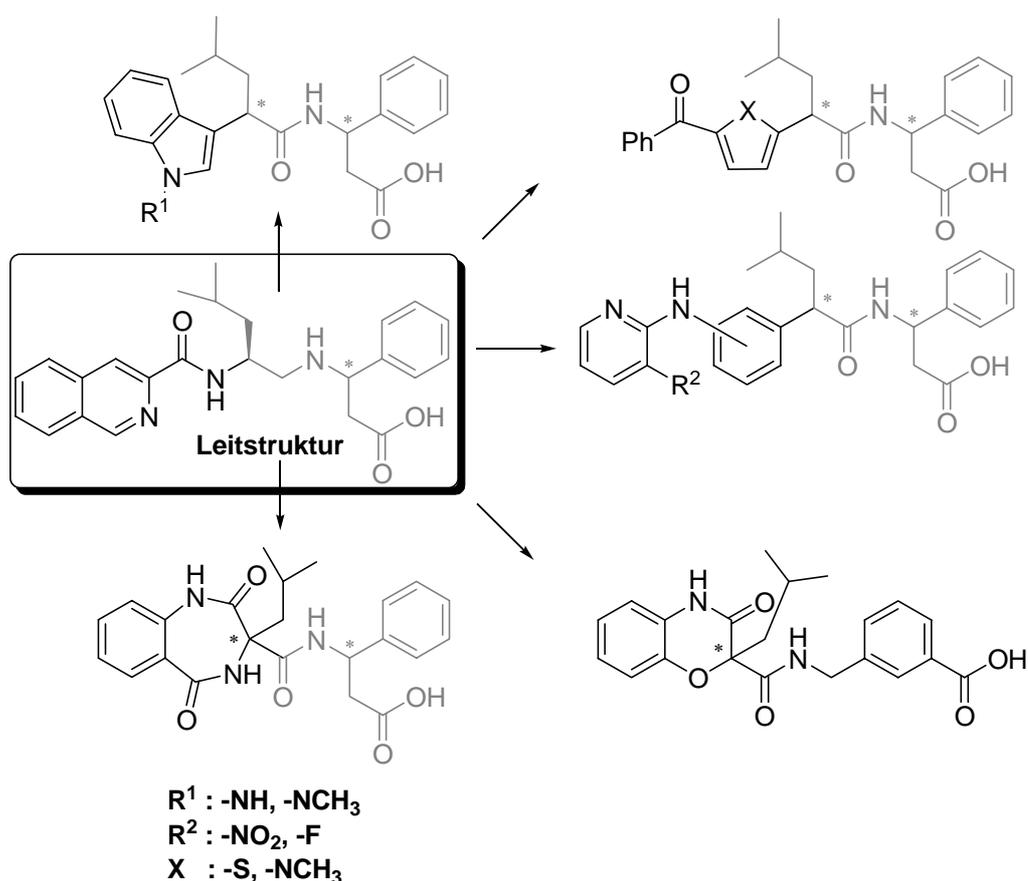


Abbildung 5.2: *N*-terminale Modifikation: 3-Amino-3-phenyl-propansäure wurde als C-terminales Ende verwendet.

Eine weitere Modifikation am *N*-terminalen Ende wurde durch die Verwendung von 1-Cyano-indolizin-3-carbonsäurederivaten erreicht (Abb. 5.3). Die Vorstufen wurden überwiegend über eine *Mitsunobu*-Reaktion erhalten. Die Synthese der Indolizine erfolgte an der festen Phase nach Quarternisierung des Pyridinstickstoffs und anschließender [2+3]-Cycloaddition an Acrylnitril.

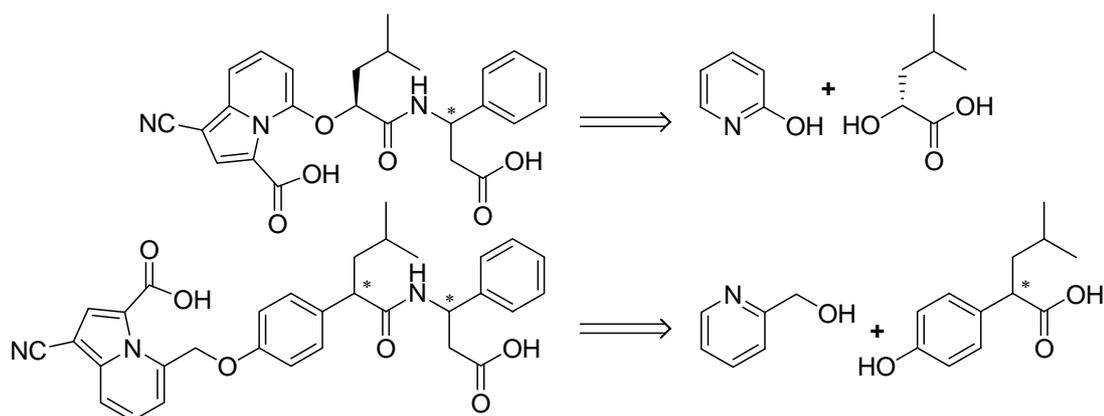


Abbildung 5.3: Indolizin-basierte $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden und deren schematische Darstellung.

Als nächster Ansatz wurde versucht, die zentrale dipeptidische Struktur konformativ einzuschränken, um das ADME-Profil zu verbessern (Abb. 5.4). Die Synthese von sowohl wirkstoffbasierten 1,3,4-substituierten Piperazin-2-onen und Piperazinen als auch von 2-substituierten 3-Oxo-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-carbonsäure-Derivaten konnte die Anforderungen erfüllen.

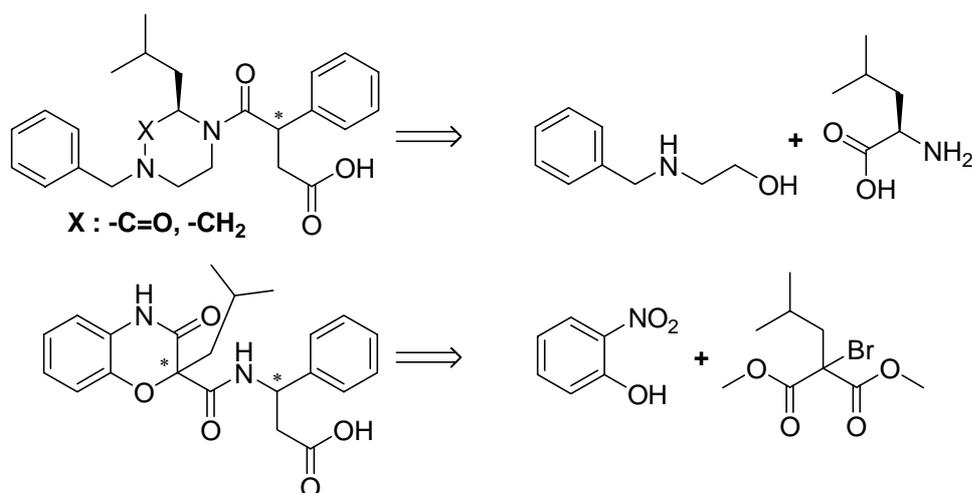


Abbildung 5.4: Darstellung der Piperazin-2-on- und 3-Oxo-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-abgeleiteten $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden.

Das Bindungsepitop des $\alpha_4\beta_7$ -Integrins, welches die LDT-Erkennungssequenz in einer Oberflächen-exponierten Schleife enthält, suggeriert den Aspartatrest als essentielle Bindungsstelle. 3,4-disubstituierte Morpholin-2-on- und 3-Oxo-2*H*-Benzo[*b*][1,4]oxazin-Derivate wurden daraufhin als Leucinmimetikum ausgewählt, während der 3-Methylbenzoesäurerest die Funktion der Säuregruppe übernehmen sollte (Abb. 5.5). Die direkte Alkylierung der Oxazinolenate stellte dabei den Schlüsselschritt der Synthese der Liganden dar.

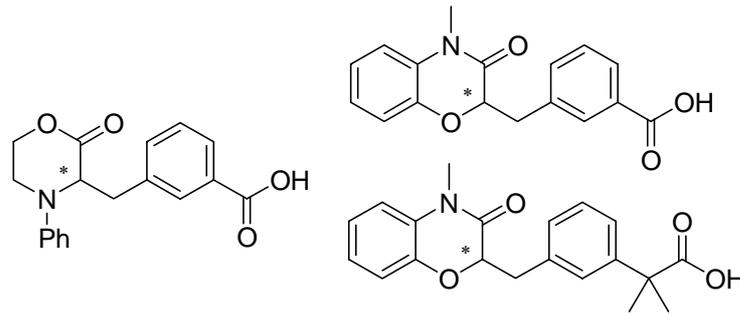


Abbildung 5.5: Grundgerüste, deren Heterozyklen als Leucinmimetika agieren sollten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden niedermolekulare, nicht-peptidische $\alpha_4\beta_7$ -Integrinliganden entwickelt, die eine große Bandbreite von Grundgerüsten aufwiesen. Auf Grund des ungenauen Testsystems war keine schlüssige Evaluierung der Liganden möglich. Einer weiteren Synthese von Liganden sollte deshalb eine Optimierung des Testsystems vorausgehen. Einige Indolizinderivate zeigten jedoch mäßige Aktivität als Tyrosinphosphataseinhibitoren im mikomolaren Bereich.

6 Experimenteller Teil

6.1 Material und allgemeine Arbeitsvorschriften

Die **Massenspektren** wurden durch Laser-Desorption (MALDI), *chemical ionisation* (CI) oder *electrospray ionisation* (ESI) erhalten. HPLC-ESI-MS Massenspektren wurden mit einem Gerät der Firma Finnigan vom Typ LCQ in Kombination mit dem HPLC-System Hewlett Packard HP 1100 (Säulenmaterial Nucleosil 100 5C₁₈) durchgeführt. Die ESI-Spektren werden in der Form „**X** (**Y**) [**M** + **Z**]⁺“ angegeben, wobei die Molekülmasse **X** mit der Intensität **Y**% detektiert wurde. **X** entspricht dabei dem Anlagerungsprodukt aus dem untersuchten Molekül mit dem Molekulargewicht **M** und dem Kation **Z**⁺.

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

Analytische und präparative RP-HPLC wurden an folgenden Geräten (*Beckmann, Amersham Pharmacia Biotech, Waters*) und Säulen (*Omniscrom YMC Europe GmbH*) durchgeführt:

- a) *Amersham Pharmacia Biotech*: Äkta Basic 10F, Pumpensystem P-900, Detektor UV-900, Steuerungssoftware Unicorn Vers. 3.00; Säulenmaterial: ODS-A C₁₈ (120 Å, 5 µM, 250 mm x 4.6 mm);
- b) *Amersham Pharmacia Biotech*: Äkta Basic 100F, Pumpensystem P-900, Detektor UV-900, Steuerungssoftware Unicorn Vers. 3.00; Säulenmaterial: (1) ODS-A C₁₈ (120 Å, 10 µM, 250 mm x 20 mm) semipräparativ; (2) ODS-A C₁₈ (120 Å 10 µM, 250 mm x 30 mm) präparativ;
- c) *Beckman*: System Gold, Hochdruckpumpenmodul 125, UV-Detektor 166; Säulenmaterial: (1) ODS-A C₁₈ (120 Å, 5 µM, 250 mm x 20 mm) semipräparativ; (2) ODS-A C₁₈ (120 Å 11 µM, 250 mm x 20 mm) semipräparativ;
- d) *Waters*: System Breeze, Pumpensystem 1525, UV-Detektor 2487 Dual, Steuerungssoftware Breeze Vers. 3.20; Säulenmaterial: ODS-A C₁₈ (120 Å, 5 µM, 250 mm x 20 mm) semipräparativ.

Als Eluent kamen verschiedene lineare Gradienten aus Acetonitril und Wasser mit 0.1% TFA zum Einsatz. Präparationen wurden bei einem Fluss von 8 mL/min (semipräparativ) und 25 mL/min (präparativ) durchgeführt. Analytische

Retentionszeiten wurden bei Durchflussraten von 1 mL/min ermittelt. Die UV-Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 220 und 254 nm.

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

Alle technischen **Lösungsmittel** wurden vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach den gängigen Verfahren absolutiert oder direkt von den Firmen *Aldrich*, *Fluka* oder *Merk* bezogen. NMP wurde von der Firma *BASF* gespendet.

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

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

Sämtliche **luft- oder hydrolyseempfindliche** Reaktionen wurden in ausgeheizten Glasgeräten unter einer Argonatmosphäre (99.996%) durchgeführt. Das Entfernen des Luftsauerstoffs aus Reagenzien erfolgte durch Behandlung der Probe im Ultraschallbad mit anschließendem Durchleiten von Argon. Sämtliche **Reaktionen** wurden in einer **0.5-0.1 M Reaktionslösung** durchgeführt.

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

Reaktionen an fester Phase wurden ebenfalls in 2 mL, 5 mL, 10 mL oder 20 mL Einmalspritzen der Firma *Becton-Dickinson* durchgeführt. Die hierfür nötigen PE-

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

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

Die **log P**-Werte wurden nach Crippen *et al.* berechnet.⁴²⁸ Diese Funktionen sind in dem Computerprogramm CS ChemDraw Pro der Firma *CambridgeSoft* enthalten.

Alle **¹H-NMR** und **¹³C-NMR** Spektren wurden mit den Geräten AC250, DMX500 der Firma Bruker aufgenommen. Das Prozessieren der NMR-Daten erfolgte an Bruker Aspekt 1000 (AC250) bzw. Silicon Graphics Indy-, O2- und Octane-Arbeitsstationen. Die chemischen Verschiebungen (δ) sind relativ zu Tetramethylsilan in *parts per million* (ppm) angegeben. Als interner Standard wurde entweder Tetramethylsilan oder der Lösungsmittelpeak verwendet: DMSO-d₅: 2.49 ppm (**¹H-NMR**) und 39.5 ppm (**¹³C-NMR**); CHCl₃: 7.24 ppm (**¹H-NMR**) und 77.0 ppm (**¹³C-NMR**).

Sämtliche Experimente zur Zuordnung der Protonen- und Kohlenstoffresonanzen sowie zur Strukturbestimmung wurden an dem Hochfeldgerät DMX 500 durchgeführt.

Die **Adhäsionsassays** führte man in 96-iger Mikrotiterplatten der Firma Corning durch. MAdCAM-1 wurde aus dem Überstand transfizierter 293T-Zellen gewonnen. Der *donkey anti-human IgG* wurde von *Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.* hergestellt. Der Fluoreszenzfarbstoff H33342 wurde von der Firma *Calbiochem* bezogen. Die Fluoreszenz wurde mit einem Cytofluor 2300 der Firma *Millipore*

gemessen. Zur einheitlichen Durchführung der Adhäsionsassays wurden die Verbindungen in DMSO gelöst. Die Stammlösungen hatten eine Konzentration von 1 mg/10 μ L und wurden bei -20°C aufbewahrt. Allgemeine Arbeitsvorschriften für Adhäsionsassays mit α 4-Integrin-exprimierenden Zellen werden im Folgenden vorgestellt.²⁴³

Adhäsionspuffer

Der Adhäsionspuffer besteht aus Click's RPMI Medium, 1% BSA, 1.0 mM MgCl₂ und 1.0 mM CaCl₂

Tris Buffer Saline (TBS-Puffer) für die Integrin-Stimulation mit Mn²⁺-Ionen

Der 1x TBS-Puffer besteht aus Tris (14 mM), NaCl (137 mM) und KCl (2.7 mM), Glucose (2 mM) und Mn²⁺ (1mM).

Medium für 38C13 β 7- Zellen

Click's RPMI-Medium (2.5 L) wird mit FCS (35 mL), Glutamin (5 mL) und β -Mercaptoethanol (1000 X, 0.5 mL) versetzt.

Medium für Jurkat-Zellen

Click's RPMI-Medium (2.5 L) wird mit FCS (35 mL) und Glutamin (5 mL) versetzt.

38C13 β 7-Zellen

B Zell-Lymphom aus der C3H/He Maus, infiziert mit L β 7SN Virus und mit G418 selektiert.

38C13 β 7-Zellen in Kultur

Täglich wird ca. ²/₃ der Zelllösung abgesaugt und wieder mit neuem Medium aufgefüllt. Die Zellkulturen werden in einem Wärmeschrank bei 37°C aufbewahrt.

Beschichtung der Mikrotiterplatten mit MAdCAM-1

Es wird eine *donkey α human* IgG-Stammlösung (48 μ L, 1.3 μ g/ μ L) mit PBS (12.5 mL) verdünnt und auf eine 96-iger Mikrotiterplatte aufgetragen (0.5 μ g *donkey α human* IgG in 100 μ L PBS pro well). Die Mikrotiterplatte wird über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wäscht man die Platte mit Adhäsionspuffer (1 x 100 μ L/well) und inkubiert sie 30 Minuten bei RT mit MAdCAM-1 Überstand (je nach Konzentration des MAdCAM-1 Überstands 100-150 μ L/well).

Zellbasierter Adhäsionsassay für α 4-Integrin-exprimierende Zellen

Es wurden folgende Adhäsionsassays durchgeführt: 38C13 β 7-Zellen auf MAdCAM-1 beschichteten Platten, 38C13 β 7-Zellen auf VCAM-1 beschichteten Platten und Jurkat-Zellen auf VCAM-1 beschichteten Platten.

Vorbereitung der Mikrotiterplatten:

Die mit MAdCAM-1 beschichteten Mikrotiterplatten wurden mit Adhäsionspuffer gewaschen (1 x 100 µL/well) und anschließend mit Adhäsionspuffer für 1 Stunde bei RT blockiert.

Vorbereitung der Zellen:

Die entsprechende Zellsuspension (12.5 mL) wurde 3 Minuten bei 1500 Upm zentrifugiert, mit PBS (1 x 5 mL) gewaschen und abermals 3 Minuten bei 1500 Upm zentrifugiert. Man resuspendierte die Zellen in Adhäsionspuffer (3 mL) und inkubierte die Zellsuspension 30 Minuten bei 37°C mit einem Fluoreszenzfarbstoff (H33342, 6 µL). Die Zellsuspension wurde 3 Minuten bei 1500 Upm zentrifugiert, mit PBS/1 mM EDTA (5 mL) gewaschen, bei 1500 Upm für 3 Minuten zentrifugiert und in PBS (10 mL) resuspendiert. Nach dem Zählen der Zellen wurden diese abermals 3 Minuten bei 1500 Upm zentrifugiert und in einer entsprechenden Menge Adhäsionspuffer gelöst (ca. $8 \cdot 10^5$ Zellen/mL).

Durchführung des Adhäsionsassays:

Die Zellsuspension (350 µL, ca. $8 \cdot 10^5$ Zellen/mL) wurde mit der entsprechenden Substanz (3.5 µL aus der Stammlösung, 1 mg/10 µL DMSO) 10 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend auf die Platte aufgetragen (3 x je 100 µL). Man zentrifugierte die Mikrotiterplatten für 10 Minuten bei 15 g und analysierte sie im Fluorimeter. Die Mikrotiterplatten wurden 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert, unter dem Mikroskop auf ausgefallene Verbindungen untersucht, in ein PBS-Bad eingetaucht und anschließend mit einer Klebefolie die einzelnen *wells* abgeklebt. Die Mikrotiterplatte wurde *invers* 10 Minuten bei 50 g zentrifugiert. Von der invertierten Platte zog man die Klebefolie ab und drückte sie auf einem Zellstoffpapier aus. Die immer noch invertierte Mikrotiterplatte wurde mit einer Pasteur-Pipette ausgesaugt. Die Mikrotiterplatte wurde nun wieder umgedreht, mit Adhäsionspuffer befüllt (100 µL/well) und im Fluorimeter vermessen. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel® und Origin®.

6.2 Synthese von Bausteinen

6.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Modifizierte Darstellung von *N*-Fmoc-geschützten Aminosäuren

Zu einer Lösung der Aminosäure (5.0 mmol, 1.0 eq.) in Aceton/Wasser (20 mL) und NaHCO₃ (7.5 mmol, 1.5 eq.) gibt man langsam Fmoc-OSu (5.0 mmol, 1.0 eq.) zu. Die Reaktionslösung wird für eine Stunde bei 0°C und anschließend über Nacht bei

Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird Aceton im Vakuum eingeeengt und die wässrige Phase zweimal mit kaltem Diethylether (150 mL) extrahiert. Bei *tert*-Butylgeschützten Derivaten wird die eisgekühlte, wässrige Phase mit 10%-iger Zitronensäure auf pH 4 eingestellt. Bei säurestabilen Derivaten stellt man die eisgekühlte, wässrige Phase mit 1N HCl auf pH 2 ein. Der ausgefallene Feststoff wird dreimal mit je 150 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wäscht man mit verdünnter HCl (pH 3) und dreimal mit Wasser. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO₄ wird das Lösungsmittel abrotiert. Der Rückstand wird mittels Flashchromatographie (Gradient von Methanol in Chloroform mit 0.1% Essigsäure) aufgereinigt.

AAV 2: Synthese von 3-Amino-3-aryl-propionsäure-Derivaten modifiziert nach Cardillo *et al.*:⁴²⁹

Ein aromatischer Aldehyd (20.0 mmol, 1.0 eq.), Malonsäure (2.08 g, 20.0 mmol, 1.0 eq.) und Ammonium-acetat (3.08 g, 40.0 mmol, 2.0 eq.) werden in Ethanol (30 mL) gelöst und für 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Man läßt den Reaktionsansatz erkalten und über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wird der ausgefallene Feststoff abgesaugt und mehrmals mit kaltem Ethanol gewaschen. Auf eine weitere Reinigung der Produkte kann meist verzichtet werden. Anderenfalls werden die Produkte umkristallisiert.

AAV 3: Synthese von *N*-Boc-geschützten Aminoaldehyden nach Blaskovich *et al.*:⁴³⁰

Oxalylchlorid (0.80 mmol, 1.6 eq.) wird unter Schutzgas in trockenem CH₂Cl₂ (8 mL) gelöst, auf -78°C abgekühlt und mit trockenem DMSO (1.63 mmol, 3.3 eq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 10 Minuten bei -78°C gerührt. Währenddessen wird eine Lösung des *N*-Fmoc-geschützten Aminoalkohols (0.50 mmol, 1.0 eq.) in trockenem CH₂Cl₂ (1.5 mL) unter einer Argonatmosphäre auf -78°C abgekühlt. Mittels einer Kanüle überführt man nach 10 Minuten die Lösung des *N*-Boc-geschützten Aminoalkohols in die Oxalylchlorid-Lösung. Die Reaktionslösung wird 80 Minuten bei -78°C gerührt und anschließend mit DIPEA (2.47 mmol, 5.0 eq.) versetzt. Man läßt die Lösung 40 Minuten bei 0°C rühren und gibt anschließend CH₂Cl₂ (50 mL) hinzu. Die Lösung wird mit eiskalter, wässriger NH₄Cl-Lösung (3%, 2 x 75 mL) und gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (1 x 75 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit MgSO₄ wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Aldehyd wird ohne weitere Reinigung eingesetzt, da eine säulenchromatographische Trennung zur Zersetzung führt.

AAV 4: Synthese von Methylestern

10.0 mmol (1.0 eq.) der freien Säure werden in 50 mL abs. Methanol mit einer katalytischen Menge konz. H₂SO₄ über Nacht unter Rückfluß erhitzt. Die Lösung wird anschließend im Vakuum eingeeengt und mit 100 g Eis versetzt. Die wässrige Phase wird viermal mit Essigester extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

AAV 5: Alkylierung einer CH-aciden Verbindung in α -Position nach Deprotonierung mit Natriumhydrid

10.0 mmol (1.0 eq) der zu alkylierenden Verbindung werden in abs. DMF gelöst und topfenweise bei 0°C zu einer Suspension von 10.0 mmol (1.0 eq.) Natriumhydrid (60%-ige Suspension in Mineralöl) in DMF gegeben. Nach Zugabe wird noch 30 Minuten bei 0°C und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend tropfenweise 13.0 mmol (1.3 eq.) des Alkylierungsmittels unter Rühren zugegeben. Der Reaktionsansatz wird anschließend 10 Stunden bei 60°C gerührt und nach dem Abkühlen das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeeengt. Nach dem Ansäuern mit gesättigter NH₄Cl-Lösung wird viermal mit Essigester extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

AAV 6: Addition eines Lithiumamids an einen Michael-Akzeptor nach Bull *et al.*:^{302,308}

10.0 mmol (1.0 eq.) *n*-Butyllithium (1.6 M Lsg. in Hexan) werden tropfenweise bei -78°C zu einer Lösung von 10.0 mmol (1.0 eq.) *N*-Dibenzylamin in absolutem THF gegeben und die tiefrote Lösung anschließend 30 Minuten unter Inertgas bei -78°C gerührt. Eine Lösung von 12.5 mmol (1.2 eq.) des α,β -ungesättigten Esters in 20 mL absolutem THF werden anschließend tropfenweise bei -78°C zugegeben und die Reaktionslösung 1 Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Die Mischung wird auf 50 mL gesättigte NH₄Cl-Lösung gegeben und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 60 mL Essigester extrahiert und die vereinten organischen Phasen jeweils dreimal mit jeweils 10%-iger Essigsäure und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das

Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

AAV 7: Spaltung eines Benzylamins durch Hydrierung:

1.0 g (1.0 eq.) des *N*-Dibenzylamins werden in 80 mL MeOH, 8 mL H₂O und 2 mL Essigsäure mit 10% Pd(II)[OH]₂ (*Pearlman*-Katalysator) 24 Stunden unter H₂-Atmosphäre (1 bar) bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Versetzen des Rückstandes mit gesättigter NaHCO₃-Lösung wird die wässrige Phase viermal mit Essigester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

AAV 8: Katalytische Reduktion einer Nitrogruppe

1.0 g (1.0 eq.) der Nitroverbindung werden mit 10% Pd/C-Katalysator über Nacht in 150 mL Methanol unter H₂-Atmosphäre (1 bar) bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

AAV 9: Entschützung von *tert*-Butylestern

Der zu entschützende *tert*-Butylester wird in 2,2,2-Trifluoressigsäure/Dichlormethan 1:1 bei 0°C 2 Stunden gerührt. Die Entschützungslösung wird anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand nach Zugabe von Toluol zweimal zur Trockene eingeengt.

AAV 10: Hydrolyse von Estern:

10.0 mmol (1.0 eq.) des Esters werden in Methanol gelöst und anschließend mit 30.0 mmol (3.0 eq.) Natriumhydroxid versetzt. Das Lösungsmittel wird anschließend im Vakuum eingeengt und mit 50 g Eis aufgenommen. Bei säurestabilen Derivaten stellt man die eisgekühlte, wässrige Phase mit konz. HCl auf pH 2 ein. Der ausgefallene Feststoff wird dreimal mit je 100 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über MgSO₄ wird das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird mittels Flashchromatographie unter Zusatz von 0.1% Essigsäure aufgereinigt.

AAV 11: Kupplung mit EDCI*HCl bzw. DCC

Die zu kuppelnde Carbonsäure wird mit 10.0 mmol (1.0 eq.) Amin, 11.0 (1.1 eq.) EDCI·HCl, 11.0 mmol (1.1 eq.) HOBt und einer katalytischen Menge *N,N'*-Dimethyl-4-aminopyridin unter Zugabe von 40.0 mmol (4.0 eq.) DIPEA in absolutem Dichlormethan gelöst. Bei Verwendung von DCC als Kupplungsreagenz verwendet man ein Äquivalent Base weniger. Die Reaktionslösung wird erst unter Eiskühlung, dann bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Der ausgefallene *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff wird abfiltriert. Nach Versetzen mit Wasser wird die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit verdünnter HCl und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt.

AAV 12: Addition von Phosphonsäureestern bzw. Phosphoniumsalzen an Aldehyde

10.0 mmol (1.0 eq.) Natriumhydrid (60%-ige Suspension) werden in absolutem THF suspendiert und anschließend mit einer Lösung von 10.0 mmol (1.0 eq.) des Phosphonsäureesters in THF bei 0°C tropfenweise versetzt. Eine Lösung des Phosphonsäureesters in THF kann auch bei -78°C mit *n*-BuLi deprotoniert werden. Nachdem die Reaktionslösung 1 Stunden bei Raumtemperatur gerührt worden ist, werden 10.0 mmol (1.0 eq.) Aldehyd, gelöst in THF, tropfenweise bei -78°C über einen Zeitraum von 1.5 Stunden tropfenweise zugegeben und anschließend 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wird mit Eis versetzt und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird dreimal mit Diethylether extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt.

AAV 13: Mitsunobu-Reaktion

Eine Lösung von 10.0 mmol (1.0 eq.) Alkohol, 10.0 mmol (1.0 eq.) Säure und 10.0 mol (1.0 eq.) Triphenylphosphin in 60 mL absolutem THF wird unter Inertgas bei 0°C tropfenweise mit 13.0 mmol (1.1 eq.) Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) versetzt. Die Reaktionsmischung wird über Nacht gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit CH₂Cl₂ und Wasser aufgenommen und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt.

AAV 14: Synthese von *tert*-Butylestern nach Armstrong *et al.*:⁴²⁰

Zu einer Lösung der freien Säure (10.0 mmol, 1.0 eq.) in absolutem THF gibt man bei Raumtemperatur eine Lösung von 20.0 mmol (2.0 eq.) des Trichloracetimidats in absolutem Toluol zu. Anschließend versetzt man die Reaktionslösung tropfenweise mit 2.5 mmol (0.25 eq.) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. Die Lösung wird 3 Stunden gerührt. Nach Versetzen mit gesättigter NH_4Cl -Lösung wird die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt.

AAV 15: Alkylierung von Enolatzwischenstufen

10.0 mmol (1.0 eq.) LDA- bzw. $\text{LiN}[\text{Si}(\text{CH}_3)_3]_2$ -Lösung (1.6 M Lösung in THF) werden tropfenweise bei -78°C zu einer Lösung von 10.0 mmol (1.0 eq.) der CH-aciden Verbindung in absolutem THF oder DME/THF 5:1 gegeben und die tiefgelbe Lösung anschließend 30 Minuten unter Inertgas bei -78°C gerührt. 12.5 mmol (1.2 eq.) des Alkylierungsmittels, gelöst in trockenem THF, werden tropfenweise bei -78°C zugegeben und die Reaktionslösung 1 Stunde bei -78°C gerührt und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktionslösung wird mit gesättigter NH_4Cl -Lösung hydrolysiert und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 60 mL Essigester extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit NaCl -Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

AAV 16: Synthese von *N*-Boc-geschützten Aminen

Zu einer Lösung des Amins (10.0 mmol, 1.0 eq.) in absolutem THF gibt man nacheinander 20.0 mmol (2.0 eq.) DIPEA und 10.0 mmol (1.0 eq.) Di-*tert*-butylcarbonat bei Raumtemperatur hinzu und rührt 12 Stunden mit einer katalytischen Menge *N,N'*-Dimethyl-4-aminopyridin. Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingeeengt und der Rückstand mit gesättigter NH_4Cl -Lösung und Essigsäureethylester aufgenommen. Anschließend wird die organische Phase abgetrennt und mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

AAV 17: Entschützung von *ortho*-Nitrosulfonamiden

Zu einer Lösung des Sulfonamids (10.0 mmol, 1.0 eq.) und 25.0 mmol (2.5 eq.) Na_2CO_3 in DMF tropft man bei Raumtemperatur langsam Thiophenol hinzu und läßt 1 Stunde bei dieser Temperatur rühren. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum eingeengt und mit Essigsäureethylester und verdünnter Na_2CO_3 -Lösung aufgenommen. Die wässrige Phase wird dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

AAV 18: Synthese von *ortho*-Nitrosulfonamiden

Zu einer Lösung des Amins (10.0 mmol, 1.0 eq.) und *ortho*-Nitrosulfonsäurechlorids (10.0 mmol, 1.0 eq.) in absolutem Dichlormethan wird bei 0°C 25.0 mmol (2.5 eq.) *N*-Methylmorpholin zugetropft. Die Reaktionslösung wird über Nacht gerührt und mit 10%-iger NaHCO_3 -Lösung, 10%-iger Citronensäure und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Ether umkristallisiert.

AAV 19: Synthese von Phosphonsäureestern

10.0 mmol (1.0 eq.) Trimethylphosphit und 10.0 mmol (1.0 eq.) des α -Bromessigsäureesters werden auf 120°C Badtemperatur erhitzt während das entstehende Bromalkan über eine Vigreux-Kolonnen abdestilliert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgt über fraktionierende Destillation im Vakuum.

AAV 20: Oxidative Entschützung eines *N*-Benzylamins nach Bull *et al.*³⁰⁸

10.0 mmol (1.0 eq.) *N*-Benzylamin werden in Acetonitril/Wasser 5:1 gelöst und bei Raumtemperatur portionsweise mit 21.0 mmol (2.1 eq.) Cerammoniumnitrat $\text{NH}_4\text{Cer(IV)(NO}_3)_6$ versetzt. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei dieser Temperatur gerührt. Die Lösung wird mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung hydrolysiert und mit Diethylether aufgenommen. Die wässrige Phase wird mit Ether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch getrennt.

AAV 21: Synthese von Aldehyden über Metallierung der entsprechenden Bromverbindungen nach Comins *et al.*³¹⁰

10.0 mmol (1.0 eq.) der Bromverbindung werden in absolutem THF gelöst und bei -78°C mit 10.0 mmol (1.0 eq.) *n*-BuLi (1.6 M Lösung in Hexan) versetzt. Die

Reaktionslösung wird 1 Stunde bei -78°C gerührt. Anschließend gibt man 20.0 mmol (2.0 eq.) *N,N'*-Dimethylformamid tropfenweise hinzu und rührt 30 Minuten bei dieser Temperatur. Die Reaktionslösung wird bei -78°C mit einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt kann ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktion verwendet werden.

AAV 22: Synthese von Aminosäuremethylestern

10.0 mmol (1.0 eq.) der Aminosäure werden in absolutem Dichlormethan gelöst und bei Raumtemperatur mit 38.0 mmol (3.8 eq.) Thionylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wird 3 Stunden unter Rückfluß erhitzt und anschließend im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird bei Raumtemperatur tropfenweise mit Methanol versetzt, anschließend 1 Stunde gerührt und mit Eis versetzt. Die Lösung wird mit Natriumcarbonat auf $\text{pH} = 9$ eingestellt und die wässrige Phase viermal mit Essigester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

AAV 23: Synthese von substituierten 2-(Benzylamino)-ethanol aus Aminoethanol

Das substituierte Benzylbromid (10.0 mmol, 1.0 eq.) und 10.0 mmol (1.0 eq.) Na_2CO_3 werden unter Zusatz von etwas Wasser in Acetonitril gelöst und bei 0°C mit 20.0 mmol (2.0 eq.) Aminoethanol versetzt. Die Reaktionslösung wird 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingengt und der Rückstand mit Essigsäureethylester und Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

AAV 24: Oxidative Spaltung von Alkenen zu Aldehyden nach Genin *et al.*:⁴³¹

Zu der Suspension des Alkens (10.0 mmol, 1.0 eq.) in THF/Wasser 3:1 gibt man eine katalytische Menge Osmiumtetroxid OsO_4 und anschließend portionsweise 30.0 mmol (3.0 eq.) Natriumperodat hinzu. Die Reaktionslösung wird 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaHSO_3 - und NaCl -Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet

und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt kann ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktion verwendet werden.

AAV 25: N-Alkylierung von 2-(Benzylamino)-ethanol mit α -Bromessigsäureestern und anschließende Zyklisierung zum Morpholin-2-on

Zu einer Lösung des substituierten 2-(Benzylamino)-ethanols (10.0 mmol, 1.0 eq.) und 10.0 mmol (1.0 eq.) DIPEA in absolutem Toluol werden bei Raumtemperatur 10.0 mmol (1.0 eq.) α -Bromessigsäuremethylester zugetropft. Die Reaktionslösung wird 12 Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt und der Rückstand mit gesättigter NH_4Cl -Lösung und Essigsäureethylester aufgenommen. Die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt kann ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktion verwendet werden. Dazu wird das Rohprodukt in absolutem Toluol gelöst und unter saurer Katalyse mit *para*-Toluolsulfonsäure 12 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionslösung wird mit gesättigter NaHCO_3 - und NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch getrennt.

AAV 26: Bromierung von substituierten Malonsäureestern in α -Position

Zu einer Lösung des Malonsäureesters (10.0 mmol, 1.0 eq.) in Chloroform wird bei Raumtemperatur eine Lösung von 10.0 mmol (1.0 eq.) Brom in Chloroform über 3 Stunden langsam hinzugegeben. Anschließend läßt man die Reaktionslösung noch 1 Stunde rühren und versetzt sie mit gesättigter $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung. Die organische Phase wird abgetrennt und mehrmals mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt kann ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktion verwendet werden.

AAV 27: O-Alkylierung von Phenolen mit α -Brommalonsäureestern

Zu einer Lösung des Phenols (10.0 mmol, 1.0 eq.) und 12.0 mmol (1.2 eq.) K_2CO_3 in Aceton gibt bei Raumtemperatur 12.0 mmol (1.2 eq.) der α -Brom-Verbindung tropfenweise hinzu. Die Reaktionslösung wird 6 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionslösung wird anschließend im Vakuum eingeeengt und der Rückstand mit

Wasser und Essigsäureethylester aufgenommen. Die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit gesättigter NaHCO_3 -, NH_4Cl - und NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch getrennt.

AAV 28: Radikalische Bromierung

Eine Lösung der Ausgangsverbindung (10.0 mmol, 1.0 eq.), 12.0 mmol (1.2 eq.) *N*-Bromsuccinimid und 0.5 mmol (0.05 eq.) Dibenzoylperoxid in Tetrachlorkohlenstoff wird 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Das ausgefallene Succinimid wird abfiltriert. Die Reaktionslösung wird mit Wasser versetzt und die organische Phase mit 1 N HCl und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Toluol umkristallisiert.

AAV 29: Friedel-Crafts-Acylierung von heterozyklischen Aromaten nach

20.0 mmol (2.0 eq.) Aluminiumtrichlorid werden in absolutem Dichlormethan suspendiert und bei -10°C mit einer Lösung der heterozyklischen Verbindung (10.0 mmol, 1.0 eq) in Dichlormethan versetzt. Anschließend werden bei dieser Temperatur langsam 15.0 mmol (1.5 eq.) Benzoylchlorid hinzugegeben und die Reaktion 2.5 Stunden gerührt. Beim Fehlen von koordinierenden Gruppen kann auch nur 1 Äquivalent Aluminiumchlorid verwendet werden. Die Reaktionslösung wird unter Eiskühlung mit 1 N HCl versetzt und die wässrige Phase mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

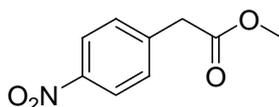
AAV 30: O-Alkylierung von Phenolen mit Benzylbromiden

Zu einer Lösung des Phenols (10.0 mmol, 1.0 eq.) und 12.0 mmol (1.2 eq.) K_2CO_3 in Aceton gibt bei Raumtemperatur 12.0 mmol (1.2 eq.) des Benzylbromids hinzu. Der Zusatz von 2.0 mmol (0.2 eq.) Kaliumiodid katalysiert die *O*-Alkylierung. Die Reaktionslösung wird 6 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionslösung wird anschließend im Vakuum eingeengt und der Rückstand mit Wasser und Essigsäureethylester aufgenommen. Die wässrige Phase wird mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit gesättigter NaHCO_3 -, NH_4Cl - und NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat

getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch getrennt.

6.2.2 Spezielle Arbeitsvorschriften

2-(4-Nitrophenyl)-essigsäuremethylester (**12a**)

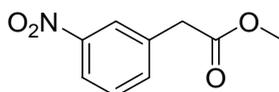


M: 195.05 g/mol

Die Synthese erfolgte nach AAV 4 ausgehend von 5.00 g (27.6 mmol) 2-(4-Nitrophenyl)-essigsäure. Man erhielt **12a** (5.34 g, 99%) als farblose Flüssigkeit.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.71 (s, 3H), 3.74 (s, 2H), 7.49 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 8.21 (d, 2H, J = 8.7 Hz); **¹³C-NMR** (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 40.7, 52.3, 123.7, 128.4, 130.3, 141.3, 147.2, 170.6; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 18.64 min; **EI-MS** (70 eV): m/z 194.9 [M]⁺.

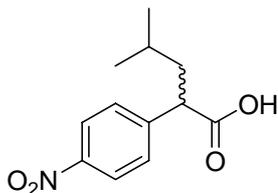
2-(3-Nitrophenyl)-essigsäuremethylester (**12b**)



M: 195.05 g/mol

Die Synthese erfolgte nach AAV 4 ausgehend von 5.00 g (27.6 mmol) 2-(4-Nitrophenyl)-essigsäure. Man erhielt **12a** (5.20 g, 97%) als farblose Flüssigkeit.

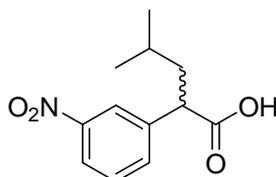
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.72 (s, 3H), 3.75 (s, 2H), 7.46-7.57 (m, 1H), 7.30 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 8.11-8.19 (m, 2H); **¹³C-NMR** (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 40.4, 52.3, 122.3, 124.4, 129.5, 135.6, 135.8, 148.8, 170.8; **HPLC** (10-90% in 30 min): R_t = 18.70 min; **MS-EI** (70 eV): 194.9 [M]⁺.

4-Methyl-2-(4-nitrophenyl)-pentansäure (13a)

M: 237.1 g/mol

4.90 g (25.0 mmol) 2-(4-Nitrophenyl)-essigsäuremethylester (**12a**), 1.00 g (25.0 mmol; [60%]) NaH und 6.93 g (50.0 mmol) Isobutylbromid wurden nach AAV 5 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde anschließend nach AAV 10 hydrolysiert. Man erhielt 3.50 g (60% über zwei Stufen) des Produkts **13a** als weißen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.88 (d, 6H, J = 6.6 Hz), 1.27-1.48 (m, 1H), 1.53-1.71 (m, 1H), 1.82-1.98 (m, 1H), 3.80 (t, 1H, J = 7.8 Hz), 7.63 (d, 2H, J = 8.7 Hz), 8.20 (d, 2H, J = 8.7 Hz); **¹³C-NMR** (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 22.3, 22.9, 25.9, 42.2, 49.2, 123.9, 129.8, 146.9, 148.1, 166.2, 174.4; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 21.54 min; **MS-EI** (70 eV): 236.9 [M]⁺.

4-Methyl-2-(3-nitrophenyl)-pentansäure (13b)

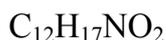
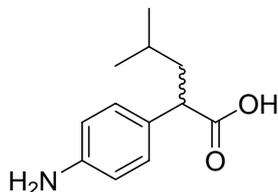
M: 237.1 g/mol

4.90 g (25.0 mmol) 2-(4-Nitrophenyl)-essigsäuremethylester (**12a**), 1.00 g (25.0 mmol; [60%]) NaH und 6.93 g (50.0 mmol) Isobutylbromid wurden nach AAV 5 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde anschließend nach AAV 10 hydrolysiert. Man erhielt 3.56 g (62% über zwei Stufen) des Produkts **13a** als weißen Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.88 (d, 6H, J = 6.5 Hz), 1.32-1.42 (m, 1H), 1.58-1.67 (m, 1H), 1.84-1.94 (m, 1H). 3.33 (t, 1H, J = 7.7 Hz), 7.64 (dd, 1H, J_1 = 7.9 Hz, J_2 = 7.9 Hz), 7.80 (d, 1H, J = 7.6 Hz), 8.12 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 8.18 (s, 1H); **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*₆): 22.8, 23.3, 26.4, 42.8, 49.2, 123.8, 123.4, 130.8, 135.7, 142.9, 148.7, 175.2; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 20.47 min; **MS-EI**

(70 eV): 236.9 (1) [M]⁺, 219.9 (9), 180.9 (100), 163.9 (20), 150.0 (38), 136.0 (27), 57.0 (94), 41.0 (37).

4-Methyl-2-(4-aminophenyl)-pentansäure (14a)

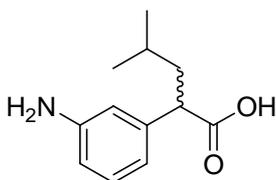


M: 207.13 g/mol

4-Methyl-2-(4-nitrophenyl)-pentansäure (**13a**) (1.58 g, 6.66 mmol) wurde in Methanol nach AAV 8 reduziert. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe verwendet.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.83 (d, 6H, *J* = 6.5 Hz), 1.31-1.39 (m, 1H), 1.39-1.49 (m, 1H), 1.68-1.78 (m, 1H), 3.33 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 6.48 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz), 6.91 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 23.0, 23.3, 25.3, 43.0, 48.9, 114.7, 127.6, 129.0, 148.3, 176.5; HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 12.46 min

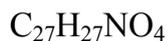
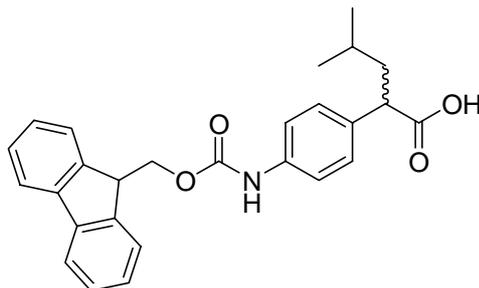
4-Methyl-2-(3-aminophenyl)-pentansäure (14b)



M: 207.13 g/mol

4-Methyl-2-(3-nitrophenyl)-pentansäure (**13b**) (1.58 g, 6.66 mmol) wurde in Methanol nach AAV 8 reduziert. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe verwendet.

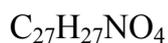
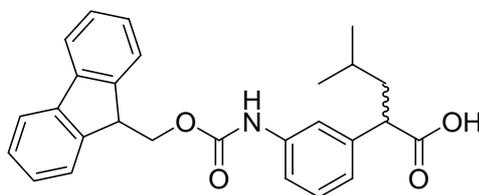
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 0.87 (d, 6H, *J* = 6.6 Hz), 1.32-1.41 (m, 1H), 1.58-1.65 (m, 1H), 1.84-1.91 (m, 1H), 3.83 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.63 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz), 7.79 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 8.12 (dd, 1H, *J*₁ = 8.2 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz), 8.16-8.18 (m, 1H); HPLC (20-100% in 30 min): R_t = 7.88 min

N-Fmoc-4-Methyl-2-(4-aminophenyl)-pentansäure (15a)

M: 429.19 g/mol

4-Methyl-2-(4-aminophenyl)-pentansäure (**14a**) (1.38 g, 6.66 mmol) wurde mit 2.24 g (6.66 mmol) Fmoc-OSu und 0.90 g (10.7 mmol) NaHCO_3 nach AAV 1 zu der Fmoc-geschützten Verbindung **15a** umgesetzt. Der erhaltene Niederschlag wurde aus Wasser lyophilisiert. Man erhielt 2.18 g (75%) der Zielverbindung.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 0.92 (d, 6H, J = 6.8 Hz), 1.49 (m, 1H), 1.67 (m, 1H); 1.94 (m, 1H), 3.64 (t, 1H, J = 7.8 Hz), 4.27 (t, 1H, J_1 = 6.8 Hz, J_2 = 6.8 Hz), 4.54 (d, 2H, J = 6.8 Hz), 6.71 (bs, 1H), 7.23-7.50 (m, 8H), 7.63 (d, 2H, J = 7.3 Hz), 7.78 (d, 2H, J = 7.3 Hz); **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, CDCl_3): δ = 21.6, 22.0, 26.1, 30.1, 42.7, 49.3, 66.8, 119.2, 119.9, 125.1, 127.2, 127.8, 128.4, 134.7, 138.2, 141.6, 144.3, 155.0, 177.0; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 26.53 min; **ESI-MS**: m/z 897.2 (100) $[\text{2M+K}]^+$, 881.2 (27) $[\text{2M+Na}]^+$, 859.1 (27) $[\text{2M+H}]^+$, 468.3 (22) $[\text{M+K}]^+$, 452.4 (19) $[\text{M+Na}]^+$, 430.0 (67) $[\text{M+H}]^+$.

N-Fmoc-4-Methyl-2-(3-aminophenyl)-pentansäure (15b)

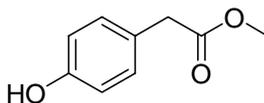
M: 429.19 g/mol

4-Methyl-2-(3-aminophenyl)-pentansäure (**14b**) (1.38 g, 6.66 mmol) wurde mit 2.24 g (6.66 mmol) Fmoc-OSu und 0.90 g (10.7 mmol) NaHCO_3 nach AAV 1 zu der Fmoc-

geschützten Verbindung **15b** umgesetzt. Der erhaltene Niederschlag wurde aus Wasser lyophilisiert. Man erhielt 2.18 g (75%) der Zielverbindung.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.91 (d, 6H, J = 6.7 Hz), 1.45-1.52 (m, 1H), 1.58-1.66 (m, 1H), 1.86-1.95 (m, 1H), 3.60 (t, 1H, J = 7.8 Hz), 4.25 (t, 1H, J_1 = 6.7 Hz, J_2 = 6.7 Hz), 4.44 (d, 2H, J = 6.7 Hz), 4.85 (bs, 2H), 7.00 (d, 2H, J = 7.7 Hz), 7.15-7.45 (m, 6H), 7.68 (d, 2H, J = 7.1 Hz), 7.78 (d, 2H, J = 7.5 Hz); **¹³C-NMR** (125 MHz, CD₃OD): δ = 21.7, 22.0, 26.1, 30.1, 42.6, 49.9, 66.8, 117.7, 118.6, 119.9, 122.8, 125.2, 127.2, 127.8, 128.9, 139.1, 140.9, 141.6, 144.3, 155.0, 176.7; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 26.54 min; **ESI-MS**: m/z 897.2 (100) [2M+K]⁺, 881.2 (27) [2M+Na]⁺, 859.1 (27) [2M+H]⁺, 468.3 (22) [M+K]⁺, 452.4 (19) [M+Na]⁺, 430.0 (67) [M+H]⁺.

2-(4-Hydroxyphenyl)-essigsäuremethylester (**17**)

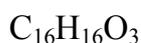
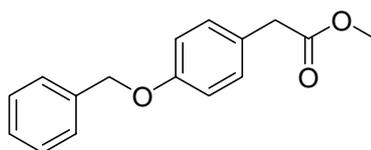


M: 166.06 g/mol

Die Synthese erfolgte nach AAV 4 ausgehend von 5.00 g (32.7 mmol) 2-(4-Hydroxyphenyl)-essigsäure. Man erhielt **12a** (5.20 g, 96%) als farblose Flüssigkeit.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.55 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 6.43 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 7.08 (d, 2H, J = 8.5 Hz); **¹³C-NMR** (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 40.1, 52.2, 115.5, 125.1, 130.2, 155.0, 173.5; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 14.11 min;

2-(4-(Benzyloxy)phenyl)-essigsäuremethylester (**18a**)



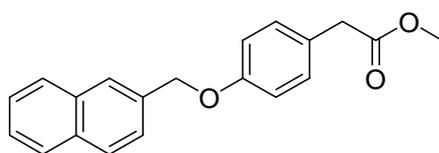
M: 256.11 g/mol

1.00 g (6.49 mmol) 4-(Hydroxyphenyl)-essigsäuremethylester (**17**), 1.33 g (7.78 mmol) Benzylbromid und 1.07 g (7.78 mmol) K₂CO₃ wurden nach AAV 27

unter Katalyse von KI in Aceton unter Rückfluß erhitzt. Nach chromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) erhielt man 1.41 g (85%) der Zielverbindung **18a** als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.58 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 5.01 (s, 2H), 6.94 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.21 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.26 (s, 1H), 7.32-7.45 (m, 5H); **¹³C-NMR** (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 40.3, 51.9, 70.1, 115.0, 126.4, 127.4, 127.9, 128.5, 130.3, 137.0, 158.0, 172.2; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 23.91 min

2-(4-((Naphthalen-2-yl)methoxy)phenyl)-essigsäuremethylester (**18b**)

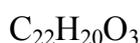
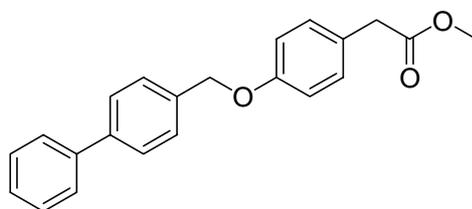


M: 306.13 g/mol

2.08 g (12.5 mmol) 4-(Hydroxyphenyl)-essigsäuremethylester (**17**), 3.32 g (15.0 mmol) 2-(Brommethyl)-naphthalin und 2.07 g (15.0 mmol) K₂CO₃ wurden nach AAV 27 unter Katalyse von KI in Aceton unter Rückfluß erhitzt. Nach chromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) erhielt man 1.08 g (24%) der Zielverbindung **18b** als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.58 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 5.23 (s, 2H), 6.82 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.16 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.26 (s, 1H), 7.48-7.56 (m, 3H), 7.84-7.89 (m, 4H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 26.52 min

2-(4-((Biphenyl)methoxy)phenyl)-essigsäuremethylester (**18c**)



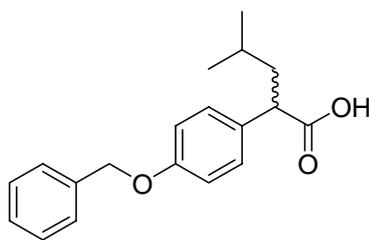
M: 332.14 g/mol

2.08 g (12.5 mmol) 4-(Hydroxyphenyl)-essigsäuremethylester (**17**), 3.87 g (15.0 mmol) (Brommethyl)-biphenyl und 2.07 g (15.0 mmol) K₂CO₃ wurden nach

AAV 27 unter Katalyse von KI in Aceton unter Rückfluß erhitzt. Nach chromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) erhielt man 4.73 g (92%) der Zielverbindung **18c** als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.56 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 4.94 (s, 2H), 6.82 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.16 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.34-7.45 (m, 8H), 7.65 (m, 1H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 27.16 min

2-(4-(Benzyloxy)phenyl)-4-methylpentansäure (**19a**)



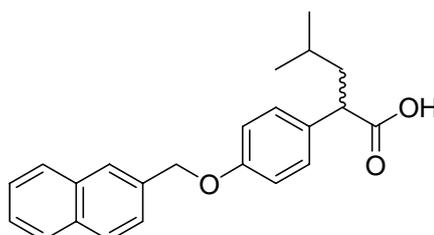
C₁₉H₂₂O₃

M: 298.16 g/mol

2-(4-(Benzyloxy)phenyl)-essigsäuremethylester (**18a**) (1.30 g, 4.68 mmol), 0.22 g (6.62 mmol; [60%]) NaH und 1.28 g (9.36 mmol) Isobutylbromid wurden nach AAV 5 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde anschließend nach AAV 10 hydrolysiert. Man erhielt 1.10 g (75% über zwei Stufen) des Produkts **19a** als weißen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.89 (d, 6H, *J* = 6.5 Hz), 1.43-1.53 (m, 1H), 1.60-1.71 (m, 1H), 1.86-1.97 (m, 1H), 3.60 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 5.03 (s, 2H), 6.92 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.19 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.21 (s, 1H), 7.23-7.34 (m, 5H); ¹³C-NMR (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 22.2, 22.6, 25.7, 42.0, 48.7, 70.1, 115.1, 127.5, 128.0, 128.6, 129.2, 130.5, 131.0, 137.0, 158.2, 180.7; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 25.16 min

2-(4-((Naphthalen-2-yl)methoxy)phenyl)-4-methylpentansäure (**19b**)



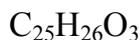
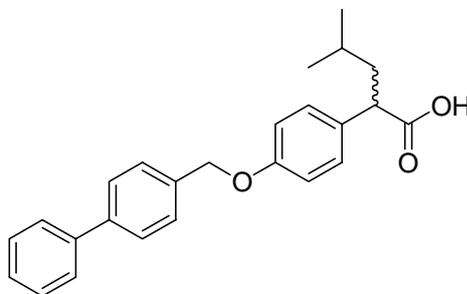
C₂₃H₂₄O₃

M: 348.17 g/mol

2-(4-((Naphthalen-2-yl)methoxy)phenyl)-essigsäuremethylester (**18b**) (0.90 g, 3.00 mmol), 0.14 g (3.52 mmol; [60%]) NaH und 0.82 g (6.00 mmol) Isobutylbromid wurden nach AAV 5 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde anschließend nach AAV 10 hydrolysiert. Man erhielt 0.78 g (75% über zwei Stufen) des Produkts **19b** als weißen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.90 (d, 6H, *J* = 6.5 Hz), 1.41-1.54 (m, 1H), 1.61-1.72 (m, 1H), 1.87-2.04 (m, 1H), 3.62 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 5.21 (s, 2H), 6.97 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.16 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.27 (s, 1H), 7.45-7.55 (m, 3H), 7.82-7.89 (m, 4H); HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 26.52 min

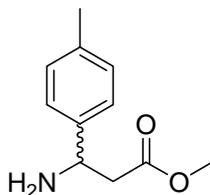
2-(4-((Biphenyl)methoxy)phenyl)-4-methylpentansäure (**19c**)



M: 374.19 g/mol

2-(4-((Biphenyl)methoxy)phenyl)-essigsäuremethylester (**18c**) (0.75 g, 2.26 mmol), 95.0 mg (2.48 mmol; [60%]) NaH und 0.62 g (4.52 mmol) Isobutylbromid wurden nach AAV 5 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde anschließend nach AAV 10 hydrolysiert. Man erhielt 0.57 g (68% über zwei Stufen) des Produkts **19c** als weißen Feststoff.

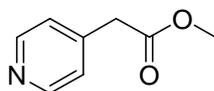
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.87 (d, 6H, *J* = 6.5 Hz), 1.41-1.51 (m, 1H), 1.58-1.69 (m, 1H), 1.84-2.00 (m, 1H), 3.58 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 4.91 (s, 2H), 6.81 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.19 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.31 (s, 1H), 7.33-7.41 (m, 3H), 7.59-7.62 (m, 4H); HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 31.16 min

3-Amino-3-phenylpropansäuremethylester (20)

M: 193.11 g/mol

4.81 g (40.0 mmol) *para*-Tolylaldehyd, 4.16 g (40.0 mmol) Malonsäure und 6.17 g (80.0 mmol) NH_4OAc wurden nach AAV 2 in Ethanol unter Rückfluß erhitzt. Das Rohprodukt (4.00 g, 22.0 mmol) wurde nach AAV 22 mit 10.1 g (85.0 mmol) SOCl_2 quantitativ in den Methylester **20** überführt. Es wurden 5.02 g (65%) der Zielverbindung **20** erhalten.

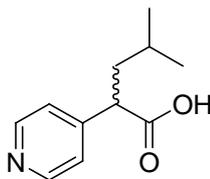
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.31$ (s, 3H), 2.65 (d, 2H, $J = 6.8$ Hz), 4.37 (t, 1H, $J = 6.8$ Hz), 7.12 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.22 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 11.48$ min

2-(Pyridin-4-yl)-essigsäuremethylester (26)

M: 151.06 g/mol

Die Synthese erfolgte nach AAV 4 ausgehend von 5.00 g (36.2 mmol) 2-(Pyridin-4-yl)-essigsäure. Die Reaktionslösung wurde jedoch mit gesättigter NaCO_3 -Lösung basisch aufgearbeitet. Man erhielt **26** (5.14 g, 97%) als farblose Flüssigkeit.

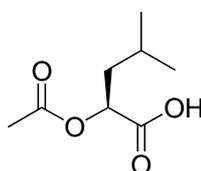
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.73$ (s, 2H), 3.76 (s, 2H), 7.28 (d, 2H, $J = 6.3$ Hz), 8.55 (d, 2H, $J = 6.3$ Hz); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 9.57$ min

4-Methyl-2-(pyridin-4-yl)-pentansäure (28)

M: 193.11 g/mol

3.00 g (20.0 mmol) 2-(Pyridin-4-yl)-essigsäuremethylester (**26**), 0.84 g (22.0 mmol; [60%]) NaH und 5.48 g (40.0 mmol) Isobutylbromid wurden nach AAV 5 umgesetzt. Der Methylester **27** wurde anschließend mit 6 N HCl unter Rückfluß sauer hydrolysiert. Man erhielt nach Lyophilisieren 3.01 g (78% über zwei Stufen) des Produkts **28** als weißen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.91 (d, 6H, *J* = 6.5 Hz), 1.39-1.50 (m, 1H), 1.60-1.71 (m, 1H), 1.92-2.04 (m, 1H), 3.67 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.28 (d, 2H, *J* = 6.3 Hz), 8.55 (d, 2H, *J* = 6.3 Hz); ¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-d₆): δ = 22.1, 22.4, 25.9, 42.0, 49.1, 123.3, 148.2, 149.9, 173.3; HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 13.57 min

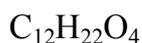
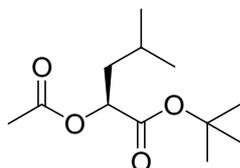
(R)-2-Acetoxy-4-methylpentansäure (31)

M: 174.09 g/mol

14.0 g (0.11 mol) D-Leucin wurden in 300 mL Eisessig gelöst und bei 0°C unter Rühren portionsweise mit 16.8 g (0.25 mol) Natriumnitrit versetzt. Es wurde 1 Stunde bei 0°C und anschließend 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde im Vakuum eingeeengt und mit 200 g Eis versetzt. Die wässrige Lösung wurde sechsmal mit Diethylether extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Man erhielt 17.0 g (91%) der Zielverbindung **31** als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.95 (ψt, 6H, *J* = 6.7 Hz), 1.60-1.89 (m, 3H), 2.14 (s, 3H), 5.05 (dd, 1H, *J*₁ = 9.4 Hz, *J*₂ = 4.0 Hz); **¹³C-NMR** (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 20.5, 21.5, 22.9, 24.6, 39.6, 70.6, 170.8, 176.8.

(*R*)-2-Acetoxy-4-methylpentansäure-*tert*-butylester (32)

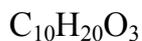
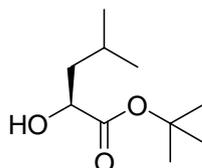


M: 230.15 g/mol

7.57 g (43.4 mmol) (*R*)-2-Acetoxy-4-methylpentansäure (**31**), 9.08 mL (86.8 mmol) *tert*-Butanol und 11.7 g (56.4 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid wurden nach AAV 11 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) erhielt man 7.37 g (74%) der Zielverbindung **32** als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.95 (ψt, 6H, *J* = 6.7 Hz), 1.44 (s, 9H), 1.51-1.82 (m, 3H), 2.10 (s, 3H), 4.86 (dd, 1H, *J*₁ = 9.3 Hz, *J*₂ = 4.3 Hz); **¹³C-NMR** (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 20.6, 21.6, 22.9, 24.6, 27.9, 39.7, 71.6, 81.8, 169.9, 170.6.

(*R*)-2-Hydroxy-4-methylpentansäure-*tert*-butylester (33)

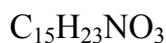
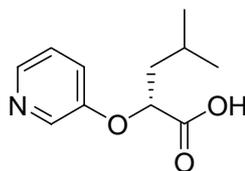


M: 188.14 g/mol

6.50 g (28.2 mmol) (*R*)-2-Acetoxy-4-methylpentansäure-*tert*-butylester (**32**) wurden bei Raumtemperatur mit 11.7 g (84.6 mmol) Kaliumcarbonat in einer Mischung aus 30 mL Wasser und 43 mL Methanol kräftig über Nacht gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser versetzt und mehrmals mit Essigester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) gereinigt. Man erhielt 4.79 g (91%) der Zielverbindung **33** als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.97 (d, 3H, *J* = 1.5 Hz), 0.99 (d, 3H, *J* = 1.5 Hz), 1.51 (s, 9H), 1.51-1.62 (m, 2H), 1.86-1.94 (m, 1H), 2.74 (d, 1H, *J* = 6.0 Hz), 4.05-4.13 (m, 1H); **¹³C-NMR** (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 21.6, 23.3, 24.5, 27.8, 43.6, 69.3, 82.1, 175.2.

(S)-4-Methyl-2-(pyridin-3-yloxy)-pentansäure (34)

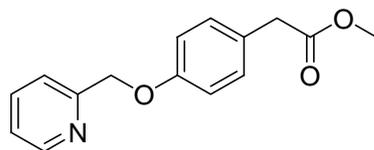


M: 209.17 g/mol

2.00 g (11.0 mmol) (*R*)-2-Hydroxy-4-methylpentansäure-*tert*-butylester (**33**), 1.02 g (11.0 mmol) 3-Hydroxy-pyridin, 2.89 g (11.0 mmol) Triphenylphosphin und 2.22 g (11.0 mmol) DIAD wurden nach AAV 13 bei 0°C in THF umgesetzt. Man erhielt nach chromatographischer Reinigung 2.15 g (74%) (Hexan/Essigsäureethylester/0.1% Essigsäure-Gradient) der Zielverbindung **34** als farbloses Öl. Der *tert*-Butylester wurde im Anschluß nach AAV 9 gespalten.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.95 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz), 1.00 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz), 1.65-1.75 (m, 1H), 1.86-1.98 (m, 2H), 4.53 (dd, 1H, *J*₁ = 9.0 Hz, *J*₂ = 4.0 Hz), 7.16-7.24 (m, 2H), 8.23 (dd, 1H, *J*₁ = 4.3 Hz, *J*₂ = 1.8 Hz), 8.29 (dd, 1H, *J*₁ = 2.8 Hz, *J*₂ = 1.0 Hz); **¹³C-NMR** (62.5 MHz, CDCl₃): δ = 21.7, 23.0, 24.6, 27.9, 41.4, 82.4, 121.8, 123.8, 138.3, 142.6, 154.4, 170.6; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 10.96 min; **ESI-MS**: *m/z* 266.1 (100) [M+H]⁺, 210.2 (70) [M-^tBu]⁺.

2-(4-((Pyridin-2-yl)methoxy)phenyl)-essigsäuremethylester (36)



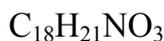
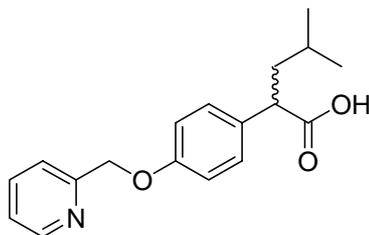
M: 257.11 g/mol

3.50 g (21.1 mmol) 2-(4-Hydroxyphenyl)-essigsäuremethylester (**17**), 2.30 g (21.1 mmol) (Pyridin-2-yl)-methanol, 5.53 g (21.1 mmol) Triphenylphosphin und 4.27 g (21.1 mmol) DIAD wurden nach AAV 13 bei 0°C in THF umgesetzt. Man

erhielt nach chromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester/0.1% Triethylamin-Gradient) 4.39 g (81%) der Zielverbindung **36** als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.58 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 5.01 (s, 2H), 6.94 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.26-7.32 (m, 3H), 7.58 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.78 (dt, 1H, *J*₁ = 7.8 Hz, *J*₂ = 1.8 Hz), 8.62 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz); HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 18.73 min

2-(4-((Pyridin-2-yl)methoxy)phenyl)-4-methylpentansäure (**38**)

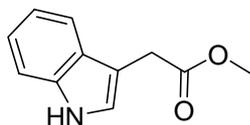


M: 299.15 g/mol

2-(4-((Pyridin-2-yl)methoxy)phenyl)-essigsäuremethylester (**36**) (2.10 g, 8.17 mmol), 0.31 g (8.17 mmol; [60%]) NaH und 3.36 g (24.5 mmol) Isobutylbromid wurden nach AAV 5 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde anschließend nach AAV 10 hydrolysiert. Man erhielt 1.71 g (70% über zwei Stufen) des Produkts **38** als weißen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.94 (d, 6H, *J* = 6.5 Hz), 1.46-1.74 (m, 2H), 1.93-2.04 (m, 1H), 3.65 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 5.18 (d, 2H, *J* = 2.5 Hz), 6.94 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz), 7.26-7.32 (m, 3H), 7.58 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.78 (dt, 1H, *J*₁ = 7.8 Hz, *J*₂ = 1.8 Hz), 8.62 (d, 1H, *J* = 4.5 Hz); HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 22.08 min; ESI-MS: *m/z* 300.2 (100) [M+H]⁺.

2-(1*H*-Indol-3-yl)-essigsäuremethylester (**40**)

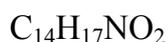
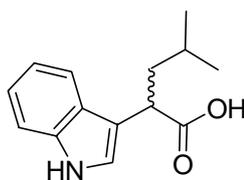


M: 189.08 g/mol

2.50 g (14.3 mmol) (1*H*-Indol-3-yl)-essigsäure wurden nach AAV 4 umgesetzt. Säulenchromatographische Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) lieferte 2.45 g (91%) (1*H*-Indol-3-yl)-essigsäuremethylester (**40**) als zähflüssige Substanz.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.7 (s, 3 H), 3.8 (s, 2 H), 7.15-7.30 (m, 3H), 7.33 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.64 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 8.1 (bs, 1 H); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 31.1, 51.9, 108.4, 111.2, 118.8, 119.7, 119.7, 122.2, 123.1, 127.2, 136.1, 172.5; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 16.60 min.

2-(1*H*-Indol-3-yl)-4-methylpentansäure (42a)

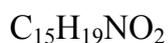
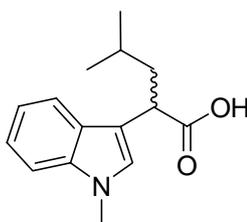


M: 231.13 g/mol

2-(1*H*-Indol-3-yl)-essigsäuremethylester (**40**) (2.45 g, 12.9 mmol), 16.6 mL Lithiumdiisopropylamid (26.4 mmol; 1.6 M in THF) und 2.49 g (16.9 mmol) Isobutylbromid wurden nach AAV 15 umgesetzt. Der Ester wurde anschließend säulenchromatographisch (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) gereinigt und nach AAV 10 hydrolysiert. Man erhielt 1.27 g (43% über zwei Stufen) des Produkts **42** als weißen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.94 (d, 3H, *J* = 3.5 Hz), 0.97 (d, 2H, *J* = 3.5 Hz), 1.51-1.65 (m, 1H), 1.75-1.85 (m, 1H), 2.00-2.07 (m, 1H), 4.01 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.11-7.31 (m, 3H), 7.35 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.72 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.90 (bs, 1H), 8.10 (bs, 1H); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 62.5 MHz): 22.5, 22.6, 26.1, 32.7, 40.7, 42.1, 109.2, 112.8, 119.1, 119.2, 121.7, 126.6, 127.1, 136.9, 175.4; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 20.51 min.

2-(1-Methyl-1*H*-indol-3-yl)-4-methylpentansäure (42b)

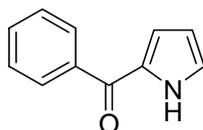


M: 245.14 g/mol

2-(1*H*-Indol-3-yl)-4-methylpentansäuremethylester (**41**) (1.70 g, 6.93 mmol), 0.80 g (7.28 mmol; [60%]) NaH und 1.03 g (7.28 mmol) Methyljodid wurden nach AAV 5 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) gereinigt. Der Methylester wurde anschließend nach AAV 10 hydrolysiert. Man erhielt 1.16 g (68% über zwei Stufen) des Produkts **42b** als zähflüssige Substanz.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.94 (d, 3H, *J* = 3.5 Hz), 0.97 (d, 2H, *J* = 3.5 Hz), 1.51-1.65 (m, 1H), 1.75-1.85 (m, 1H), 2.00-2.07 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 4.01 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.11-7.31 (m, 4H), 7.72 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 8.1 (bs, 1H); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 62.5 MHz): 22.5, 22.6, 26.1, 32.7, 40.7, 42.1, 51.8, 109.2, 112.8, 119.1, 119.2, 121.7, 126.6, 127.1, 136.9, 175.4; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 22.65 min.

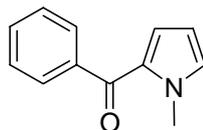
Phenyl-(1*H*-pyrrol-2-yl)-methanon (**45**)



M: 171.07 g/mol

6.26 g (46.5 mmol) Aluminiumchlorid, 3.09 mL (44.7 mmol) Pyrrol und 5.45 mL (46.9 mmol) Benzoylchlorid wurden nach AAV 29 in absoluten Dichlormethan umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) erhielt man 2.71 g (35%) der Zielverbindung **45** als gelbes Öl.

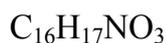
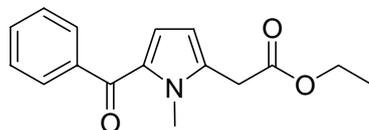
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 6.35 (dd, 1H, *J*₁ = 6.3 Hz, *J*₂ = 2.5 Hz), 6.73 (dd, 1H, *J*₁ = 4.0 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz), 6.90 (m, 1H), 7.45-7.61 (m, 3H), 7.90 (dd, 2H, *J*₁ = 7.5 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz), 9.8 (bs, 1H); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 111.0, 119.4, 125.3, 128.3, 128.9, 131.2, 131.8, 138.4, 184.8; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 18.88 min.

(1-Methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-phenylmethanon (46)

M: 185.08 g/mol

Phenyl-(1*H*-pyrrol-2-yl)-methanon (**45**) (2.71 g, 15.8 mmol), 0.70 g (17.4 mmol; [60%]) NaH und 1.28 mL (20.6 mmol) Methyljodid wurden nach AAV 5 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) gereinigt. Man erhielt 2.74 g (94% über zwei Stufen) des Produkts **46** als zähflüssige Substanz.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 4.04 (s, 3H), 6.15 (dd, 1H, *J*₁ = 4.0 Hz, *J*₂ = 2.5 Hz), 6.73 (dd, 1H, *J*₁ = 4.0 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz), 6.91 (m, 1H), 7.41-7.57 (m, 3H), 7.80 (dd, 2H, *J*₁ = 7.5 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 37.3, 108.1, 122.8, 128.0, 130.6, 131.3, 131.4, 140.0, 186.2; HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 21.23 min.

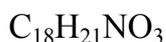
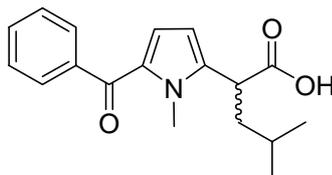
2-(1-Methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-phenylmethanon)-essigsäureethylester (47)

M: 271.12 g/mol

1.13 g (4.05 mmol) FeSO₄ · 7 H₂O, 5.00 g (27.0 mmol) (1-Methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-phenylmethanon (**46**) und 2.89 g (13.5 mmol) Iodessigsäureethylester wurden in 100 mL DMSO vorgelegt und auf eine Temperatur von -30 °C gekühlt. 1.84 g Wasserstoffperoxid [30 %] (54.0 mmol) wurden zutropft. Nach Rühren über einen Zeitraum von einer Stunde unter Auftauen der Kältemischung wurden erneut 5 mL wässrige Wasserstoffperoxidlösung [30%] (147 mmol) hinzugegeben. Nach weiteren 3 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit gesättigter Natriumchloridlösung versetzt und mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) lieferte 1.00 g (27%) der Zielverbindung **47** als zähflüssige Substanz.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.29 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz), 3.70 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 4.21 (q, 2 H, *J* = 7.1 Hz), 6.11 (d, 1H, *J* = 4.3 Hz), 6.67 (d, 1H, *J* = 4.3 Hz), 7.40-7.52 (m, 3H), 7.78 (dd, 2H, *J*₁ = 7.4 Hz, *J*₂ = 1.8 Hz); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 14.1, 30.8, 61.4, 109.5, 122.7, 127.9, 129.2, 131.2, 134.9, 140.1, 169.2, 186.0; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 21.23 min.

2-(1-Methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-phenylmethanon)-4-methylpentansäure (49)

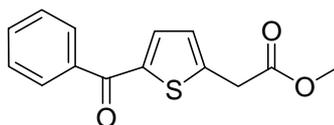


M: 299.15 g/mol

2-(1-Methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-phenylmethanon)-essigsäureethylester (**47**) (1.00 g, 3.69 mmol), 0.18 g (4.42 mmol; [60%]) NaH und 1.60 mL (14.7 mmol) Isobutylbromid wurden nach AAV 5 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde anschließend nach AAV 10 hydrolysiert. Man erhielt 0.90 g (76% über zwei Stufen) des Produkts **49** als weißen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.95 (d, 3H, *J* = 6.7 Hz), 0.97 (d, 3H, *J* = 6.7 Hz), 1.61-1.78 (m, 2H), 1.99-2.10 (m, 1H), 3.82 (dd, 1H, *J*₁ = 8.3 Hz, *J*₂ = 6.8 Hz), 6.14 (d, 1H, *J* = 4.3 Hz), 6.67 (d, 1H, *J* = 4.3 Hz), 7.40-7.55 (m, 3H), 7.78 (dd, 2H, *J*₁ = 7.4 Hz, *J*₂ = 1.8 Hz); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 22.3, 22.5, 26.1, 32.9, 40.8, 41.4, 107.5, 123.0, 127.9, 129.2, 131.0, 131.2, 140.2, 140.4, 172.1, 186.0; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 23.09 min.

2-(Thiophen-2-yl)-phenylmethanon)-essigsäuremethylester (51)



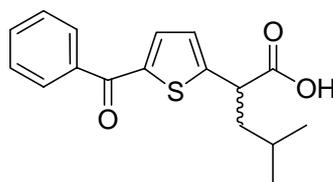
M: 260.05 g/mol

2.77 g (20.8 mmol) Aluminiumchlorid, 1.50 g (10.4 mmol) (Thiophen-2-yl)-essigsäuremethylester und 2.20 g (16.0 mmol) Benzoylchlorid wurden nach AAV 29

in absoluten Dichlormethan umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) erhielt man 2.21 g (82%) der Zielverbindung **51** als gelbes Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.76 (s, 3H), 3.90 (s, 2H), 7.02 (d, 1H, *J* = 3.8 Hz), 7.46-7.59 (m, 4H), 7.84 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 35.8, 52.5, 128.0, 128.4, 129.1, 132.2, 134.9, 138.0, 143.0, 144.7, 169.9, 187.9; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 23.33 min.

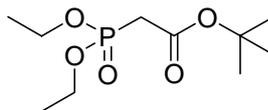
2-(Thiophen-2-yl)-phenylmethanon)-4-methylpentansäure (53)



M: 302.1 g/mol

2-(Thiophen-2-yl)-phenylmethanon)-essigsäuremethylester (**51**) (1.41 g, 5.42 mmol), 0.23 g (5.69 mmol; [60%]) NaH und 1.82 mL (16.9 mmol) Isobutylbromid wurden nach AAV 5 umgesetzt. Der Ester wurde säulenchromatographisch (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) gereinigt und anschließend nach AAV 10 mit Lithiumhydroxid in Dioxan/Wasser 1:1 hydrolysiert. Man erhielt 1.30 g (75% über zwei Stufen) des Produkts **53** als weißen Feststoff.

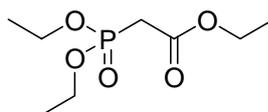
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.96 (2 x d, 6H, *J* = 6.5 Hz), 1.56-1.67 (m, 1H), 1.76-1.87 (m, 1H), 1.98-2.11 (m, 1H), 4.03 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.07 (d, 1H, *J* = 3.8 Hz), 7.16-7.29 (m, 2H), 7.46-7.62 (m, 2H), 7.85 (dd, 1H, *J*₁ = 7.5 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz), 9.50 (bs, 1H); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 22.1, 22.4, 26.9, 43.5, 45.6, 126.4, 128.4, 129.1, 132.2, 134.8, 138.1, 142.4, 151.5, 172.8, 188.0; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 21.45 min.

Diethylphosphorsäure-*tert*-butylacetat (63)

M: 252.11 g/mol

8.31 g (50.0 mmol) Diethylphosphit und 9.75 g (50.0 mmol) *tert*-Butylbromacetat wurden nach AAV 19 umgesetzt. Es wurden 5.83 g (46%) der Zielverbindung **63** als farblose Flüssigkeit (Sdp.: 175²¹ °C) erhalten.

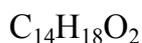
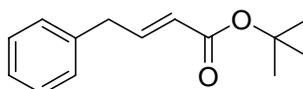
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.28 (t, 3H, *J* = 8.4 Hz), 1.38 (s, 9H), 2.79 (d, 2H, *J* = 21.5 Hz), 4.07 (q, 2H, *J* = 6.1 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 16.7, 28.3, (34.9 bzw. 37.0), 32.8, 82.3, 165.2.

Diethylphosphorsäure-ethylacetat (63b)

M: 224.08 g/mol

16.6 g (0.10 mol) Diethylphosphit und 18.4 g (0.11 mol) α-Bromessigsäureethylester wurden nach AAV 19 umgesetzt. Es wurden 13.8 g (56%) der Zielverbindung **63b** als farblose Flüssigkeit (Sdp.: 142²¹ °C) erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.22-1.35 (m, 9H), 2.93 (d, 2H, *J* = 22.5 Hz), 4.09-4.21 (m, 6H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 16.7, 18.3, (34.9 bzw. 37.0), 32.8, 48.5, 165.2.

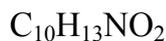
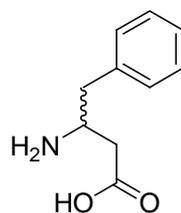
(E)-4-Phenylbut-2-ensäure-*tert*-butylester (57)

M: 218.13 g/mol

5.83 g (22.8 mmol) Diethylphosphorsäure-*tert*-butylacetat (**63**), 2.74 g (22.8 mmol) Phenylacetaldehyd und 0.60 g (25.1 mmol, [60%]) NaH wurden nach AAV 12 bei -78°C in THF umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) erhielt man 4.12 g (82%) der Zielverbindung **57** als farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.47$ (s, 9H), 3.50 (d, 2H, $J = 5.0$ Hz), 5.74 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz), 6.97-7.03 (m, 1H), 7.17-7.36 (m, 5H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz): $\delta = 28.5, 38.7, 80.6, 124.5, 126.8, 126.9, 129.0, 129.2, 138.4, 146.3, 166.2$; **HPLC** (30-100% in 30 min): $R_t = 21.88$ min.

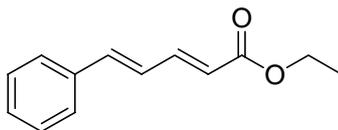
3-Amino-4-phenylbutansäure (**59**)



M: 179.09 g/mol

0.88 g (4.06 mmol) (*E*)-4-Phenylbut-2-ensäure-*tert*-butylester (**57**) und 1.30 g (6.10 mmol) Dibenzylamin wurden nach AAV 6 mit 3.80 ml *n*-BuLi (6.10 mmol, 1.6 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester/0.1% Triethylamin-Gradient) wurde das Amin **58** nach AAV 7 hydrogenolytisch gespalten und ohne weitere Aufreinigung der *tert*-Butylester nach AAV 9 zur freien Aminosäure **59** entschützt. Die Zielverbindung (0.25 g, 35% über 3 Stufen) wurde aus Dioxan ohne weitere Reinigung lyophilisiert.

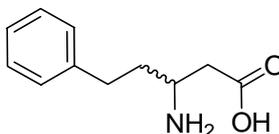
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.58$ (dd, 1H, $J_1 = 17.2$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz), 2.65 (dd, 1H, $J_1 = 14.5$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz), 2.99 (dd, 1H, $J_1 = 7.7$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz), 7.28-7.44 (m, 5H); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 9.50$ min.

(2E,4E)-5-phenylpenta-2,4-diensäureethylester (60)

M: 202.1 g/mol

4.16 g (20.0 mmol) Diethylphosphorsäure-ethylacetat (**63**), 2.52 g (20.0 mmol) Zimtaldehyd und 0.90 g (22.0 mmol, [60%]) NaH wurden nach AAV 12 bei -78°C in THF umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) erhielt man 3.20 g (79%) der Zielverbindung **60** als farbloses Öl.

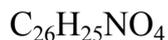
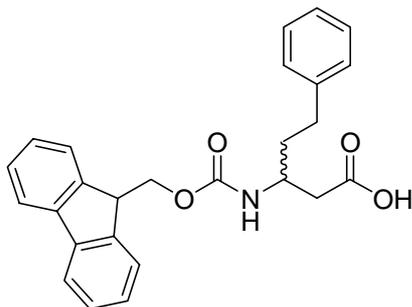
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.32$ (t, 3H, $J = 7.5$ Hz), 4.24 (q, 2H, $J = 7.5$ Hz), 6.00 (d, 1H, $J = 15.0$ Hz), 6.90 (m, 2H), 7.34-7.49 (m, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz): $\delta = 13.9, 60.2, 121.6, 126.6, 127.5, 127.6, 129.1, 136.4, 140.7, 144.9, 167.5$; **HPLC** (30-100% in 30 min): $R_t = 19.38$ min.

3-Amino-5-phenylpentansäure (62)

M: 193.11 g/mol

3.14 g (15.5 mmol) (2E,4E)-5-phenylpenta-2,4-diensäureethylester (**60**) und 4.24 g (20.0 mmol) Dibenzylamin wurden nach AAV 6 mit 12.5 mL *n*-BuLi (20.0 mmol, 1.6 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester/0.1% Triethylamin-Gradient) wurde der Ethylester **61** nach AAV 10 hydrolysiert und ohne weitere Aufreinigung das *N*-Benzylamin hydrogenolytisch nach AAV 7 zur freien Aminosäure **62** entschützt. Die Zielverbindung **62** (1.50 g, 50% über 3 Stufen) wurde aus Dioxan ohne weitere Reinigung lyophilisiert.

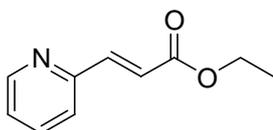
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.89$ -2.02 (m, 2H), 2.58 (dd, 1H, $J_1 = 17.2$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz), 2.62 (dd, 1H, $J_1 = 15.5$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz), 2.67-2.73 (m, 2H), 3.41-3.52 (m, 1H), 7.20-7.44 (m, 5H); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 11.12$ min.

N-Fmoc-3-Amino-5-phenylpentansäure (64)

M: 415.18 g/mol

3-Amino-5-phenylpentansäure (**62**) (1.50 g, 7.77 mmol) wurde mit 2.61 g (7.77 mmol) Fmoc-OSu und 0.90 g (10.7 mmol) NaHCO_3 nach AAV 1 zu der Fmoc-geschützten Verbindung **64** umgesetzt. Der erhaltene Niederschlag wurde aus Wasser lyophilisiert. Man erhielt 2.26 g (70%) der Zielverbindung **64**.

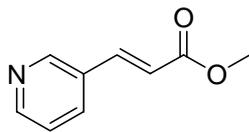
HPLC (5-100% in 30 min): $R_t = 26.05$ min; **ESI-MS**: m/z 1285.0 (20) $[3\text{M}+\text{K}]^+$, 1268.0 (15) $[3\text{M}+\text{Na}]^+$, 1245.5 (5) $[3\text{M}+\text{H}]^+$, 870.2 (40) $[2\text{M}+\text{K}]^+$, 853.4 (45) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 831.0 (20) $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 438.4 (35) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 416.2 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(E)-3-(Pyridin-2-yl)-acrylsäureethylester (67a)

M: 177.08 g/mol

1.90 g (7.42 mmol) Diethylphosphorsäure-ethylacetat (**63b**), 0.87 g (8.16 mmol) Picolinaldehyd und 5.10 mL *n*-BuLi (8.16 mmol, 1.6 M Lösung in Hexan) wurden nach AAV 12 bei -78°C in THF umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) erhielt man 1.05 g (80%) der Zielverbindung **67a** als farbloses Öl.

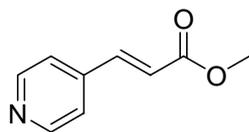
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.37$ (t, 3H, $J = 7.3$ Hz), 4.31 (q, 2H, $J = 7.3$ Hz), 6.65 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz), 7.30 (dt, 1H, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 1.0$ Hz), 7.46 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.45 (dt, 1H, $J_1 = 7.1$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz), 7.72 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz), 8.68 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 11.61$ min.

(E)-3-(Pyridin-3-yl)-acrylsäuremethylester (67b)C₉H₉NO₂

M: 163.06 g/mol

6.00 g (33.1 mmol) Diethylphosphorsäure-ethylacetat (**63b**), 3.91 g (36.5 mmol) Nicotinaldehyd und 1.40 g (36.5 mmol, [60%]) NaH wurden nach AAV 12 bei -78°C in THF umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) erhielt man 4.05 g (75%) der Zielverbindung **67b** als farbloses Öl.

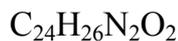
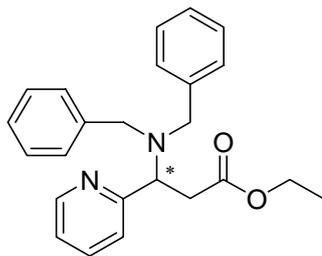
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.82 (s, 3H), 6.55 (d, 1H, *J* = 16.3 Hz), 7.39 (dd, 1H, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 4.8 Hz), 7.71 (d, 1H, *J* = 16.3 Hz), 7.90 (dt, 1H, *J*₁ = 7.8 Hz, *J*₂ = 1.8 Hz), 8.64 (dd, 1H, *J*₁ = 4.8 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz), 8.78 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz); HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 8.55 min.

(E)-3-(Pyridin-3-yl)-acrylsäuremethylester (67c)C₉H₉NO₂

M: 163.06 g/mol

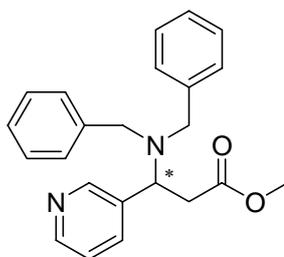
4.00 g (22.3 mmol) Diethylphosphorsäure-ethylacetat (**63b**), 2.68 g (25.0 mmol) Isonicotinaldehyd und 15.4 mL *n*-BuLi (25.0 mmol, 1.6 M Lösung in Hexan) wurden nach AAV 12 bei -78°C in THF umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) erhielt man 2.54 g (70%) der Zielverbindung **67c** als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.81 (s, 3H), 6.58 (d, 1H, *J* = 16.3 Hz), 7.34-7.37 (m, 2H), 7.59 (d, 1H, *J* = 16.3 Hz), 8.63-8.65 (m, 2H); HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 8.50 min.

3-(Dibenzylamino)-3-(pyridin-2-yl)-propansäureethylester (68a)

1.41 g (7.97 mmol) (E)-3-(Pyridin-2-yl)-acrylsäureethylester (**67a**) und 3.14 g (16.0 mmol) Dibenzylamin wurden nach AAV 6 mit 10.0 mL *n*-BuLi (16.0 mmol, 1.6 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester/0.1% Triethylamin-Gradient) erhielt man 1.94 g (65%) der Zielverbindung **68a** als farbloses Öl.

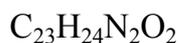
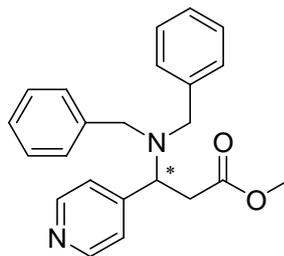
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.17 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz), 3.17-3.21 (m, 2H), 3.50-3.54 (m, 2H), 3.78-3.81 (m, 2H), 4.10 (q, 2H, *J* = 7.3 Hz), 4.49-4.56 (m, 1H), 7.19-7.41 (m, 12H), 7.70 (dt, 1H, *J*₁ = 7.1 Hz, *J*₂ = 1.8 Hz), 8.59 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 21.28 min; **ESI-MS**: *m/z* 375.2 (100) [M+H]⁺.

3-(Dibenzylamino)-3-(pyridin-3-yl)-propansäuremethylester (68b)

2.83 g (17.4 mmol) (E)-3-(Pyridin-3-yl)-acrylsäuremethylester (**67b**) und 4.45 g (22.6 mmol) Dibenzylamin wurden nach AAV 6 mit 14.3 mL *n*-BuLi (22.6 mmol, 1.6 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester/0.1% Triethylamin-Gradient) erhielt man 4.39 g (70%) der Zielverbindung **68b** als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 2.75 (dd, 1H, $J_1 = 14.8$ Hz, $J_2 = 9.3$ Hz), 3.02 (dd, 1H, $J_1 = 14.5$ Hz, $J_2 = 6.3$ Hz), 3.33 (d, 2H, $J = 13.5$ Hz), 3.67 (d, 2H, $J = 13.5$ Hz), 3.82 (s, 3H), 4.31 (dd, 1H, $J_1 = 9.3$ Hz, $J_2 = 6.3$ Hz), 7.18-7.39 (m, 11H), 7.63 (dt, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz), 8.54 (dd, 1H, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz), 8.57 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 20.98$ min; **ESI-MS**: m/z 361.2 (100) [M+H]⁺.

3-(Dibenzylamino)-3-(pyridin-4-yl)-propansäuremethylester (68c)

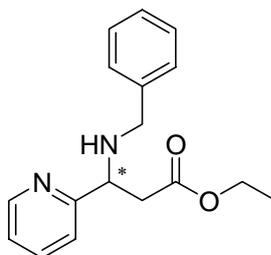


M: 360.18 g/mol

2.83 g (17.4 mmol) (E)-3-(Pyridin-4-yl)-acrylsäuremethylester (**67c**) und 4.45 g (22.6 mmol) Dibenzylamin wurden nach AAV 6 mit 14.3 mL *n*-BuLi (22.6 mmol, 1.6 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester/0.1% Triethylamin-Gradient) erhielt man 4.39 g (70%) der Zielverbindung **68c** als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 2.80 (dd, 1H, $J_1 = 15.0$ Hz, $J_2 = 8.3$ Hz), 3.12 (dd, 1H, $J_1 = 15$ Hz, $J_2 = 6.8$ Hz), 3.29 (d, 2H, $J = 13.5$ Hz), 3.67 (d, 2H, $J = 13.5$ Hz), 3.65 (s, 3H), 4.33 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.21-7.63 (m, 12 H), 8.62 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 19.83$ min; **ESI-MS**: m/z 361.2 (100) [M+H]⁺.

3-(Benzylamino)-3-(pyridin-2-yl)-propansäureethylester (69a)

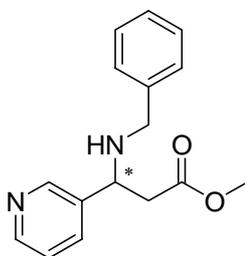


M: 284.15 g/mol

2.09 g (5.59 mmol) 3-(Dibenzylamino)-3-(pyridin-2-yl)-propansäureethylester (**68a**) und 6.43 g (11.7 mmol) Cerammomiumnitrat $\text{NH}_4\text{Cer(IV)(NO}_3)_6$ wurden nach AAV 20 in Wasser/Acetonitril oxidativ debenzyliert. Man erhielt nach chromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester/0.1 % Triethylamin-Gradient) 1.06 g (67%) der Verbindung **69a** als farbloses Öl.

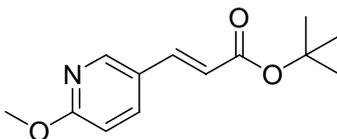
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.18$ (t, 3H, $J = 7.0$ Hz), 2.84 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.67 (2 x dd, 2H, $J_1 = 13.3$ Hz, $J_2 = 13.3$ Hz), 4.13 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz), 4.24 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz), 7.19-7.40 (m, 8H), 7.69 (dt, 1H, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 14.96$ min; **ESI-MS**: m/z 285.2 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-(Benzylamino)-3-(pyridin-2-yl)-propansäuremethylester (**69b**)



3.64 g (10.0 mmol) 3-(Dibenzylamino)-3-(pyridin-3-yl)-propansäuremethylester (**68b**) und 22.2 g (40.0 mmol) Cerammomiumnitrat $\text{NH}_4\text{Cer(IV)(NO}_3)_6$ wurden nach AAV 20 in Acetonitril/Wasser 5:1 oxidativ debenzyliert. Man erhielt nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester/0.1% Triethylamin-Gradient) 2.03 g (75%) der Verbindung **69b** als farbloses Öl.

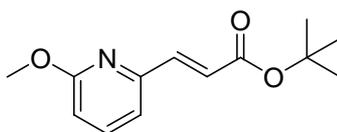
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.68$ (dd, 2H, $J_1 = 14.8$ Hz, $J_2 = 8.5$ Hz), 2.81 (dd, 2H, $J_1 = 14.5$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz), 3.63 (2 x dd, 2H, $J_1 = J_2 = 13.5$ Hz), 3.67 (s, 3H), 4.19 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz), 7.19-7.40 (m, 6H), 7.63 (dt, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz), 8.58 (dd, 1H, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz), 8.57 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 9.71$ min; **ESI-MS**: m/z 271.3 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(E)-3-(6-Methoxypyridin-3-yl)-acrylsäure-*tert*-butylester (71a)

M: 235.12 g/mol

7.27 g (38.6 mmol) 4-Brom-2-methoxypyridin wurde nach AAV 21 mit 25.3 mL *n*-BuLi (40.5 mmol, 1.6 M Lösung in Hexan) und 5.64 g (77.2 mmol) *N,N'*-Dimethylformamid ohne weitere Aufreinigung in den Aldehyd **70a** überführt. Dieser wurde anschließend mit 9.73 g (38.6 mmol) Diethylphosphorsäure-*tert*-butylacetat (**63**) und 25.3 mL *n*-BuLi (41.0 mmol, 1.6 M Lösung in Hexan) nach AAV 12 bei -78°C in THF zu der Zielverbindung **71a** umgesetzt. Man erhielt nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester/0.1% Triethylamin-Gradient) 6.80 g (75% über 2 Stufen) der Verbindung **71a** als weißen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.53 (s, 9H), 3.96 (s, 3H), 6.26 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 6.75 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.53 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz), 7.75 (dd, 1H, *J*₁ = 8.8 Hz, *J*₂ = 2.5 Hz), 8.25 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 28.2, 53.7, 80.6, 111.5, 119.1, 124.0, 136.3, 139.9, 148.1, 165.1, 166.1; **HPLC** (30-100% in 30 min): *R*_t = 28.31 min; **ESI-MS**: *m/z* 236.0 (100) [M+H]⁺, 180.2 (45) [M-^tBu]⁺.

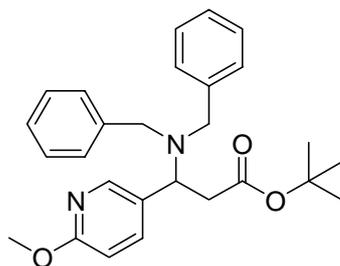
(E)-3-(6-Methoxypyridin-2-yl)-acrylsäure-*tert*-butylester (71b)

M: 235.12 g/mol

7.65 g (40.7 mmol) 5-Brom-2-methoxypyridin wurde nach AAV 21 mit 26.7 mL *n*-BuLi (42.7 mmol, 1.6 M Lösung in Hexan) und 5.95 g (81.4 mmol) *N,N'*-Dimethylformamid ohne weitere Aufreinigung in den Aldehyd **70b** überführt. Dieser wurde anschließend mit 8.53 g (33.9 mmol) Diethylphosphorsäure-*tert*-butylacetat (**63**) und 22.3 mL *n*-BuLi (35.6 mmol, 1.6 M Lösung in Hexan) nach AAV 12 bei -78°C in THF zu der Zielverbindung **71b** umgesetzt. Man erhielt nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester/0.1% Triethylamin-Gradient) 5.70 g (60% über 2 Stufen) der Verbindung **71b** als weißen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.54$ (s, 9H), 3.97 (s, 3H), 6.72 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 0.5$ Hz), 6.87 (d, 1H, $J = 15.5$ Hz), 6.93 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 7.48 (d, 1H, $J = 15.5$ Hz), 7.55 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 7.3$ Hz); **$^{13}\text{C-NMR}$** (CDCl_3 , 62.5 MHz): $\delta = 28.2, 53.2, 80.6, 112.5, 118.1, 123.7, 138.9, 142.1, 150.4, 163.7, 166.4$; **HPLC** (30-100% in 30 min): $R_t = 28.43$ min; **ESI-MS**: m/z 236.0 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 180.2 (45) $[\text{M}-t\text{Bu}]^+$.

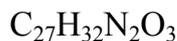
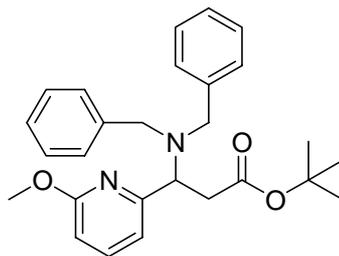
3-(Dibenzylamino)-3-(6-methoxypyridin-3-yl)-propansäure-*tert*-butylester (72a)



M: 432.24 g/mol

7.86 g (33.4 mmol) (E)-3-(6-Methoxypyridin-3-yl)-acrylsäure-*tert*-butylester (**71a**) und 8.48 g (43.0 mmol) Dibenzylamin wurden nach AAV 6 mit 26.9 mL *n*-BuLi (43.0 mmol, 1.6 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester/0.1% Triethylamin-Gradient) erhielt man 10.8 g (75%) der Zielverbindung **72a** als farbloses Öl.

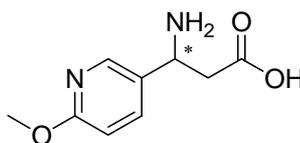
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.48$ (s, 9H), 2.72 (dd, 1H, $J_1 = 14.5$ Hz, $J_2 = 9.0$ Hz), 3.01 (dd, 1H, $J_1 = 14.5$ Hz, $J_2 = 6.5$ Hz), 3.32 (d, 2H, $J = 13.8$ Hz), 3.70 (d, 2H, $J = 13.8$ Hz), 3.98 (s, 3H), 4.26 (t, 1H, $J = 8.5$ Hz), 6.78 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 7.23-7.39 (m, 10H), 7.56 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz), 8.12 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz); **HPLC** (30-100% in 30 min): $R_t = 24.08$ min; **ESI-MS**: m/z 433.3 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 377.5 (5) $[\text{M}-t\text{Bu}]^+$.

3-(Dibenzylamino)-3-(6-methoxypyridin-2-yl)-propansäure-*tert*-butylester (72b)

M: 432.24 g/mol

4.61 g (19.6 mmol) (E)-3-(6-Methoxypyridin-2-yl)-acrylsäure-*tert*-butylester (**71b**) und 4.64 g (23.6 mmol) Dibenzylamin wurden nach AAV 6 mit 14.8 mL *n*-BuLi (23.6 mmol, 1.6 M Lösung in Hexan) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester/0.1% Triethylamin-Gradient) erhielt man 5.50 g (65%) der Zielverbindung **72b** als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.37 (s, 9H), 2.94 (dd, 1H, *J*₁ = 15.3 Hz, *J*₂ = 6.0 Hz), 3.08 (dd, 1H, *J*₁ = 15.0 Hz, *J*₂ = 8.8 Hz), 3.45 (d, 2H, *J* = 14.0 Hz), 3.82 (d, 2H, *J* = 14.0 Hz), 3.97 (s, 3H), 4.26 (dd, 1H, *J*₁ = 8.5 Hz, *J*₂ = 6.3 Hz), 6.65 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 6.88 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 7.22-7.42 (m, 10H), 7.58 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz); HPLC (30-100% in 30 min): R_t = 23.73 min; ESI-MS: *m/z* 433.3 (100) [M+H]⁺, 377.5 (5) [M-^tBu]⁺.

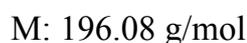
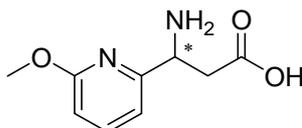
3-Amino-3-(6-methoxypyridin-3-yl)-propansäure (73a)

M: 196.08 g/mol

10.8 g (25.0 mmol) 3-(Dibenzylamino)-3-(6-methoxypyridin-3-yl)-propansäure-*tert*-butylester (**72a**) wurden durch hydrogenolytische Debenzylierung nach AAV 7 und Spaltung des *tert*-Butylesters nach AAV 9 in die freie β-Aminosäure **73a** überführt. Die Reaktion verlief quantitativ (4.71 g). Nach Lyophilisieren wurde das Produkt als weißer Feststoff erhalten.

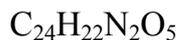
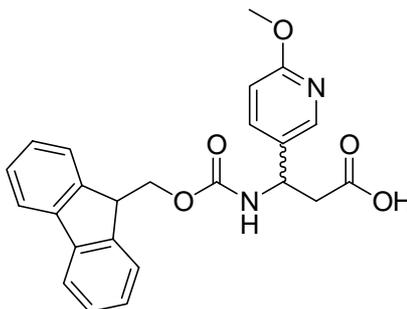
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 2.50-2.61 (m, 2H), 3.92 (s, 3H), 4.31 (dd, 1H, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz), 6.72 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 7.62 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 2.5$ Hz), 8.12 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz); 8.1 (bs, 1H), 11.2 (bs, 1H); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 43.7, 42.2, 53.4, 109.2, 113.4, 139.1, 160.2, 163.8, 171.3; **HPLC** (30-100% in 30 min): $R_t = 7.97$ min; **ESI-MS**: m/z 197.1 (100) [M+H]⁺, 180.2 (15) [M-OH]⁺; 417.4 (10) [2M+Na]⁺, 431.4 (15) [2M+K]⁺.

3-Amino-3-(6-methoxypyridin-2-yl)-propansäure (73b)



5.50 g (12.7 mmol) 3-(Dibenzylamino)-3-(6-methoxypyridin-2-yl)-propansäure-*tert*-butylester (**72b**) wurden durch hydrogenolytische Debenzylierung nach AAV 7 und Spaltung des *tert*-Butylesters nach AAV 9 in die freie β -Aminosäure **73b** überführt. Die Reaktion verlief quantitativ (2.49 g). Nach Lyophilisieren wurde das Produkt als weißer Feststoff erhalten.

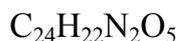
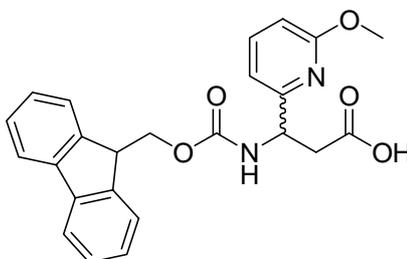
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.01 (dd, 1H, $J_1 = 18.0$ Hz, $J_2 = 3.5$ Hz), 3.17 (dd, 1H, $J_1 = 18.0$ Hz, $J_2 = 9.5$ Hz), 3.90 (s, 3H), 4.84 (dd, 1H, $J_1 = 9.5$ Hz, $J_2 = 3.5$ Hz), 6.80 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 6.93 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 7.67 (dd, 1H, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 7.3$ Hz), 8.05 (bs, 1H), 11.0 (bs, 1H); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 43.7, 53.2, 53.4, 109.2, 113.4, 139.1, 160.2, 163.8, 171.3; **HPLC** (30-100% in 30 min): $R_t = 7.97$ min; **ESI-MS**: m/z 197.1 (100) [M+H]⁺, 180.2 (15) [M-OH]⁺; 417.4 (10) [2M+Na]⁺, 431.4 (15) [2M+K]⁺.

***N*-Fmoc-3-amino-3-(6-methoxypyridin-3-yl)-propansäure (74a)**

M: 418.15 g/mol

0.70 g (2.26 mmol) 3-Amino-3-(6-methoxypyridin-3-yl)-propansäure (**73a**), 0.76 g (2.26 mmol) Fmoc-OSu und 0.48 g (5.56 mmol) NaHCO₃ wurden nach AAV 1 umgesetzt. Es wurden 0.65 g (68%) der Zielverbindung nach Lyophilisieren als weißer Feststoff erhalten.

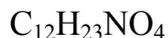
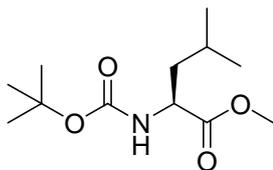
HPLC (30-100% in 30 min): R_t= 24.29 min; **ESI-MS**: *m/z* 419.2 (100) [M+H]⁺, 837.8 (5) [2M+H]⁺, 859.3 (15) [2M+Na]⁺, 876.3 (15) [2M+K]⁺.

***N*-Fmoc-3-amino-3-(6-methoxypyridin-2-yl)-propansäure (74b)**

M: 418.15 g/mol

0.70 g (2.26 mmol) 3-Amino-3-(6-methoxypyridin-2-yl)-propansäure (**73b**), 0.76 g (2.26 mmol) Fmoc-OSu und 0.48 g (5.56 mmol) NaHCO₃ wurden nach AAV 1 umgesetzt. Es wurden 0.57 g (60%) der Zielverbindung **74 b** nach Lyophilisieren als weißer Feststoff erhalten.

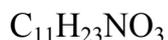
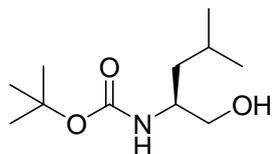
HPLC (30-100% in 30 min): R_t= 20.90 min; **ESI-MS**: *m/z* 419.2 (100) [M+H]⁺, 837.8 (5) [2M+H]⁺, 859.3 (15) [2M+Na]⁺, 876.3 (15) [2M+K]⁺.

***tert*-Butyl-(S)-1-(methoxycarbonyl)-3-methylbutylcarbamate (**76**)**

M: 245.16 g/mol

13.8 g (76.2 mmol) Leucinmethylesterhydrochlorid, 15.4 g (0.15 mol) Triethylamin und 17.5 g (80.0 mmol) *tert*-Butyloxycarbonylanhydrid (Boc)₂O wurden nach AAV 16 in THF bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung erhielt man 11.1 g (59%) der Zielverbindung **76** als farbloses Öl.

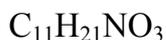
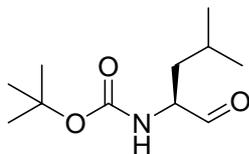
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.94 (d, 6H, *J* = 6.3 Hz), 1.43 (s, 9H), 1.49 (m, 3H), 3.72 (s, 3H), 4.30-4.35 (m, 1H), 4.86-4.90 (m, 1H).

***tert*-Butyl-(S)-1-hydroxy-4-methylpentan-2-ylcarbamate (**77**)**

M: 217.17 g/mol

Eine Lösung von 11.1 g (45.4 mmol) *tert*-Butyl-(S)-1-(methoxycarbonyl)-3-methylbutylcarbamate (**76**) in 50 mL Ethanol wurde bei 0°C zu einer Suspension von 10.3 g (0.27 mol) Natriumborhydrid in 100 mL 50%-igem Ethanol getropft und 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die wässrige Phase abgetrennt und mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natruimsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) gereinigt. Es konnten 6.40 g (65%) der Zielverbindung **77** als farbloses Öl isoliert werden.

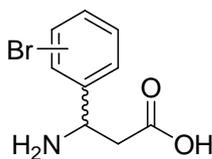
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.94 (d, 3H, *J* = 1.3 Hz), 0.97 (d, 3H, *J* = 1.3 Hz), 1.31-1.37 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.67-1.72 (m, 1H), 3.52 (dd, 1H, *J*₁ = 10.8 Hz, *J*₂ = 5.8 Hz), 3.68 (dd, 1H, *J*₁ = 11.0 Hz, *J*₂ = 3.5 Hz), 3.75 (bs, 1H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 22.2, 23.0, 24.7, 28.4, 40.6, 60.4, 79.4, 156.5.

***tert*-Butyl-(S)-1-formyl-3-methylbutylcarbamate (78)**

M: 215.15 g/mol

2.50 g (11.5 mmol) *tert*-Butyl-(S)-1-hydroxy-4-methylpentan-2-ylcarbamate (**77**), 1.61 g (12.7 mmol) Oxalylchlorid, 1.98 g (25.3 mmol) Dimethylsulfoxid und 7.42 g (57.5 mmol) DIPEA wurden in absoluten Dichlormethan bei -30°C nach AAV 3 zu dem entsprechenden Aldehyd umgesetzt. Der Aldehyd **78** wurde ohne weitere Aufreinigung eingesetzt, da eine säulenchromatographische Trennung zur Zersetzung führt.

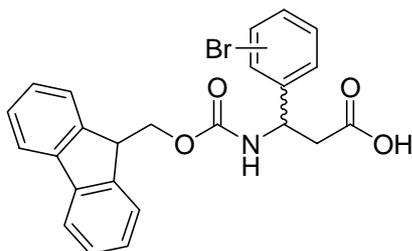
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.94 (d, 3H, *J* = 1.3 Hz), 0.97 (d, 3H, *J* = 1.3 Hz), 1.31-1.37 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.67-1.72 (m, 1H), 3.75 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 10.5 (s, 1H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 21.9, 22.5, 23.1, 24.6, 28.3, 58.4, 80.3, 155.6, 200.5.

3-Amino-3-(bromphenyl)-propansäure (81)

M: 259.02 g/mol

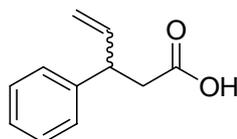
Die verschieden substituierten 3-Amino-3-(bromphenyl)-propansäure Derivate wurden nach AAV 2 aus 4.66 mL (40.0 mmol) Brombenzaldehyd, 4.16 g (40.0 mmol) Malonsäure und 6.17 g (80.0 mmol) Ammoniumacetat NH₄OAc erhalten. Nach Waschen des Rohprodukts mit kaltem Ethanol erhielt man die Zielprodukte **81a**, **81b** und **81c** als weiße Feststoffe in befriedigenden Ausbeuten.

HPLC_{ortho} (5-100% in 30 min): R_t= 11.00 min; **HPLC**_{meta} (5-100% in 30 min): R_t= 11.18 min; **HPLC**_{para} (5-100% in 30 min): R_t= 9.95 min.

N-Fmoc-3-amino-3-(bromphenyl)-propansäure (82)

2.10 g (8.64 mmol) 3-Amino-3-(bromphenyl)-propansäure (**81**), 2.92 g (8.64 mmol) Fmoc-OSu und 1.16 g (13.8 mmol) NaHCO_3 wurden nach AAV 1 in Aceton/Wasser umgesetzt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferte die Zielverbindungen **82a**, **82b** und **82c** als weiße Feststoffe in befriedigenden Ausbeuten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 2.53$ (m, 2H), 4.16-4.24 (m, 3H), 4.86-4.92 (m, 1H), 7.18-7.40 (m, 8H), 7.63 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.84 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz), 7.93 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz); **HPLC_{ortho}** (5-100% in 30 min): $R_t = 24.10$ min; **HPLC_{meta}** (5-100% in 30 min): $R_t = 24.18$ min; **HPLC_{para}** (5-100% in 30 min): $R_t = 25.43$ min; **ESI-MS**: m/z 465.9 (50) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 718.8 (5) $[(3\text{M}+\text{K})/2]^+$, 932.6 (100) $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 954.6 (30) $[2\text{M}+\text{K}]^+$, 1418.1 (15) $[3\text{M}+\text{Na}]^+$, 1884.9 (10) $[4\text{M}+\text{Na}]^+$.

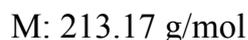
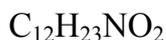
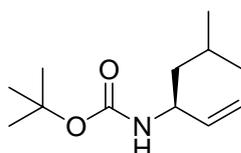
3-Phenylpent-4-ensäure (87)

6.71 g (50.0 mmol) Zimtalkohol und 40.6 g (0.25 mol) Triethylorthoacetat wurden unter Katalyse von 0.31 g (3.00 mmol) Pivalinsäure 3 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Das entstehende Wasser wurde azeotroph abdestilliert. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung abgekühlt und mit 5.61 g (0.10 mmol) KOH in Ethanol versetzt. Die Reaktionslösung wurde 5 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingeeengt und der Rückstand mit Essigsäureethylester und 1 N HCl aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten organischen Phasen mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum

abgezogen. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Hexan/Essigsäureethylester/ 0.1% Essigsäure-Gradient) erhielt man 4.51 g (51%) der Zielverbindung **87** als weißen Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 2.73-2.90 (m, 2H), 3.90 (q, 1H, *J* = 7.5 Hz), 5.10 (dt, 1H, *J*₁ = 5.5 Hz, *J*₂ = 1.3 Hz), 5.15-5.16 (m, 1H), 5.95-6.06 (m, 1H), 7.20-7.39 (m, 5H); HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 20.35 min.

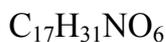
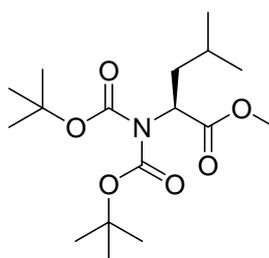
***tert*-Butyl-(*S*)-5-methylhex-1-en-3-ylcarbamat (**88**)**



2.80 g (13.0 mmol) Aldehyd und 4.64 g (13.0 mmol) Methyltriphenylphosphoniumbromid wurden nach AAV 12 mit 8.13 mL *n*-BuLi (0.13 mmol, 1.6 M Lösung in Hexan) bei -78°C umgesetzt. Man erhielt nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) 0.50 g (18%) der Zielverbindung (**88**) als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.94 (d, 3H, *J* = 1.8 Hz), 0.97 (d, 3H, *J* = 1.8 Hz), 1.36 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 1.48 (s, 9H), 1.65-1.74 (m, 1H), 4.11-4.20 (m, 1H), 4.38 (bs, 1H), 5.09 (dt, 1H, *J*₁ = 10.5 Hz, *J*₂ = 1.3 Hz), 5.18 (dt, 1H, *J*₁ = 17.5 Hz, *J*₂ = 1.3 Hz), 5.78 (ddd, 1H, *J*₁ = 17.5 Hz, *J*₂ = 10.5 Hz, *J*₃ = 5.5 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 22.5, 22.7, 24.7, 28.4, 44.5, 66.4, 79.3, 114.0, 139.5, 171.4.

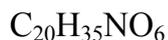
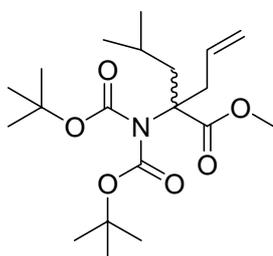
***N,N*-Bis-(*tert*-butoxycarbonyl)-Leucinmethylester (**89**)**



4.08 g (16.6 mmol) *tert*-Butyl-(S)-1-(methoxycarbonyl)-3-methylbutylcarbamat (**76**) wurde nach AAV 15 mit 11.4 mL LDA (18.3 mmol, 1.6 M Lösung in THF) deprotoniert und anschließend mit 3.62 g (18.3 mmol) *tert*-Butyloxycarbonylanhydrid zu dem Zielmolekül **89** umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) wurden 4.70 g (82%) der Zielverbindung **89** als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (d, 3H, *J* = 2.5 Hz), 0.93 (d, 3H, *J* = 2.5 Hz), 1.56 (s, 18H), 1.72-1.99 (m, 3H), 3.71 (s, 3H), 4.32 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz).

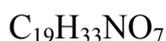
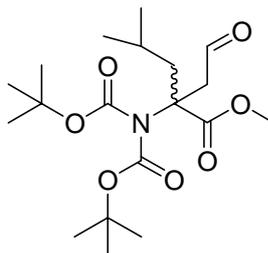
N,N-Bis-(*tert*-butoxycarbonyl)-2-amino-2-isobutylpent-4-ensäuremethylester (**90**)



M: 385.25 g/mol

4.50 g (13.0 mmol) *N,N*-Bis-(*tert*-butoxycarbonyl)-Leucinmethylester (**89**) wurde nach AAV 15 mit 9.00 mL LDA (13.3 mmol, 1.6 M Lösung in THF) deprotoniert und anschließend mit 1.57 g (17.0 mmol) Allylbromid zu dem Zielmolekül **90** alkyliert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) erhielt man 4.15 g (83%) als farbloses Öl.

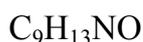
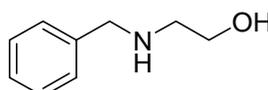
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (d, 3H, *J* = 2.5 Hz), 0.93 (d, 3H, *J* = 2.5 Hz), 1.57 (s, 18H), 1.72-1.99 (m, 3H), 2.60 (dd, 1H, *J*₁ = 14.3 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz), 2.94 (dd, 1H, *J*₁ = 14.0 Hz, *J*₂ = 6.5 Hz), 3.71 (s, 3H), 5.05-5.08 (m, 1H), 5.11-5.15 (m, 1H), 5.72-5.89 (m, 1H).

***N,N*-Bis-(*tert*-butoxycarbonyl)-2-amino-2-(formylmethyl)-4-methylpentansäuremethylester (91)**

M: 387.23 g/mol

2.00 g (5.20 mmol) *N,N*-Bis-(*tert*-butoxycarbonyl)-2-amino-2-isobutylpent-4-ensäuremethylester (**90**) wurden nach AAV 24 mit 3.33 g (15.6 mmol) Natriumperiodat NaIO₄ zu dem entsprechenden Aldehyd **91** umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) erhielt man 0.96 g (48%) als farbloses Öl.

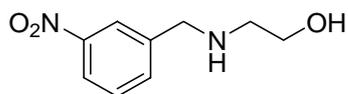
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.87 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz), 0.93 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz), 1.48 (s, 18H), 1.62-1.98 (m, 3H), 2.85 (dd, 1H, *J*₁ = 17.5 Hz, *J*₂ = 3.5 Hz), 3.12 (dd, 1H, *J*₁ = 15.3 Hz, *J*₂ = 2.3 Hz), 3.75 (s, 3H), 9.85 (dd, 1H, *J*₁ = 3.8 Hz, *J*₂ = 2.3 Hz).

2-(Benzylamino)-ethanol (93)

M: 151.1 g/mol

5.00 g (47.0 mmol) Benzaldehyd und 2.87 g (47.0 mmol) Aminoethanol wurden mit 6.49 g (47.0 mmol) Kaliumcarbonat 4 Stunden in Ethanol unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten der Reaktionslösung wurde die Lösung filtriert. Das in Methanol gelöste Imin-Intermediat wurde anschließend mit 2.12 g (56.0 mmol) NaBH₄ zu der Zielverbindung **93** reduziert. Die Aufarbeitung des Rohprodukts erfolgte nach AAV 23. Es konnten 6.75 g (95%) ohne weitere Aufreinigung isoliert werden.

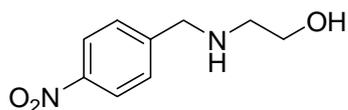
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 2.19 (bs, 1H), 2.84 (t, 2H, *J* = 5.3 Hz), 3.69 (t, 2H, *J* = 5.3 Hz), 3.85 (s, 1H), 7.27-7.37 (m, 5H); HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 11.06 min.

2-(3-Nitrobenzylamino)-ethanol

M: 196.08 g/mol

5.00 g (23.1 mmol) 3-Nitrobenzylbromid, 2.83 g (46.3 mmol) Aminoethanol und 3.67 g (34.7 mmol) Natriumcarbonat wurden nach AAV 23 umgesetzt. Man konnte 3.16 g (72%) der Zielverbindung als hellgelben Feststoff isolieren.

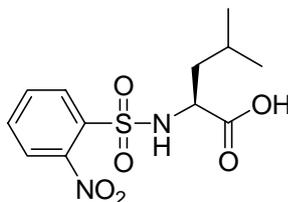
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 2.82 (t, 2H, J = 5.5 Hz), 2.80 (t, 2H, J = 5.5 Hz), 3.20 (bs, 1H), 3.87 (s, 3H), 7.57 (t, 1H, J = 8.0 Hz), 7.74-7.78 (m, 1H), 8.10-8.14 (m, 1H), 6.76 (s, 1H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 9.60 min.

2-(4-Nitrobenzylamino)-ethanol

M: 196.08 g/mol

5.00 g (23.1 mmol) 4-Nitrobenzylbromid, 2.83 g (46.3 mmol) Aminoethanol und 3.67 g (34.7 mmol) Natriumcarbonat wurden nach AAV 23 umgesetzt. Man konnte 2.80 g (69%) der Zielverbindung als hellgelben Feststoff isolieren.

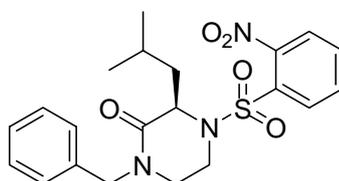
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 2.82 (t, 2H, J = 5.5 Hz), 2.80 (t, 2H, J = 5.5 Hz), 3.20 (bs, 1H), 3.87 (s, 3H), 7.60 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 8.23 (d, 2H, J = 9.0 Hz); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 9.88 min.

***N*-(*o*-Nitrosulfonamido)-(S)-2-amino-4-methylpentansäure (94)**

M: 316.07 g/mol

3.00 g (16.5 mmol) (L)-Leucinmethylesterhydrochlorid und 4.39 g (19.8 mmol) *o*-Nitrosulfonsäure wurden nach AAV 18 mit 7.00 mL (49.5 mmol) Triethylamin umgesetzt. Das Rohprodukt wurde anschließend nach AAV 10 zu der freien Säure **94** hydrolysiert. Nach Kristallisation (Hexan/Essigsäureethylester) wurden 3.70 g (71%) der freien Säure **94** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.97 (d, 6H, *J* = 6.5 Hz), 1.61-1.66 (m, 2H), 1.82-1.90 (m, 1H), 4.23-4.29 (m, 1H), 5.98 (d, 1H, *J* = 9.8 Hz), 7.74-7.80 (m, 2H), 7.94-7.98 (m, 1H), 8.08-8.12 (m, 1H); HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 20.26 min.

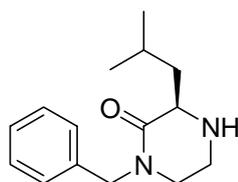
***N*-(*o*-Nitrosulfonamido)-(R)-1-benzyl-3-isobutylpiperazin-2-on (96)**

M: 431.15 g/mol

Zu einer Lösung von 2.50 g (7.91 mmol) *N*-(*o*-Nitrosulfonamido)-(S)-2-amino-4-methylpentansäure (**94**) in absoluten THF wurde bei 0°C 1.28 g (7.91 mmol) CDI hinzugegeben und 1 Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 1.20 g (7.91 mmol) 2-(Benzylamino)-ethanol (**93**) versetzt und 12 Stunden gerührt. Die Reaktion wurde nach AAV 11 aufgearbeitet. Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung wurden 1.73 g (3.84 mmol, 49%) der Zwischenstufe **95** erhalten. Verbindung **95** wurde anschließend mit 1.31 g (4.99 mmol) Triphenylphosphin und 1.01 g (4.99 mmol) DIAD nach AAV 13 zyklisiert. Man konnte die Zielverbindung **96** in quantitativer Ausbeute isolieren.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.90 (d, 3H, *J* = 6.0 Hz), 0.95 (d, 3H, *J* = 6.0 Hz), 1.65-1.89 (m, 3H), 3.01-3.08 (m, 1H), 3.20-3.32 (m, 1H), 3.49-3.62 (m, 1H), 3.99-4.07 (m, 1H), 4.49-4.58 (m, 3H), 7.10-7.15 (m, 2H), 7.25-7.29 (m, 3H), 7.59-7.73 (m, 3H), 8.03-8.06 (m, 1H); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 21.4, 23.2, 24.5, 38.3, 41.0, 45.1, 50.2, 57.5, 124.4, 127.7, 128.2, 128.7, 130.8, 132.0, 133.2, 134.1, 136.0, 147.8, 167.6; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 24.94 min; **ESI-MS**: *m/z* 862.9 (45) [2M+H]⁺, 666.9 (75) [(3M+K)/2]⁺, 432.3 (100) [M+H]⁺.

(R)-1-Benzyl-3-isobutylpiperazin-2-on (97)



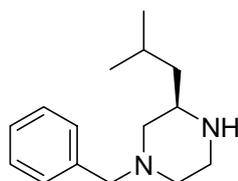
C₁₅H₂₂N₂O

M: 246.17 g/mol

1.41 g (3.27 mmol) *N*-(*o*-Nitrosulfonamido)-(R)-1-benzyl-3-isobutylpiperazin-2-on (**96**), 0.47 g (4.26 mmol) Thiophenol und 1.36 g (9.82 mmol) Kaliumcarbonat wurden nach AAV 17 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigsäureethylester/0.1% Triethylamin-Gradient) erhielt man 0.60 g (75%) des Amins **97** als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.98 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz), 1.01 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz), 1.56-2.04 (m, 4H), 2.95-3.04 (m, 1H), 3.12-3.23 (m, 2H), 3.29-3.40 (m, 1H), 3.55 (dd, 1H, *J*₁ = 10.0 Hz, *J*₂ = 3.5 Hz), 4.54 (d, 1H, *J* = 14.8 Hz), 4.71 (d, 1H, *J* = 14.5 Hz), 7.22-7.40 (m, 5H); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 21.1, 23.6, 24.7, 41.3, 41.6, 47.6, 50.2, 57.4, 127.4, 128.2, 128.6, 137.0, 170.9; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 13.85 min; **ESI-MS**: *m/z* 247.1 (100) [M+H]⁺, 219.3 (65) [M-CO]⁺.

(R)-1-Benzyl-3-isobutylpiperazin (98)



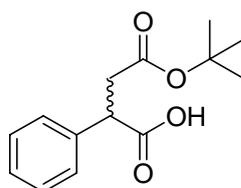
C₁₅H₂₄N₂

M: 232.19 g/mol

0.80 g (3.60 mmol) (R)-1-Benzyl-3-isobutyl-piperazin-2-on **97** wurden in absoluten Ether gelöst und mit 6.30 g (16.7 mmol) Lithiumaluminiumhydrid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung bei 0°C mit 10%-iger Natriumhydroxidlösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Hexan/Essigsäureethylester/0.1% Triethylamin-Gradient) gereinigt. Man erhielt 0.86 g (64%) des gewünschten Produkts (**98**) als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (d, 3H, *J* = 5.0 Hz), 0.90 (d, 3H, *J* = 5.0 Hz), 1.14-1.26 (m, 2H), 1.61-1.76 (m, 2H), 1.88 (bs, 1H), 1.97-2.08 (m, 1H), 2.81-2.96 (m, 4H), 3.49 (d, 2H, *J* = 5.5 Hz), 7.23-7.32 (m, 5H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_f = 11.30 min; **ESI-MS**: *m/z* 233.3 (100) [M+H]⁺.

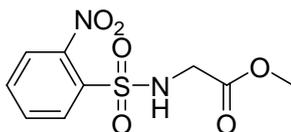
3-(*tert*-Butoxycarbonyl)-2-phenylpropansäure (**101**)



M: 250.12 g/mol

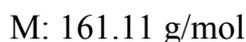
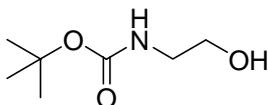
5.00 g (33.0 mmol) Phenylelessigsäuremethylester, 0.88 g (37.0 mmol, [60%]) NaH und 7.14 g (37.0 mmol) α-Bromessigsäure-*tert*-butylester wurden nach AAV 5 umgesetzt. Der Methylester des Rohprodukts wurde anschließend nach AAV 10 hydrolysiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigsäureethylester/0.1% Essigsäure-Gradient) erhielt man 8.90 g (94% über 2 Stufen) der Zielverbindung **101** als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.39 (s, 9H), 2.60 (dd, 1H, *J*₁ = 24.1 Hz, *J*₂ = 7.9 Hz), 3.09 (dd, 1H, *J*₁ = 24.1 Hz, *J*₂ = 14.4 Hz), 3.74 (s, 3H), 4.04 (dd, 1H, *J*₁ = 14.4 Hz, *J*₂ = 7.9 Hz), 7.28-7.34 (m, 5H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_f = 22.02 min.

***N*-(*o*-Nitrosulfonamido)-2-aminoessigsäuremethylester (104)**

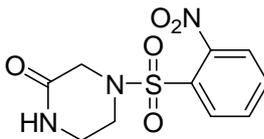
10.0 g (80.0 mmol) Glycinmethylesterhydrochlorid, 17.7 g (80.0 mmol) *o*-Nitrobenzylsulfonsäurechlorid und 20.5 g (0.20 mmol) *N*-Methylmorpholin wurden nach AAV 18 umgesetzt. Nach Kristallisation (Hexan/Essigsäureethylester) wurden 14.9 g (68%) der Verbindung **104** als gelber Feststoff erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.64 (s, 3H), 4.05 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz), 6.09 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz), 7.74-7.82 (m, 2H), 7.94-8.00 (m, 1H), 8.10-8.16 (m, 1H); HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 17.87 min.

***tert*-Butyl-2-hydroxyethylcarbammat (105)**

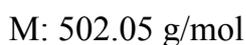
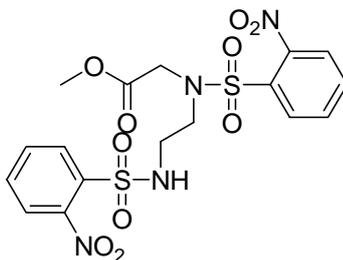
5.00 g (82.0 mmol) Aminoethanol und 3.28 g (82.0 mmol) Natriumhydroxid wurden in Aceton/Wasser 1:1 gelöst. Bei 0°C wurde anschließend *tert*-Butyloxycarbonylanhydrid hinzugegeben und 12 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingengt und der Rückstand mit gesättigter Na₂CO₃-Lösung und Essigsäureethylester aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigsäureethylester/Methanol-Gradient) erhielt man 6.73 g (51%) des Amins **97** als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.48 (s, 9H), 2.20 (s, 1H), 2.66 (s, 1H), 3.31 (t, 2H, *J* = 4.8 Hz), 3.73 (t, 2H, *J* = 4.8 Hz).

***N*-(*o*-Nitrosulfonamido)-piperazin-2-on (107)**

3.00 g (18.6 mol) *tert*-Butyl-2-hydroxyethylcarbamate (**105**) und 5.11 g (18.6 mmol) *N*-(*o*-Nitrosulfonamido)-2-aminoessigsäuremethylester (**104**) wurden mit 6.35 g (24.2 mmol) Triphenylphosphin und 4.89 g (24.2 mmol) DIAD nach AAV 13 gekuppelt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Hexan/Essigsäureethylester/Methanol-Gradient) lieferte 3.00 g (39%) der Zwischenverbindung **106** als farbloses Öl. Anschließend wurde das *tert*-Butylcarbamate nach AAV 9 entschützt und das Intermediat ohne weitere Aufreinigung nach Evaporierung des Lösungsmittels in einer 3M Lösung von DIPEA in Ethanol zyklisiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abgezogen und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/Essigsäureethylester/Methanol-Gradient). Die Zyklisierung verlief quantitativ.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.45 (m, 2H), 3.61-3.70 (m, 2H), 3.98 (s, 2H), 6.45 (bs, 1H), 7.65-7.80 (m, 3H), 8.03-8.09 (m, 1H); HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 15.02 min; ESI-MS: *m/z* 875.4 (100) [3M+Na]⁺, 593.2 (10) [2M+Na]⁺, 571.3 (30) [2M+H]⁺, 286.3 (20) [M+H]⁺.

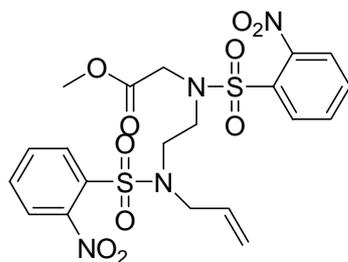
***N,N*-(*o*-Dinitrosulfonamido)-2-(2-aminoethylamino)-essigsäuremethylester (108)**

5.88 g (21.5 mmol) *N*-(*o*-Nitrosulfonamido)-2-aminoessigsäuremethylester (**104**) und 3.46 g (21.5 mmol) *tert*-Butyl-2-hydroxyethylcarbamate (**105**) wurden mit 7.31 g (27.9 mmol) Triphenylphosphin und 5.64 g (27.9 mmol) DIAD nach AAV 13 gekuppelt. Anschließend wurde das *tert*-Butylcarbamate ohne weitere Aufreinigung

nach AAV 9 entschützt und das Intermediat nach Evaporierung des Lösungsmittels mit 4.76 g (21.5 mmol) *o*-Nitrosulfonsäurechlorid und 5.24 g (53.8 mmol) *N*-Methylmorpholin nach AAV 18 umgesetzt. Die Reaktion lieferte 6.18 g (57% über 2 Stufen) der Zielverbindung **108** als gelben Feststoff.

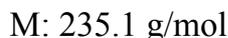
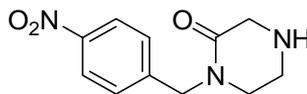
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.41 (q, 2H, *J* = 6.0 Hz), 3.62 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz), 3.74 (s, 3H), 4.23 (s, 2H), 5.93 (t, 1H, *J* = 6.5 Hz), 7.65-7.71 (m, 1H), 7.74-7.82 (m, 4H), 7.87-7.92 (m, 1H), 8.05-8.18 (m, 2H); **HPLC** (5-100% in 30 min): *R*_t = 18.70 min; **ESI-MS**: *m/z* 1043.0 (15) [2M+K]⁺, 1026.9 (60) [2M+Na]⁺, 1004.7 (25) [2M+H]⁺, 773.2 (45) [(3M+K)/2]⁺, 525.4 (35) [M+Na]⁺, 503.1 (100) [M+H]⁺.

***N,N*-(*o*-Dinitrosulfonamido)-2-(2-(allylamino)ethylamino)-essigsäuremethylester
(109)**



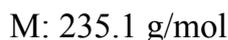
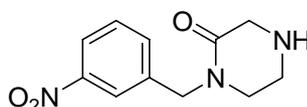
Zu einer Lösung von 5.50 g (11.0 mmol) *N,N*-(*o*-Dinitrosulfonamido)-2-(2-aminoethylamino)-essigsäuremethylester (**108**) in DMF wurden 3.02 g (22.0 mmol) Kaliumcarbonat und 2.63 g (22.0 mmol) Allylbromid gegeben. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingengt und der Rückstand mit gesättigter NaCl-Lösung und Essigsäureethylester aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Nach säulenchromatographischer Reinigung erhielt man 4.50 g (75%) der Zielverbindung als gelben Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.60-3.62 (m, 4H), 3.68 (s, 3H), 4.00 (d, 2H, *J* = 6.5 Hz), 4.25 (s, 2H), 5.27 (ψdt, 2H, *J*₁ = 17.3 Hz, *J*₂ = 1.3 Hz), 5.63-5.77 (m, 1H), 7.63-7.78 (m, 6H), 8.04-8.09 (m, 2H); **HPLC** (5-100% in 30 min): *R*_t = 22.78 min; **ESI-MS**: *m/z* 833.2 (40) [(3M+K)/2]⁺, 479.3 (100) [M+H]⁺.

1-(4-Nitrobenzyl)-piperazin-2-on (112a)

Die Verbindung **112a** wurde analog dem Syntheseweg zur Darstellung von *N*-(*o*-Nitrosulfonamido)-(R)-1-benzyl-3-isobutylpiperazin-2-on (**96**) bzw. (R)-1-Benzyl-3-isobutylpiperazin-2-on (**97**) ausgehend von 0.90 g (4.60 mmol) 2-(4-Nitro-benzylamino)-ethanol (**93**) und 1.20 g (4.60 mmol) *N*-(*o*-Nitrosulfonamido)-2-aminoessigsäure (**104**) synthetisiert. Die Amidbindung wurde jedoch im ersten Schritt mit DCC nach AAV 11 geknüpft. Es wurden 1.00 g (67%) der Zielverbindung **112a** erhalten.

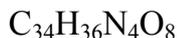
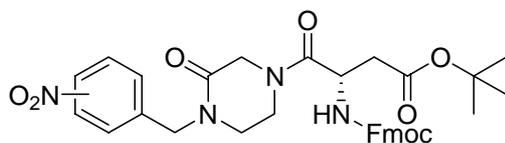
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.10-3.17 (m, 2H), 3.31 (t, 2H, *J* = 10.3), 3.67 (s, 2H), 4.72 (s, 2H), 7.45 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz), 8.23 (d, 2H, *J* = 9.0 Hz); HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 11.67 min; ESI-MS: *m/z* 276.8 (55) [M+K]⁺, 236.1 (100) [M+H]⁺.

1-(3-Nitrobenzyl)-piperazin-2-on (112b)

Die Verbindung **112b** wurde analog dem Syntheseweg zur Darstellung von *N*-(*o*-Nitrosulfonamido)-(R)-1-benzyl-3-isobutylpiperazin-2-on (**96**) bzw. (R)-1-Benzyl-3-isobutylpiperazin-2-on (**97**) ausgehend von 1.20 g (6.12 mmol) 2-(4-Nitro-benzylamino)-ethanol (**93**) und 1.59 g (6.12 mmol) *N*-(*o*-Nitrosulfonamido)-2-aminoessigsäure (**104**) synthetisiert. Die Amidbindung wurde jedoch im ersten Schritt mit DCC nach AAV 11 geknüpft. Es wurden 0.80 g (55%) der Zielverbindung **112b** erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.10-3.17 (m, 2H), 3.31 (t, 2H, *J* = 10.3 Hz), 3.67 (s, 2H), 4.72 (s, 2H), 7.74-7.78 (m, 2H), 8.10-8.14 (m, 1H), 6.76 (s, 1H); HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 11.55 min; ESI-MS: *m/z* 471.3 (10) [2M+H]⁺, 276.8 (55) [M+K]⁺, 236.1 (100) [M+H]⁺.

***N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)methyl-(*S*)-3-(*tert*-butoxycarbonyl)-1-(4-(nitrobenzyl)-3-oxopiperazin-1-yl)-1-oxopropan-2-ylcarbammat (**113**)**

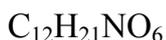
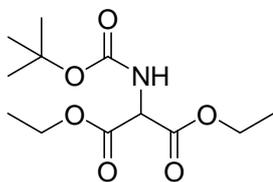


M: 628.25 g/mol

0.31 g (1.32 mmol) 1-(Nitrobenzyl)-piperazin-2-on (**112**), 0.65 g (2.00 mmol) TBTU, 0.27 g (2.00 mmol) HOBT und 0.54 g (1.32 mmol) *N*-Fmoc-Asp(^{*t*}Bu)-OH wurden mit 0.60 g (4.62 mmol) DIPEA nach AAV 11 umgesetzt. Man erhielt die Zielverbindung **113** (0.67 g, 81%) nach HPLC-Reinigung und Lyophilisieren als weißen Feststoff.

HPLC_{*meta, para*} (10-90% in 24 min): $R_t = 16.39$ min für beide Regioisomere; **ESI-MS**: m/z 1886.0 (15) $[3\text{M}+\text{H}]^+$, 1279.3 (10) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 1257.5 (100) $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 962.8 (5) $[(3\text{M}+\text{K})/2]^+$, 629.3 (5) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

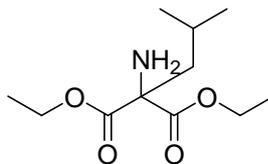
***tert*-Butyl-di(ethoxycarbonyl)-methylcarbammat (**117**)**



M: 275.14 g/mol

10.0 g (47.0 mmol) Diethylaminomalonathydrochlorid, 10.9 g (50.0 mmol) *tert*-Butyloxycarbonylanhydrid und 4.81 g (0.14 mol) Triethylamin wurden nach AAV 16 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung erhielt man 9.79 g (76%) der Zielverbindung **117** als farbloses Öl.

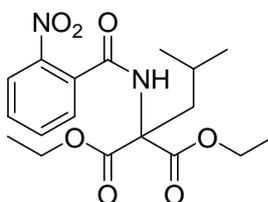
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.29$ (t, 6H, $J = 7.3$ Hz), 1.44 (s, 9H), 4.16-4.35 (m, 4H), 4.93 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 5.54 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz); **ESI-MS**: m/z 298.1 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 176.1 (45) $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$.

2-Amino-2-isobutylmalonsäureethylester (118)

M: 231.15 g/mol

9.79 g (35.6 mmol) *tert*-Butyl-di(ethoxycarbonyl)-methylcarbamate (**117**) wurden nach AAV 5 mit 1.44 g (37.4 mmol, [60%]) NaH deprotoniert und das gebildete Enolat mit 6.34 g (46.3 mmol) Isopropylbromid abgefangen. Die *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe wurde anschließend nach AAV 9 hydrolysiert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) erhielt man 8.50 g (74%) der Zielverbindung **118** als farblose Flüssigkeit.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.96 (d, 6H, *J* = 6.5 Hz), 1.31 (t, 6H, *J* = 7.0 Hz), 1.75-1.86 (m, 1H), 1.99 (d, 2H, *J* = 6.3 Hz), 2.03 (bs, 2H), 4.25 (q, 4H, *J* = 7.0 Hz);
¹³C-NMR (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 14.0, 23.7, 24.0, 43.4, 61.8, 65.5, 171.9.

2-(2-Nitrobenzamido)-2-isobutylmalonsäureethylester (119)

M: 380.16 g/mol

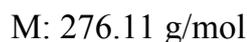
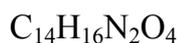
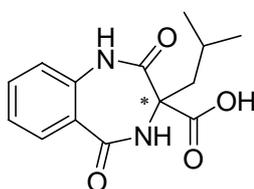
Darstellung von **2-Nitrobenzoylchlorid**: 10.0 g (60.0 mmol) *o*-Nitrobenzoesäure wurden zu einer Lösung von 15.2 mL (0.20 mol) Thionylchlorid in Dichlormethan gegeben und mit 0.70 mL DMF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingedunstet und der Rückstand mit Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt kann in der nächsten Reaktion ohne weitere Aufreinigung verwendet werden.

3.42 g (18.5 mmol) 2-Nitrobenzoylchlorid wurden zu einer Lösung aus 3.00 g (13.0 mmol) 2-Amino-2-isobutylmalonsäureethylester (**118**) und 5.74 g (56.7 mmol) Triethylamin in Dichlormethan bei 0°C hinzugegeben und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach basischer Aufarbeitung mit gesättigter Na₂CO₃-

Lösung und Extraktion der wässrigen Phase mit Essigsäureethylester erhielt man 3.36 g (68%) der Zielverbindung **119** als gelben Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.95 (d, 6H, *J* = 6.8 Hz), 1.30 (t, 6H, *J* = 7.3 Hz), 1.70-1.75 (m, 1H), 2.48 (d, 2H, *J* = 6.5 Hz), 4.30 (q, 4H, *J* = 7.3 Hz), 7.29 (bs, 1H), 7.56-7.69 (m, 3H), 8.06 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 14.0, 23.3, 24.0, 40.2, 62.8, 66.6, 124.7, 128.6, 130.6, 132.0, 133.4, 164.6, 166.3; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 22.92 min.

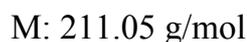
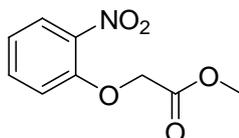
2,3,4,5-Tetrahydro-3-isobutyl-2,5-dioxo-1H-benzo[e][1,4]diazepin-3-carbonsäure
(**120**)



3.36 g (8.84 mmol) 2-(2-Nitrobenzamido)-2-isobutylmalonsäureethylester (**119**) wurden nach AAV 8 in Methanol mit Pd(0) auf Kohle reduziert und in einem Schritt zyklisiert. Nach Filtration über Ceolite erhielt man den Methylester des Benzodiazepins **120** in quantitativer Ausbeute (3.10 g), welcher anschließend nach AAV 10 zur freien Säure hydrolysiert wurde.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 0.80 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz), 0.86 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz), 1.54-1.76 (m, 2H), 2.06 (dd, 1H, *J*₁ = 14.0 Hz, *J*₂ = 5.3 Hz), 7.02 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.19 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.47 (t, 1H, *J* = 6.5 Hz), 7.62 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 8.68 (s, 1H), 10.43 (s, 1H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 11.06 min; **ESI-MS**: *m/z* 277.2 (100) [M+H]⁺, 232.2 (15) [M-CO₂]⁺.

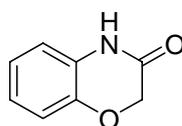
2-(2-Nitrophenoxy)-essigsäuremethylester (122)



5.00 g (36.0 mmol) 2-Nitrophenol, 5.50 g (36.0 mmol) α -Bromessigsäuremethylester und 4.96 g (36.0 mmol) Kaliumcarbonat wurden nach AAV 27 in 80 mL Aceton 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Das Produkt **122** wurde quantitativ erhalten und konnte ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe verwendet werden.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 3.83 (s, 3H), 4.81 (s, 2H), 7.01 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.13 (dt, 1H, J_1 = 8.5 Hz, J_2 = 1.0 Hz), 7.55 (dt, 1H, J_1 = 7.3 Hz, J_2 = 1.8 Hz), 7.85 (dd, 1H, J_1 = 8.5 Hz, J_2 = 1.5 Hz); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 12.76 min.

2H-Benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4H)-on (123)

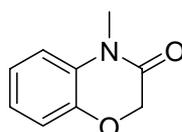


M: 149.05 g/mol

2-(2-Nitrophenoxy)-essigsäuremethylester (**122**) wurde nach AAV 8 in Methanol mit Pd(0) auf Kohle reduziert und in einem Schritt zyklisiert. Nach Filtration über Ceolite und Kristallisation (Essigsäureethylester/Methanol) erhielt man 4.22 g (79% über 2 Stufen) der Zielverbindung **123** als weißen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 3.67 (s, 2H), 6.87-6.98 (m, 4H), 10.69 (bs, 1H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 12.76 min.

4-Methyl-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4H)-on (124)

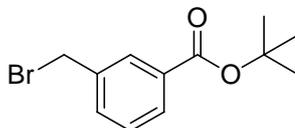


M: 163.06 g/mol

2.50 g (16.8 mmol) 2H-Benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4H)-on (**123**) wurden mit 0.87 g (16.8 mmol, [60%]) NaH in DMF bei 0°C deprotoniert und nach AAV 5 mit 3.10 g (21.8 mmol) Methyljodid alkyliert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigsäureethylester/Methanol-Gradient) erhielt man 1.94 g (70%) der Zielverbindung **124** als farbloses Öl.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.40 (s, 3H), 4.71 (s, 2H), 6.97-7.12 (m, 4H);
HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 17.81 min.

3-(Brommethyl)-benzoesäure-*tert*-butylester (126)

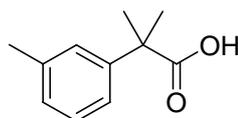


M: 270.03 g/mol

10.0 g (73.5 mmol) *m*-Tolylsäure, 15.7 g (88.2 mmol) *N*-Bromsuccinimid und 1.20 g (5.15 mmol) Dibenzoylperoxid wurden nach AAV 28 in Tetrachlorkohlenstoff 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach Kristallisation (Hexan/Toluol) erhielt man 8.50 g (54%) der freien Säure. 5.00 g (23.4 mmol) 3-(Brommethyl)-benzoesäure, 12.7 g (58.4 mmol) Trichloracetimidat und 0.82 g (5.84 mmol) BF₃*Etherat wurden nach AAV 14 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte die Zielverbindung **126** in quantitativer Ausbeute isoliert werden.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.63 (s, 9H), 4.55 (s, 2H), 7.44 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.59 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 8.00 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 8.14 (s, 1H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 27.25 min.

2-Methyl-2-*meta*-tolylpropansäure (127)

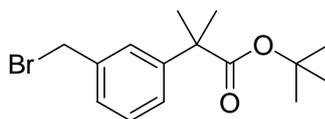


M: 178.1 g/mol

3.00 g (18.3 mmol) *m*-Tolyllessigsäure wurden nach AAV 15 mit 19.2 mL LDA (19.2 mmol, 1.0 M Lösung in THF) bei -78°C in THF deprotoniert und mit Methyljodid alkyliert. Das Alkylierungsprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und unter den gleichen Bedingungen zu dem Methylester des Zielmoleküls **127** umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigsäuremethylester-Gradient) wurde die Säure **127** nach Hydrolyse des Methylester nach AAV 10 als farbloses Öl erhalten. Man konnte 1.53 g (47% über 3 Stufen) isolieren.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.63$ (s, 6H), 2.39 (s, 3H), 7.09-7.7.28 (m, 4H);
HPLC (5-100% in 30 min): $R_t = 19.83$ min.

2-(3-(Brommethyl)phenyl)-2-methylpropansäure-*tert*-butylester (128)



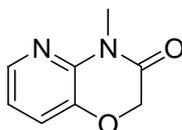
$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{BrO}_2$

M: 312.07 g/mol

1.53 g (8.88 mmol) 2-Methyl-2-*meta*-tolylpropansäure (**127**), 1.58 g (8.88 mmol) *N*-Bromsuccinimid und 0.12 g (0.52 mmol) Dibenzoylperoxid wurden nach AAV 28 in Tetrachlorkohlenstoff 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach Kristallisation (Hexan/Toluol) erhielt man 1.61 g (71%) der freien Säure. 1.61 g (6.29 mmol) 2-(3-(Brommethyl)phenyl)-2-methylpropansäure, 3.34 g (16.0 mmol) Trichloracetimidat und 0.22 g (1.57 mmol) BF_3 *Etherat wurden anschließend nach AAV 14 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) wurden 1.60 g (82%) der Zielverbindung **128** isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.40$ (s, 9H), 1.53 (s, 6H), 4.49 (s, 2H), 7.25-7.36 (m, 4H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz): $\delta = 26.4, 27.8, 33.8, 47.0, 80.6, 125.7, 126.6, 127.1, 128.6, 137.6, 146.0, 175.8$; **HPLC** (10-100% in 30 min): $R_t = 30.00$ min.

4-Methyl-2*H*-pyrido[3,2-*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-on (131)



$\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$

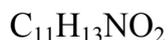
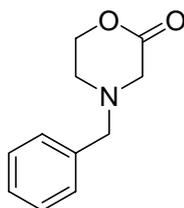
M: 164.06 g/mol

Die Verbindung **131a** wurde analog dem Syntheseweg zur Darstellung von 4-Methyl-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-on (**124**) ausgehend von 5.00 g (35.7 mmol) 2-Nitropyridin-3-ol, 5.46 g (35.7 mmol) α -Bromessigsäureethylester und 4.36 g (35.7 mmol) Kaliumcarbonat synthetisiert. Nach Reduktion der Nitrogruppe mit Pd(0) auf Kohle in Methanol nach AAV 9 und anschließender Zyklisierung in einem Schritt

wurde der Amidstickstoff mit Methyljodid nach AAV 5 methyliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) gereinigt und man erhielt 3.63 g (62%) der Zielverbindung **131** als hellgelben Feststoff.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.48 (s, 3H), 4.68 (s, 2H), 6.94 (dd, 1H, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz), 7.22 (dd, 1H, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz), 8.03 (dd, 1H, $J_1 = 4.9$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz); **HPLC** (10-100% in 30 min): $R_t = 14.39$ min.

4-Benzylmorpholin-2-on (133a)

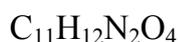
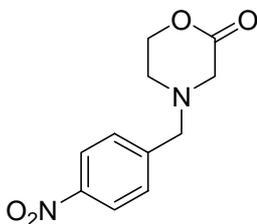


M: 191.09 g/mol

1.74 g (11.6 mmol) 2-(Benzylamino)-ethanol (**93**), 1.77 g (11.6 mmol) α -Bromessigsäuremethylester und 1.49 g (11.6 mmol) DIPEA wurden nach AAV 25 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigsäureethylester/0.1% Triethylamin-Gradient) konnte man das Produkt **133** in quantitativer Ausbeute isolieren.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 2.71 (t, 2H, $J = 5.0$ Hz), 3.38 (s, 2H), 3.62 (s, 2H), 4.42 (t, 2H, $J = 5.0$ Hz), 7.31-7.40 (m, 5H); **HPLC** (10-100% in 30 min): $R_t = 17.45$ min; **ESI-MS**: m/z 383.0 (5) [2M+H]⁺, 192.0 (100) [M+H]⁺.

4-(4-Nitrobenzyl)-morpholin-2-on (133b)

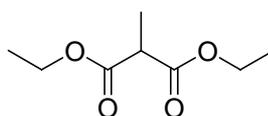


M: 236.08 g/mol

2.09 g (10.7 mmol) 2-(4-Nitrobenzylamino)-ethanol (**93**), 1.64 g (10.7 mmol) α -Bromessigsäuremethylester und 1.08 g (10.7 mmol) DIPEA wurden nach AAV 25 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigsäureethylester/0.1% Triethylamin-Gradient) konnte man 1.82 g (72% über 2 Stufen) der Zielverbindung **133** isolieren.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 2.75 (t, 2H, J = 5.0 Hz), 3.40 (s, 2H), 3.72 (s, 2H), 4.46 (t, 2H, J = 5.0 Hz), 7.56 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 8.25 (d, 2H, J = 8.8 Hz); **HPLC** (10-100% in 30 min): R_t = 15.07 min; **ESI-MS**: m/z 237.1 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-Methylmalonsäurediethylester (**136**)

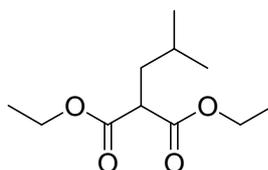


M: 174.09 g/mol

7.00 g (43.8 mmol) Malonsäurediethylester wurden nach AAV 5 mit 1.76 g (46.0 mmol, [60%]) NaH deprotoniert und mit 6.25 g (46.0 mmol) Methyljodid alkyliert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) erhielt man 6.50 g (85%) der Zielverbindung **136** als farblose Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ = 0.98 (d, 3H, J = 6.0 Hz), 1.32 (t, 6H, J = 7.0 Hz), 3.44 (q, 1H, J = 6.0 Hz), 4.18 (q, 4H, J = 7.0 Hz).

2-Isobutylmalonsäurediethylester (**137**)

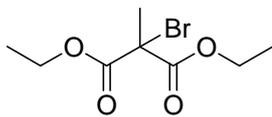


M: 216.14 g/mol

5.00 g (31.3 mmol) Malonsäurediethylester wurden nach AAV 5 mit 1.26 g (32.8 mmol, [60%]) NaH deprotoniert und mit 5.67 g (40.6 mmol) Isobutylbromid alkyliert. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) erhielt man 4.00 g (60%) der Zielverbindung **137** als farblose Flüssigkeit.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.92$ (d, 6H, $J = 6.5$ Hz), 1.26 (t, 6H, $J = 7.3$ Hz), 1.52 - 1.63 (m, 1H), 1.79 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.41 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 4.19 (q, 4H, $J = 7.3$ Hz).

2-Brom-2-methylmalonsäurediethylester (138)

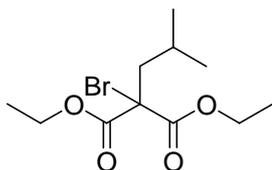


M: 252 g/mol

6.00 g (37.5 mmol) 2-Methylmalonsäurediethylester (**136**) und 6.00 g (37.5 mmol) Brom wurden nach AAV 26 umgesetzt. Das Rohprodukt **138** wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktion verwendet.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.48$ (s, 3H), 1.34 (t, 6H, $J = 7.3$ Hz), 4.20 (q, 4H, $J = 7.3$ Hz).

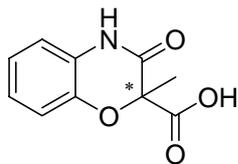
2-Brom-2-isobutylmalonsäurediethylester (139)



M: 294.05 g/mol

4.00 g (18.5 mmol) 2-Isobutylmalonsäurediethylester (**137**) und 2.96 g (18.5 mmol) Brom wurden nach AAV 26 umgesetzt. Das Rohprodukt **139** wurde ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Reaktion verwendet.

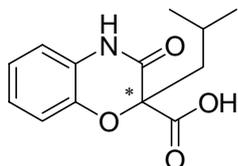
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.92$ (d, 6H, $J = 6.5$ Hz), 1.26 (t, 6H, $J = 7.3$ Hz), 1.92 - 2.03 (m, 1H), 2.29 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 4.28 (q, 4H, $J = 7.3$ Hz).

3,4-Dihydro-2-methyl-3-oxo-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-carboxylsäure (140)

M: 207.05 g/mol

3.71 g (16.6 mmol) 2-Brom-2-methylmalonsäurediethylester (**138**), 2.05 g (14.7 mmol) 2-Nitrophenol und 2.44 g (17.7 mmol) Kaliumcarbonat wurden nach AAV 27 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) wurde das Produkt nach AAV 8 zyklisiert und das Rohprodukt anschließend nach AAV 10 hydrolysiert. Es wurden 2.12 g (75%) der freien Säure **140** isoliert.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.86 (s, 3H), 6.81-6.85 (m, 1H), 6.94-7.09 (m, 3H), 8.52 (bs, 1H), 9.58 (bs, 1H); HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 14.10 min; ESI-MS: *m/z* 660.1 (100) [3M+K]⁺, 644.1 (25) [3M+Na]⁺, 330.9 (80) [(3M+K)/2]⁺, 207.1 (20) [M+H]⁺.

3,4-Dihydro-2-isobutyl-3-oxo-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-carboxylsäure (141)

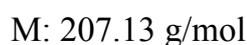
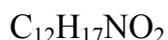
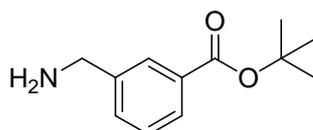
M: 249.1 g/mol

5.44 g (18.5 mmol) 2-Brom-2-isobutylmalonsäurediethylester (**139**), 2.57 g (18.5 mmol) 2-Nitrophenol und 3.07 g (22.2 mmol) Kaliumcarbonat wurden nach AAV 27 umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Hexan/Essigsäureethylester) wurde das Produkt nach AAV 8 zyklisiert und das Rohprodukt anschließend nach AAV 10 hydrolysiert. Es wurden 0.45 g (10%) der freien Säure **141** isoliert.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.04 (ψt, 6H, *J* = 6.5 Hz), 1.98-2.11 (m, 1H), 2.25 (d, 1H, *J* = 1.0 Hz), 2.28 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 6.82 (dd, 1H, *J*₁ = 7.3 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz),

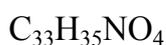
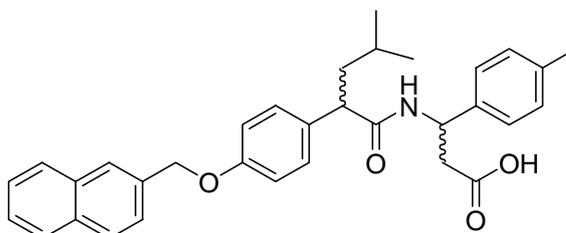
6.95-7.13 (m, 3H), 8.50 (bs, 1H), 9.78 (bs, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 62.5 MHz): $\delta = 23.6, 23.7, 24.5, 41.9, 84.0, 115.5, 117.4, 122.8, 124.5, 125.4, 142.9, 164.0, 168.6$; **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 20.81$ min; **ESI-MS**: m/z 1034.8 (30) $[4\text{M}+\text{K}]^+$, 1020.9 (5) $[4\text{M}+\text{Na}]^+$, 786.1 (100) $[3\text{M}+\text{K}]^+$, 770.1 (25) $[3\text{M}+\text{Na}]^+$, 393.9 (80) $[(3\text{M}+\text{K})/2]^+$, 250.1 (20) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-(Aminomethyl)-benzoesäure-*tert*-butylester (142)



1.66 g (6.15 mmol) 3-(Bromomethyl)-benzoesäure-*tert*-butylester (**126**) wurden mit 0.80 g (12.3 mmol) Natriumazid bei 50°C in DMF unter Verwendung einer katalytischen Menge Natriumiodid über 12 Stunden umgesetzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingeeengt und der Rückstand mit Essigsäureethylester und Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Azid wurde säulenchromatographisch (Hexan/Essigsäureethylester-Gradient) gereinigt und nach AAV 8 in Methanol/Essigsäure 25:1 zu dem Amin **142** reduziert. Es konnten 0.65 g (51%) ohne weitere Aufreinigung isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.25$ (s, 9H), 3.97 (s, 2H), 5.93 (bs, 2H), 7.42 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.54 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.95 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 8.01 (s, 1H); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 10.40$ min.

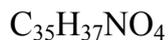
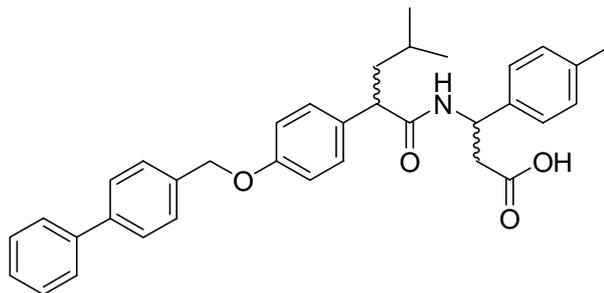
6.3 Synthese von α_4 -Antagonisten in Lösung3-(2-(4-((Naphthalen-3-yl)methoxy)phenyl)-4-methylpentanamido)-3-phenylpropansäure (**21b**)

M: 509.26 g/mol

2-(4-((Naphthalin-2-yl)methoxy)phenyl)-4-methylpentansäure (**19b**) (80.0 mg, 0.23 mmol), 44.4 mg (0.23 mmol) des β -Aminosäuremethylesters **20**, 31.0 mg (0.23 mmol) HOBT und 48.5 mg (0.25 mmol) EDCI wurden nach AAV 11 mit 0.13 g (0.97 mmol) DIPEA in Dichlormethan umgesetzt. Der Methylester wurde nach AAV 10 hydrolysiert. Man erhielt die Zielverbindung **21b** (82.0 mg, 71%) nach HPLC-Reinigung und Lyophilisieren als weißen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ = 0.94 (d, 3H, J = 6.5 Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.96 (d, 3H, J = 6.5 Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.43-1.56 (m, 2H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CHHCH-}$), 1.90-2.05 (m, 1H, $-\text{CHHCH-}$), 2.24 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.76 (d, 2H, J = 7.5 Hz, $-\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.62 (t, 1H, J = 6.8 Hz, $-\text{CHCO-}$), 5.24 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 5.28 (t, 1H, J = 7.5 Hz, $-\text{NHCHC}_{\text{Ar}}$), 6.94-7.04 (m, 5H, Ar- H_5), 7.23 (d, 2H, J = 8.5 Hz, Ar- H_2), 7.48-7.58 (m, 3H, Ar- H_3), 7.86-7.91 (m, 4H, Ar- H_4); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 26.57 min; **ESI-MS**: m/z 1069.2 (40) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 1047.2 (15) $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 547.5 (35) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 524.4 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

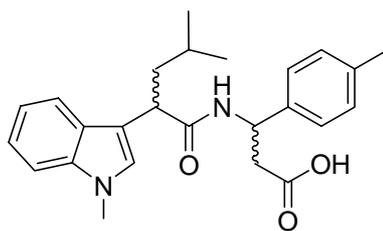
**3-(2-(4-((Biphenyl)methoxy)phenyl)-4-methylpentanamido)-3-phenylpropansäure
(21c)**



M: 535.27 g/mol

2-(4-((Biphenyl)methoxy)phenyl)-4-methylpentansäure (**19c**) (80.0 mg, 0.21 mmol), 44.4 mg (0.23 mmol) des β -Aminosäuremethylesters **20**, 31.0 mg (0.21 mmol) HOBT und 48.5 mg (0.21 mmol) EDCI wurden nach AAV 11 mit 0.13 g (0.90 mmol) DIPEA in Dichlormethan umgesetzt. Der Methylester wurde nach AAV 10 hydrolysiert. Man erhielt die Zielverbindung **21c** (71.9 mg, 65%) nach HPLC-Reinigung und Lyophilisieren als weißen Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.90 (d, 3H, J = 6.5 Hz, -CH(CH₃)₂), 0.92 (d, 3H, J = 6.5 Hz, -CH(CH₃)₂), 1.43-1.56 (m, 2H, -CH(CH₃)₂, -CHHCH-), 1.90-2.05 (m, 1H, -CHHCH-), 2.24 (s, 3H, -CH₃), 2.76 (d, 2H, J = 7.5 Hz, -CH₂COOH), 3.62 (t, 1H, J = 6.8 Hz, -CHCO-), 4.95 (s, 2H, -CH₂-), 5.28 (t, 1H, J = 7.5 Hz, -NHCHC_{Ar}), 6.72 (d, 2H, J = 4.3 Hz, Ar-H₂), 6.98-7.00 (m, 4H, Ar-H₄), 7.15 (d, 2H, J = 4.3 Hz, Ar-H₂), 7.31-7.39 (m, 7H, Ar-H₇), 7.56-7.58 (m, 1H, Ar-H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 29.17 min; **ESI-MS**: m/z 1121.2 (40) [2M+Na]⁺, 1099.2 (10) [2M+H]⁺, 844.2 (35) [(3M+K)/2]⁺, 572.5 (30) [M+Na]⁺, 550.4 (100) [M+H]⁺.

3-(4-Methyl-2-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)pentanamido)-3-*para*-tolylpropansäure**(54)**C₂₅H₃₀N₂O₃

M: 406.23 g/mol

2-(1-Methyl-1*H*-indol-3-yl)-4-methylpentansäure (**42b**) (0.27 g, 1.10 mmol), 0.21 g (1.10 mmol) des β -Aminosäuremethylesters **20**, 0.15 g (1.10 mmol) HOBT und 0.23 g (1.12 mmol) EDCI wurden nach AAV 11 mit 0.60 g (4.62 mmol) DIPEA in Dichlormethan umgesetzt. Der Methylester wurde nach AAV 10 hydrolysiert. Man erhielt die Zielverbindung **54** (0.28 g, 63%) nach HPLC-Reinigung und Lyophilisieren als hellgelben Feststoff. Die beiden Diastereomere konnten getrennt werden.

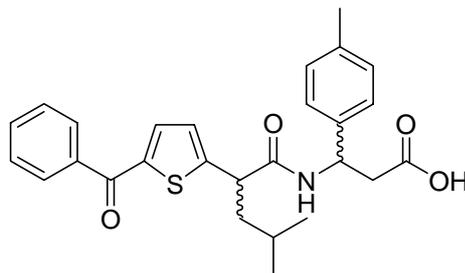
Diastereomer **A**:

¹**H-NMR** (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.97 (d, 3H, J = 13.0 Hz, -CH(CH₃)₂), 1.01 (d, 3H, J = 13.0 Hz, -CH(CH₃)₂), 1.61-1.80 (m, 2H, -CH(CH₃)₂, -CHHCH-), 1.97-2.08 (m, 1H, -CHHCH-), 2.26 (s, 3H, -CH₃), 2.76 (m, 2H, -CH₂COOH), 3.77 (s, 3H, -NCH₃), 3.94 (dd, 1H, J_1 = 16.5 Hz, J_2 = 13.0 Hz, -CHCO-), 5.34 (dd, 1H, J_1 = J_2 = 14.0 Hz, -NHCHC_{Ar}), 6.97-7.19 (m, 7H, Ar-H₇), 7.32 (d, 1H, J = 16.5 Hz, Ar-H), 7.59 (d, 1H, J = 16.0 Hz, Ar-H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 24.88 min; **ESI-MS**: m/z 835.2 (35) [2M+Na]⁺, 636.6 (35) [(3M+K)/2]⁺, 429.5 (35) [M+Na]⁺, 407.4 (100) [M+H]⁺.

Diastereomer **B**:

¹**H-NMR** (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.87 (d, 3H, J = 6.5 Hz, -CH(CH₃)₂), 0.95 (d, 3H, J = 6.5 Hz, -CH(CH₃)₂), 1.46-1.52 (m, 1H, -CH(CH₃)₂), 1.68-1.74 (m, 1H, -CHHCH-), 1.92-1.98 (m, 1H, -CHHCH-), 2.29 (s, 3H, -CH₃), 2.68 (dd, 1H, J_1 = 15.5 Hz, J_2 = 6.5 Hz, -CHHCOOH), 2.74 (dd, 1H, J_1 = 15.5 Hz, J_2 = 8.0 Hz, -CHHCOOH), 3.77 (s, 3H, -NCH₃), 3.90 (t, 1H, J = 7.5 Hz, -CHCO-), 5.30 (t, 1H, J = 7.5 Hz, -NHCHC_{Ar}), 7.02-7.17 (m, 7H, Ar-H₇), 7.32 (d, 1H, J = 8.5 Hz, Ar-H), 7.61 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 25.21 min; **ESI-MS**: m/z 835.2 (35) [2M+Na]⁺, 636.6 (35) [(3M+K)/2]⁺, 429.5 (35) [M+Na]⁺, 407.4 (100) [M+H]⁺.

**3-(2-(Thiophen-2-yl)-phenylmethanon)pentanamido)-3-*para*-tolylpropansäure
(55)**



$C_{27}H_{29}NO_4S$

M: 463.18 g/mol

2-(Thiophen-2-yl)-phenylmethanon)-4-methylpentansäure (**53**) (0.62 g, 2.20 mmol), 0.42 g (2.20 mmol) des β -Aminosäuremethylesters **20**, 0.29 g (2.20 mmol) HOBt und 0.45 g (2.24 mmol) EDCI wurden nach AAV 11 mit 1.18 g (9.10 mmol) DIPEA in Dichlormethan umgesetzt. Der Methylester wurde nach AAV 10 hydrolysiert. Man erhielt die Zielverbindung **55** (0.60 g, 59%) nach HPLC-Reinigung und Lyophilisieren als hellgelben Feststoff. Die beiden Diastereomere konnten getrennt werden.

Diastereomer A:

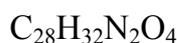
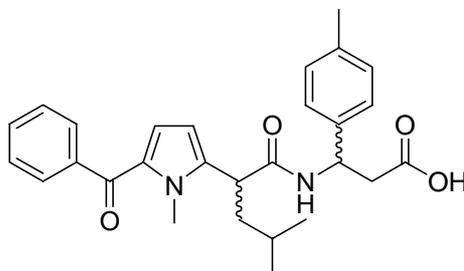
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ = 0.96 (d, 6H, J = 6.5 Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.87-1.96 (m, 2H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CHHCH}-$), 2.25 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.27-2.31 (m, 1H, $-\text{CHHCH}-$), 2.83 (dd, 1H, J_1 = 16.0 Hz, J_2 = 7.5 Hz, $-\text{CHHCOOH}$), 2.90 (dd, 1H, J_1 = 14.5 Hz, J_2 = 7.5 Hz, $-\text{CHHCOOH}$), 3.52 (m, 1H, $-\text{CHCO}-$), 5.27 (t, 1H, J = 6.5 Hz, $-\text{NHCHC}_{\text{Ar}}$), 7.05 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.12-7.15 (m, 4H, Ar- H_4), 7.49-7.64 (m, 4H, Ar- H_4), 7.79 (dd, 2H, J_1 = 7.0 Hz, J_2 = 1.5 Hz, Ar- H_2); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 22.11 min; **ESI-MS**: m/z 963.1 (45) $[2M+Na]^+$, 941.0 (10) $[2M+H]^+$, 712.0 (90) $[(3M+K)/2]^+$, 486.4 (20) $[M+Na]^+$, 464.3 (100) $[M+H]^+$.

Diastereomer B:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ = 0.70 (d, 3H, J = 6.5 Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.91 (d, 3H, J = 6.5 Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.70-1.75 (m, 1H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.89 (dd, 1H, J_1 = 14.0 Hz, J_2 = 6.0 Hz, $-\text{CHHCH}-$), 2.23 (dd, 1H, J_1 = 14.0 Hz, J_2 = 6.0 Hz, $-\text{CHHCH}-$), 2.25 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.78 (dd, 1H, J_1 = 16.0 Hz, J_2 = 6.5 Hz, $-\text{CHHCO}-$), 2.87 (dd, 1H, J_1 = 16.0 Hz, J_2 = 7.5 Hz, $-\text{CHHCO}-$), 3.50 (m, 1H, $-\text{CHCO}-$), 5.26 (t, 1H, J = 6.5 Hz, $-\text{NHCHC}_{\text{Ar}}$), 7.14 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ar- H_2), 7.22 (d, 1H, J = 4.0 Hz, Ar-H), 7.27 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ar- H_2), 7.52-7.65 (m, 4H, Ar- H_4), 7.82 (d, 2H, J = 7.0 Hz, Ar- H_2);

HPLC (5-100% in 30 min): $R_t = 22.59$ min; **ESI-MS**: m/z 963.1 (45) $[2M+Na]^+$, 941.0 (10) $[2M+H]^+$, 712.0 (90) $[(3M+K)/2]^+$, 486.4 (20) $[M+Na]^+$, 464.3 (100) $[M+H]^+$.

3-(1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)-phenylmethanon)pentanamido)-3-para-tolylpropansäure (56)



M: 460.24 g/mol

2-(1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)-phenylmethanon)-4-methylpentansäure (**49**) (0.31 g, 1.10 mmol), 0.21 g (1.10 mmol) des β -Aminosäuremethylesters **20**, 0.15 g (1.10 mmol) HOBT und 0.23 g (1.20 mmol) EDCI wurden nach AAV 11 mit 0.60 g (4.62 mmol) DIPEA in Dichlormethan umgesetzt. Der Methylester wurde nach AAV 10 hydrolysiert. Man erhielt die Zielverbindung **56** (0.34 g, 68%) nach HPLC-Reinigung und Lyophilisieren als weißen Feststoff. Die beiden Diastereomere konnten getrennt werden.

Diastereomer **A**:

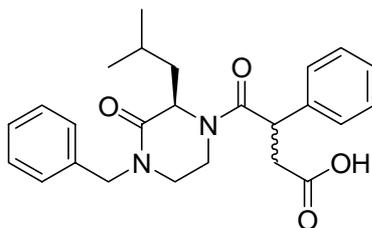
1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.96$ (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, $-CH(CH_3)_2$), 1.01 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, $-CH(CH_3)_2$), 1.60-1.64 (m, 2H, $-CH(CH_3)_2$, $-CHHCH-$), 1.97-2.01 (m, 1H, $-CHHCH-$), 2.25 (s, 3H, $-CH_3$), 2.74-2.84 (m, 2H, $-CH_2COOH$), 3.82-3.87 (m, 4H, $-CHCO-$, $-NCH_3$), 5.34 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, $-NHCHC_{Ar}$), 6.12 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, Ar-H), 6.60 (d, 1H, $J = 4.5$ Hz, Ar-H), 7.10 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, Ar- H_2), 7.17 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, Ar- H_2), 7.44-7.56 (m, 3H, Ar- H_2), 7.70 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, Ar- H_2); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 23.21$ min; **ESI-MS**: m/z 943.1 (10) $[2M+Na]^+$, 921.0 (5) $[2M+H]^+$, 709.0 (20) $[(3M+K)/2]^+$, 486.4 (100) $[M+Na]^+$, 461.4 (80) $[M+H]^+$.

Diastereomer **B**:

1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.88$ (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, $-CH(CH_3)_2$), 0.96 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, $-CH(CH_3)_2$), 1.49-1.54 (m, 1H, $-CH(CH_3)_2$), 1.61-1.66 (m, 1H, $-CHHCH-$), 1.90-1.99 (m, 1H, $-CHHCH-$), 2.31 (s, 3H, $-CH_3$), 2.74 (dd, 1H, $J_1 = 15.5$ Hz,

$J_2 = 6.0$ Hz, $-CHHCOOH$), 2.81 (dd, 1H, $J_1 = 15.5$ Hz, $J_2 = 9.0$ Hz, $-CHHCOOH$), 3.80 (s, 3H, $-NCH_3$), 5.33 (t, 1H, $J = 8.5$ Hz, $-NHCHC_{Ar}$), 6.23 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz, Ar-H), 6.66 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz, Ar-H), 7.13 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ar-H₂), 7.19 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ar-H₂), 7.46-7.58 (m, 4H, Ar-H₄), 7.72 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, Ar-H₂); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 23.57$ min; **ESI-MS**: m/z 943.1 (10) $[2M+Na]^+$, 921.0 (5) $[2M+H]^+$, 709.0 (20) $[(3M+K)/2]^+$, 486.4 (100) $[M+Na]^+$, 461.4 (80) $[M+H]^+$.

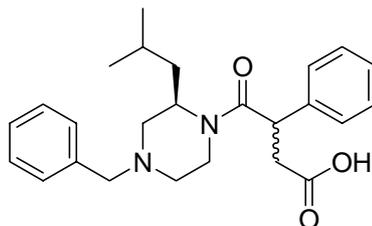
4-((R)-4-Benzyl-2-isobutyl-3-oxopiperazin-1-yl)-4-oxo-3-phenylbutansäure (**102**)



M: 422.22 g/mol

0.40 g (1.60 mmol) (R)-1-Benzyl-3-isobutylpiperazin-2-on (**97**), 0.41 g (1.60 mmol) 3-(*tert*-Butoxycarbonyl)-2-phenylpropansäure (**101**), 0.44 g (2.20 mmol) DCC, 0.22 g (1.60 mmol) HOBt und 0.63 g (4.90 mmol) DIPEA wurden mit einer katalytischen Menge (0.01 g, 0.08 mmol) DMAP nach AAV 11 umgesetzt. Der *tert*-Butylester wurde im Anschluß an die Kupplung ohne weitere Aufreinigung nach AAV 9 hydrolysiert. Man erhielt die Zielverbindung **102** (0.57 g, 85%) nach HPLC-Reinigung und Lyophilisieren als weißen Feststoff. Die beiden Diastereomere wurden nicht getrennt.

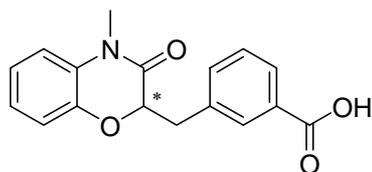
HPLC (5-100% in 30 min): $R_t = 21.29$ min und 22.29 min; **ESI-MS**: m/z 867.1 (20) $[2M+Na]^+$, 845.1 (100) $[2M+H]^+$, 651.3 (30) $[(3M+K)/2]^+$, 423.3 (80) $[M+H]^+$, 405.4 (25) $[M-OH]^+$.

4-((R)-4-Benzyl-2-isobutylpiperazin-1-yl)-4-oxo-3-phenylbutansäure (103)

M: 408.24 g/mol

0.29 g (1.24 mmol) (R)-1-Benzyl-3-isobutylpiperazin (**98**), 0.31 g (1.24 mmol) 3-(*tert*-Butoxycarbonyl)-2-phenylpropansäure (**101**), 0.33 g (1.61 mmol) DCC, 0.18 g (1.24 mmol) HOBT und 0.48 g (3.72 mmol) DIPEA wurden mit einer katalytischen Menge (0.01 g, 0.08 mmol) DMAP nach AAV 11 umgesetzt. Der *tert*-Butylester wurde im Anschluß an die Kupplung ohne weitere Aufreinigung nach AAV 9 hydrolysiert. Man erhielt die Zielverbindung **103** (0.23 g, 45%) nach HPLC-Reinigung und Lyophilisieren als weißen Feststoff. Die beiden Diastereomere wurden nicht getrennt.

HPLC (5-100% in 30 min): $R_t = 17.12$ min und 17.56 min; **ESI-MS**: m/z 839.1 (5) $[2M+Na]^+$, 816.9 (5) $[2M+H]^+$, 409.3 (100) $[M+H]^+$, 391.6 (5) $[M-OH]^+$.

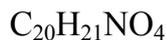
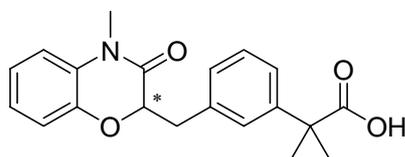
3-((3,4-Dihydro-4-methyl-3-oxo-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-yl)methyl)-benzoesäure (129)

M: 297.1 g/mol

Verbindung **129** wurde nach AAV 15 in einem Lösungsmittelgemisch aus DME/THF 5:1 bei -78°C hergestellt. Das Enolat der Verbindung 4-Methyl-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4*H*)-on (**124**) (0.25 g, 1.53 mmol) wurde mit 0.50 g (1.84 mmol) 3-(Brommethyl)-benzoesäure-*tert*-butylester (**126**) alkyliert. Der *tert*-Butylester wurde im Anschluß an die Alkylierung ohne weitere Aufreinigung nach AAV 9 hydrolysiert. Man erhielt die Zielverbindung **129** (0.30 g, 65%) nach HPLC-Reinigung und Lyophilisieren als weißen Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 3.18 (dd, 1H, J_1 = 14.5 Hz, J_2 = 9.0 Hz, -CHCHHC_{Ar}), 3.30-3.38 (m, 4H, -NCH₃, -CHCHHC_{Ar}), 4.82 (dd, 1H, J_1 = 8.8 Hz, J_2 = 3.5 Hz, -OCHCO-), 6.93-7.05 (m, 4H, Ar-H₄), 7.41 (t, 1H, J = 7.8 Hz, Ar-H), 7.52 (d, 1H, J = 7.8 Hz, Ar-H), 7.99 (d, 1H, J = 7.8 Hz, Ar-H), 8.04 (s, 1H, Ar-H); **¹³C-NMR** (CDCl₃, 62.5 MHz): δ = 28.5, 36.5, 77.6, 114.6, 117.5, 122.8, 124.2, 128.6, 128.7, 129.4, 131.4, 135.0, 137.2, 143.6, 165.7, 171.6; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 20.07 min; **ESI-MS**: m/z 930.0 (10) [3M+K]⁺, 914.0 (15) [3M+Na]⁺, 614.5 (100) [2M+Na]⁺, 465.9 (30) [(3M+K)/2]⁺, 337.6 (10) [M+K]⁺, 298.2 (55) [M+H]⁺.

2-(3-((3,4-Dihydro-4-methyl-3-oxo-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-yl)methyl)phenyl)-2-methylpropansäure (130)

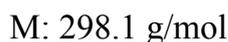
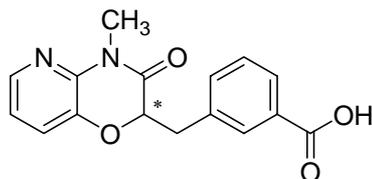


M: 339.15 g/mol

Verbindung **130** wurde nach AAV 15 in einem Lösungsmittelgemisch aus DME/THF 5:1 bei -78°C hergestellt. Das Enolat der Verbindung 4-Methyl-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-3(4H)-on (**124**) (0.21 g, 1.31 mmol) wurde mit 0.45 g (1.44 mmol) 2-(3-(Brommethyl)phenyl)-2-methylpropansäure-*tert*-butylester (**128**) alkyliert. Der *tert*-Butylester wurde im Anschluß an die Alkylierung ohne weitere Aufreinigung nach AAV 9 hydrolysiert. Man erhielt die Zielverbindung **130** (0.44 g, 85%) nach HPLC-Reinigung und Lyophilisieren als weißen Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 1.59 (s, 6H, 2 x -CH₃), 3.06 (dd, 1H, J_1 = 14.5 Hz, J_2 = 9.5 Hz, -CHCHHC_{Ar}), 3.22 (dd, 1H, J_1 = 14.5 Hz, J_2 = 3.5 Hz, -CHCHHC_{Ar}), 3.36 (s, 3H, -NCH₃), 4.79 (dd, 1H, J_1 = 9.5 Hz, J_2 = 3.5 Hz, -OCHCO-), 6.89-7.01 (m, 4H, Ar-H₄), 7.13-7.17 (m, 1H, Ar-H), 7.22-7.28 (m, 3H, Ar-H₃); **¹³C-NMR** (62.5 Hz, CDCl₃): δ = 26.3, 28.4, 36.9, 46.2, 67.1, 77.8, 114.5, 117.5, 122.6, 124.1, 124.4, 127.3, 128.1, 128.5, 129.4, 136.8, 143.5, 143.9, 165.9, 182.4; **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 22.65 min; **ESI-MS**: m/z 1056.0 (100) [3M+K]⁺, 1040.1 (15) [3M+Na]⁺, 701.2 (15) [2M+Na]⁺, 679.2 (25) [2M+H]⁺, 340.4 (100) [M+H]⁺.

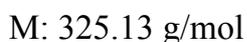
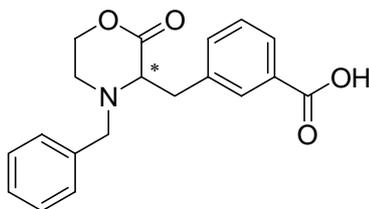
3-((3,4-Dihydro-4-methyl-3-oxo-2H-pyrido[3,2-b][1,4]oxazin-2-yl)methyl)-benzoesäure (132)



Verbindung **132** wurde nach AAV 15 in einem Lösungsmittelgemisch aus DME/THF 5:1 bei -78°C hergestellt. Das Enolat der Verbindung 4-Methyl-2H-pyrido[3,2-b][1,4]oxazin-3(4H)-on (**131**) (0.32 g, 2.08 mmol) wurde mit 0.67 g (2.50 mmol) 3-(Brommethyl)-benzoesäure-*tert*-butylester (**126**) alkyliert. Der *tert*-Butylester wurde im Anschluß an die Alkylierung ohne weitere Aufreinigung nach AAV 9 hydrolysiert. Man erhielt die Zielverbindung **132** (0.51 g, 82%) nach HPLC-Reinigung und Lyophilisieren als weißen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 3.21$ (dd, 1H, $J_1 = 14.5$ Hz, $J_2 = 8.5$ Hz, $-\text{CHCHHC}_{\text{Ar}}$), 3.39 (dd, 1H, $J_1 = 14.5$ Hz, $J_2 = 3.5$ Hz, $-\text{CHCHHC}_{\text{Ar}}$), 3.48 (s, 3H, $-\text{NCH}_3$), 4.90 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 3.5$ Hz, $-\text{OCHCO}-$), 6.93 (dd, 1H, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 5.0$ Hz, Ar-H), 7.21 (dd, 1H, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz), 7.40 (t, 1H, $J_1 = 7.8$ Hz), 7.51 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.97-7.99 (m, 2H), 8.01 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz); **$^{13}\text{C-NMR}$** (62.5 Hz, CDCl_3): $\delta = 26.9, 37.3, 77.7, 119.2, 123.7, 128.6, 128.9, 129.4, 131.4, 134.9, 136.7, 139.7, 141.0, 142.0, 166.1, 171.1$; **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 18.41$ min; **ESI-MS**: m/z 1230.7 (20) $[\text{4M}+\text{K}]^+$, 933.1 (15) $[\text{3M}+\text{K}]^+$, 917.0 (5) $[\text{3M}+\text{Na}]^+$, 299.2 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

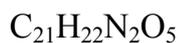
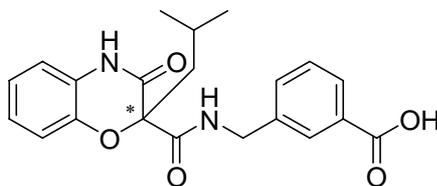
3-((4-Benzyl-2-oxomorpholin-3-yl)methyl)-benzoesäure (134)



Verbindung **134** wurde nach AAV 15 in einem Lösungsmittelgemisch aus DME/THF 5:1 bei -78°C hergestellt. Das Enolat der Verbindung 4-Benzylmorpholin-2-on (**133a**) (0.30 g, 1.57 mmol) wurde mit 0.60 g (2.20 mmol) 3-(Brommethyl)-benzoesäure-*tert*-butylester (**126**) alkyliert. Der *tert*-Butylester wurde im Anschluß an die Alkylierung ohne weitere Aufreinigung nach AAV 9 hydrolysiert. Man erhielt die Zielverbindung **134** (0.45 g, 89%) nach HPLC-Reinigung und Lyophilisieren als weißen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 2.50\text{-}2.55$ (m, 1H, $-\text{CHCHHC}_{\text{Ar}}$), $2.84\text{-}2.88$ (m, 1H, $-\text{CHCHHC}_{\text{Ar}}$), 3.46 (d, 1H, $J = 13.5$ Hz, $-\text{CHHN-}$), $3.71\text{-}3.72$ (m, 2H, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O-}$), $3.83\text{-}3.87$ (m, 2H, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O-}$), 4.12 (d, 1H, $J = 13.5$ Hz, $-\text{CHHN-}$), $4.18\text{-}4.20$ (m, 1H, $-\text{OCHCO-}$), $7.24\text{-}7.30$ (m, 5H, Ar- H_5), 7.39 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, Ar-H), 7.49 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, Ar-H), 7.91 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, Ar-H), 8.07 (s, 1H, Ar-H); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 19.01$ min; **ESI-MS**: m/z 1014.3 (10) $[3\text{M}+\text{K}]^+$, 998.4 (5) $[3\text{M}+\text{Na}]^+$, 326.2 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

**3-(3,4-Dihydro-2-isobutyl-3-oxo-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-carbonyl
amidomethyl)-benzoesäure (149)**



M: 382.15 g/mol

3,4-Dihydro-2-isobutyl-3-oxo-2H-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-carboxylsäure (**141**) (0.27 g, 1.10 mmol), 0.23 g (1.10 mmol) 3-(Aminomethyl)-benzoesäure-*tert*-Butylester (**142**), 0.15 g (1.10 mmol) HOBT und 0.23 g (1.20 mmol) EDCI wurden nach AAV 11 mit 0.60 g (4.62 mmol) DIPEA in Dichlormethan umgesetzt. Der *tert*-Butylester wurde nach AAV 9 hydrolysiert. Man erhielt die Zielverbindung **149** (0.29 g, 68%) nach HPLC-Reinigung und Lyophilisieren als weißen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.97$ (d, 3H, $J = 5.0$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.98 (d, 3H, $J = 5.0$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), $1.99\text{-}2.07$ (m, 2H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CCHHCH-}$), 2.16 (dd, 1H, $J_1 = 14.0$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz, $-\text{CCHHCH-}$), 4.32 (d, 1H, $J = 15.5$ Hz, $-\text{NHCHHC}_{\text{Ar}}$), 4.45 (d, 1H, $J = 15.5$ Hz, $-\text{NHCHHC}_{\text{Ar}}$), 6.87 (dd, 1H, $J_1 = 5.5$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, Ar-H), $6.93\text{-}6.98$ (m, 3H, Ar- H_3), 7.07 (dd, 1H, $J_1 = 7.0$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, Ar-H), 7.19 (d, 1H, $J = 7.0$ Hz, Ar-H), 7.27 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, Ar-H), 7.83 (s, 1H, Ar-H); **HPLC** (5-100%

in 30 min): $R_t = 19.35$ min; **ESI-MS**: m/z 1185.5 (50) $[3M+K]^+$, 1169.3 (20) $[3M+Na]^+$, 803.5 (35) $[2M+K]^+$, 787.3 (75) $[2M+Na]^+$, 765.3 (5) $[2M+H]^+$, 593.6 (45) $[(3M+K)/2]^+$, 405.5 (30) $[M+Na]^+$, 383.4 (100) $[M+H]^+$.

6.4 Festphasensynthese

6.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 31: Belegung des TCP-Harzes:

Zu trockenem TCP-Harz (maximale Belegungsichte 0.9 mmol/g Harz, 1.0 g) werden die *N*-terminal geschützte Aminosäure (1.08 mmol, 1.2 eq. bezogen auf die Harzbelegung), trockenes CH_2Cl_2 (8 mL) und DIPEA (2.25 mmol, 2.5 eq. bezogen auf die Harzbelegung) hinzugefügt. Diese Suspension wird für 45 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Zum *Cappen* von nicht umgesetzten Trityl-Gruppen wird anschließend Methanol (1 mL) hinzugefügt und weitere 15 Minuten geschüttelt. Das Harz wird über eine Fritte abgesaugt und mit folgenden Waschlösungen gewaschen: CH_2Cl_2 (3 x je 3 min), DMF (3x je 3 min) und abschließend nochmals mit CH_2Cl_2 (3 x je 3 min). Das Harz wird über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Die Bestimmung der Beladung konnte gravimetrisch nach folgender Formel ermittelt werden:

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

m_1 = Masse des eingesetzten Harzes [g]

m_2 = Gesamtmasse des Harzes nach der Belegung [g]

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

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

AAV 32: Belegung von OH-funktionalisierten Harzen nach Blankemeyer-Menge *et al.*:⁴³²

Die Quellung des Harzes erfolgt jeweils 5 Minuten mit trockenem DMF und anschließend mit trockenem CH_2Cl_2 . Zu einer 0.1 M Lösung aus *N*-Fmoc-geschützter, wasserfreier Aminosäure (2.0 eq. bezogen auf die Harzbelegung) (Fmoc-Aminosäuren mit Kristallwasser werden zuvor aus Dioxan lyophilisiert) in trockenem CH_2Cl_2 fügt

man *N*-Methylimidazol (3.0 eq. bezogen auf die Harzbelegung) und MNST (2 eq. bezogen auf die Harzbelegung) hinzu. Falls die Fmoc-Aminosäure sehr schlecht löslich sein sollte, so wird etwas absolutes THF zugegeben. Diese Lösung wird unter Argon zum Harz gegeben. Nach 1 Stunde wird das Harz mit CH₂Cl₂ (3 x je 3 min) und DMF (3x je 3min) gewaschen. Nicht umgesetzte OH-Gruppen werden mit einer Lösung aus Essigsäureanhydrid/DIPEA/DMF 5:3:92 *gecappt*. Abschließend wird das Harz jeweils mit DMF (3 x je 3 min), Methanol (3x je 3 min) und CH₂Cl₂ (3 x je 3 min) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

AAV 33: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe:

Das Harz wird für 5 Minuten mit DMF (1 x 10 mL) gequollen. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt mit 20%-iger Piperidin/DMF Lösung (2 x 10 mL, 15 min). Das Harz wird anschließend mit DMF (5 x je 3 min) gewaschen.

AAV 34: Kupplungen mit TBTU/HOBt:

Das harzgebundene, freie Amin wird mit NMP (3 x je 3 min) gewaschen und anschließend mit einer 0.1-0.25 M Lösung aus *N*-Fmoc-geschützter Aminosäure (3.0 eq. bezogen auf die Harzbelegung), TBTU (3 eq. bezogen auf die Harzbelegung), HOBt·H₂O (3.0 eq. bezogen auf die Harzbelegung) und DIPEA (9.0 eq. bezogen auf die Harzbelegung) in NMP versetzt. Die Kupplungsdauer beträgt 60 Minuten. Das Harz wird anschließend mit NMP (5 x je 3 min) gewaschen.

AAV 35: Kupplungen mit HATU/HOAt:

Das harzgebundene, freie Amin wird mit NMP (3 x je 3 min) gewaschen und anschließend mit einer 0.1-0.25 M Lösung aus Fmoc-geschützter Aminosäure (3.0 eq. bezogen auf die Harzbelegung), HATU (3.0 eq. bezogen auf die Harzbelegung), HOAt (3.0 eq. bezogen auf die Harzbelegung) und *sym*-Collidin (30.0 eq. bezogen auf die Harzbelegung) in NMP versetzt. Die Kupplungsdauer beträgt 60 Minuten. Das Harz wird anschließend mit NMP (5 x je 3 min) gewaschen.

AAV 36: Festphasensynthese linearer Peptide mit Fmoc-Schutzgruppenstrategie:

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe der harzgebundenen Aminosäure und die Kupplung einer weiteren *N*-Fmoc-geschützten Aminosäure erfolgt nach folgendem Schema:

Schritt	Reagenzien	Operation	Anzahl	Zeit [min]
---------	------------	-----------	--------	------------

1	NMP	Quellen	2	3
2	20% Piperidin/DMF	Entschützen	2	15
3	NMP	Waschen	5	3
4	Fmoc-AS-OH Kupplungsreagenz/Base	Kuppeln	1	60
5	NMP	Waschen	5	3

Wird die Synthese an einer Stelle unterbrochen, so wäscht man das Harz mit DMF (5 x je 3 min), CH₂Cl₂ (5 x je 3 min) und trocknet es im Vakuum.

Vor der Abspaltung des Peptids vom Harz wird die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe analog der Schritte 1-3 des Fließschemas entfernt.

AAV 37: Abspaltung vollständig entschützter Verbindungen vom Wang-Harz:

Das Harz wird zunächst mit CH₂Cl₂ (3 x 10 mL, je 5 min) gewaschen und dann mit einem 95:2.5:2.5 Gemisch aus TFA:TIPS:H₂O für 1 Stunde versetzt. Das Harz wird mit einem 95:5 Gemisch TFA/H₂O gewaschen (3 x je 5 min). Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum eingeeengt und mit Toluol koevaporiert.

AAV 37b: Abspaltung vollständig entschützter Verbindungen vom TCP-Harz:

Das Harz wird zunächst mit CH₂Cl₂ (3 x je 5 min) gewaschen und dann mit einem 95:5:2 Gemisch aus DCM/TFA/TIPS für 1 Stunde versetzt. Das Harz wird mit einem 95:5 Gemisch aus DCM/TFA gewaschen (3 x je 5 min). Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum eingeeengt und mit Toluol koevaporiert.

AAV 38: Reduktive Alkylierung an der Festphase nach Krchnak *et al.*:³¹²

Das freie, harzgebundene Amin wird mit trockenem DMF (3 x je 5 min) und TMOF (3 x je 5 min) gewaschen und anschließend mit einer 0.17 M Lösung des entsprechenden Aldehyds (5.0 eq.) in TMOF versetzt. Nach 5 Stunden wäscht man das Harz mit CH₂Cl₂ (3 x je 5 min) und füllt eine 0.1 M Suspension von Natriumtriacetoxyborhydrid (5.0 eq.) in CH₂Cl₂ in das Reaktionsgefäß ein. Nach 16 Stunden wird das Harz mit DMF (3 x je 5 min) und CH₂Cl₂ (3 x je 5 min) gewaschen. Das Trocknen des Harzes erfolgt im Hochvakuum.

AAV 39: Einführung von elektronenarmen Aromaten durch nukleophile, aromatische Substitution an der festen Phase nach Krchnak *et al.*:²⁵²

Das harzgebundene aromatische Amin wird zunächst mit trockenem DMF (3 x je 5 min) gewaschen und anschließend mit einer 0.5 M Lösung aus 2-Chlor-3-Nitropyridin (15.0 eq.) und DIPEA (15.0 eq.) in trockenem DMF versetzt. Nach 12 Stunden Schütteln bei 80°C wird die Reaktion durch Waschen mit DMF (3 x je 5 min) und Dichlormethan (3 x je 5 min) abgebrochen. Anschließend wird das Harz im Vakuum getrocknet.

AAV 40: Quarternisierung von Pyridinen an der festen Phase nach Goff *et al.*:²⁶¹

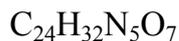
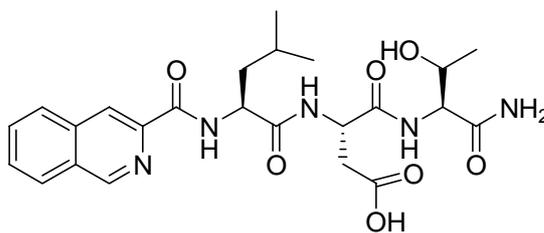
Das harzgebundene aromatische Amin wird zunächst mit trockenem DMF (3 x je 5 min) gewaschen und anschließend mit einer 3.5 M Lösung des α -Bromessigsäureesters bzw. des α -Bromketons (45.0 eq.) in trockenem DMF versetzt. Nach 12 Stunden Schütteln bei 40°C wird die Reaktion durch Waschen mit DMF (3 x je 5 min) und Dichlormethan (3 x je 5 min) abgebrochen. Anschließend wird das Harz im Vakuum getrocknet.

AAV 41: Indolizinsynthese an der festen Phase nach Goff *et al.*:²⁶¹

Das harzgebundene Pyridiniumsalz wird zunächst mit trockenem DMF (3 x je 5 min) gewaschen und anschließend mit einer 3.5 M Lösung aus Acrylnitril (45.0 eq.) und Triethylamin (45.0 eq.) in trockenem DMF versetzt. Nach 1 Stunde Schütteln bei 60°C wird die Reaktion durch Waschen mit DMF (5 x je 3 min) abgebrochen. Anschließend wird nun das harzgebundene Tetrahydroindolizin mit einer Lösung des bimetallichen Oxidations-Komplexes TPCD (3.0 eq.) in absolutem DMF versetzt und die Oxidation innerhalb 6 Stunden bei 80°C unter Schütteln durchgeführt. Die Reaktion wird durch Waschen mit DMF (3 x je 5 min) und Dichlormethan (3 x je 5 min) abgebrochen. Anschließend wird das Harz im Vakuum getrocknet.

AAV 42: Suzuki-Kupplung an der festen Phase

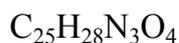
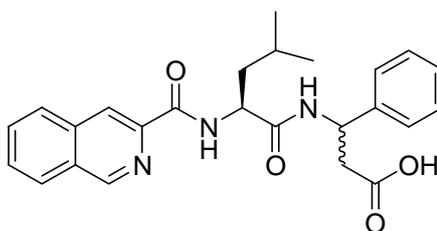
Die harzgebundene Bromverbindung wird mit absolutem, entgastem DMF (3 x je 5 min) gewaschen und mit einer absoluten, entgasten Lösung aus der Arylboronsäure (5.0 eq.) und Triethylamin (10.0 eq.) in DMF versetzt. Im zweiten Schritt fügt man die absolute, entgaste Lösung des Palladiumkomplexes Pd(dppf)₂Cl₂ in DMF hinzu. Die Reaktionslösung wird mindestens 18 Stunden bei 80°C unter Inertgas geschüttelt und anschließend mit DMF (3 x je 5 min) und Dichlormethan (3 x je 5 min) gewaschen.

6.4.2 Synthese von α_4 -Integrinantagonisten an der festen Phase**Isochinolin-Leu-Asp-Thr-NH₂ (9)**

M: 500.23 g/mol

0.25 g Rink-Amid-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 33/AAV 34 mit *N*-Fmoc- β -Phenylalanin belegt und jeweils mit *N*-Fmoc-Leu, *N*-Fmoc-Thr-(*O*'Bu)-OH und Isochinolincarbonsäure nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Abspaltung vom Harz (AAV 37) und anschließende HPLC-Reinigung lieferte das entschützte Carbonsäureamid **9** (60.0 mg, 80%) als weißen Feststoff.

HPLC (5-100% in 30 min): $R_t = 15.88$ min; **ESI-MS**: m/z 1504.4 (15) $[3\text{M}+\text{H}]^+$, 1041.6 (15) $[2\text{M}+\text{K}]^+$, 1025.4 (30) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 1003.4 (100) $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 772.1 (5) $[(3\text{M}+\text{K})/2]^+$, 524.5 (15) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 502.3 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 485.4 (15) $[\text{M}-\text{OH}]^+$.

Isochinolin-Leu-(3-amino-3-phenylpropansäure) (10)

M: 432.2 g/mol

0.25 g Wang-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 32 mit *N*-Fmoc- β -Phenylalanin belegt und jeweils mit *N*-Fmoc-Leu und Isochinolincarbonsäure nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Abspaltung vom Harz (AAV 37) und anschließende HPLC-Reinigung lieferte die Verbindung **10** (61.6 mg, 95%) als weißen Feststoff. Die beiden Diastereomere **A** und **B** konnten getrennt werden.

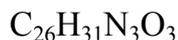
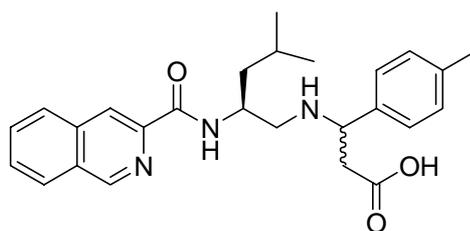
Diastereomer **A**:

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 1.01 (sept, 6H, -CH(CH₃)₂), 1.76-1.78 (m, 3H, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH-), 2.81-2.87 (m, 2H, -CH₂COOH), 4.76-4.77 (m, 1H, -NHCHCO-), 5.38 (t, 1H, J = 8.0 Hz, -NHCHC_{Ar}), 7.21 (t, 1H, J = 7.5 Hz, Ar-H), 7.29 (t, 2H, J = 7.0 Hz, Ar-H₂), 7.38 (d, 2H, J = 7.0 Hz, Ar-H₂), 7.81 (t, 1H, J = 7.0 Hz, Ar-H), 7.88 (t, 1H, J = 7.0 Hz, Ar-H), 8.09 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 8.19 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 8.55 (s, 1H, Ar-H), 9.29 (s, 1H, Ar-H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 21.20 min; **ESI-MS**: m/z 1338.4 (10) [3M+K]⁺, 1322.3 (5) [3M+Na]⁺, 1300.3 (10) [3M+H]⁺, 906.6 (15) [2M+K]⁺, 889.4 (30) [2M+Na]⁺, 867.4 (20) [2M+H]⁺, 456.4 (10) [M+Na]⁺, 434.3 (100) [M+H]⁺.

Diastereomer **B**:

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.95 (sept, 6H, -CH(CH₃)₂), 1.64-1.75 (m, 3H, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH-), 2.81 (dd, 1H, J_1 = 15.5 Hz, J_2 = 6.5 Hz, -CHHCOOH), 2.90 (dd, 1H, J_1 = 16.0 Hz, J_2 = 8.5 Hz, -CHHCOOH), 4.76 (dd, 1H, J_1 = 8.5 Hz, J_2 = 6.5 Hz, -NHCHCO-), 5.39 (t, 1H, J = 7.0 Hz, -NHCHC_{Ar}), 7.23-7.36 (m, 5H, Ar-H₅), 7.82 (t, 1H, J = 7.0 Hz, Ar-H), 7.89 (t, 1H, J = 7.0 Hz, Ar-H), 8.10 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 8.20 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 8.55 (s, 1H, Ar-H), 9.29 (s, 1H, Ar-H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 22.05 min; **ESI-MS**: m/z 1338.4 (10) [3M+K]⁺, 1322.3 (5) [3M+Na]⁺, 1300.3 (10) [3M+H]⁺, 906.6 (15) [2M+K]⁺, 889.4 (30) [2M+Na]⁺, 867.4 (20) [2M+H]⁺, 456.4 (10) [M+Na]⁺, 434.3 (100) [M+H]⁺.

3-((S)-2-(Isoquinoline-3-carboxamido)-4-methylpentylamino)-3-para-tolylpropansäure (11)



M: 433.24 g/mol

0.50 g TCP-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc-3-amino-3-para-tolylpropansäure belegt und nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach AAV 33 reduktiv mit *tert*-Butyl-(S)-1-formyl-3-methylbutylcarbammat (**78**) nach AAV 38 gekuppelt. Das so gebildete Intermediat wurde nach AAV 37 mit TFA/DCM 1:1 vom Harz abgespalten und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen bzw. mit Toluol coevaporiert. Das freie Amin (1.16 mg, 0.20 mmol) wurde mit 53.0 mg (0.20 mmol)

Isochinolin-OSu und 50.0 mg (0.59 mmol) NaHCO₃ nach AAV 1 zu der Zielverbindung umgesetzt. HPLC-Reinigung lieferte nach Lyophilisieren die Verbindung **11** (0.55 mg, 41%) als weißen Feststoff. Die beiden Diastereomere wurden nicht getrennt.

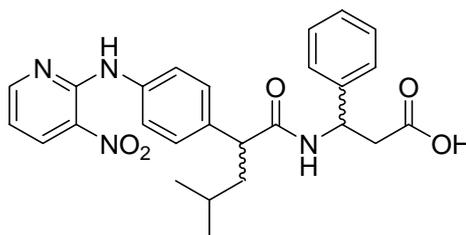
Freies Amin:

HPLC (5-100% in 30 min): R_t= 12.20 min und 12.62 min; **ESI-MS**: *m/z* 873.3 (20) [3M+K]⁺, 858.2 (10) [3M+Na]⁺, 595.4 (15) [2M+K]⁺, 579.3 (20) [2M+Na]⁺, 557.2 (20) [2M+H]⁺, 279.2 (100) [M+H]⁺.

Zielverbindung **11**:

HPLC (5-100% in 30 min): R_t= 19.78 min und 19.94 min; **ESI-MS**: *m/z* 1322.0 (15) [3M+Na]⁺, 889.0 (25) [2M+Na]⁺, 867.0 (5) [2M+H]⁺, 434.2 (100) [M+H]⁺.

3-(2-(4-(3-nitropyridin-2-ylamino)phenyl)-4-methylpentanamido)-3-phenylpropansäure (16a)



M: 476.21 g/mol

0.50 g Wang-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 32 mit *N*-Fmoc- β -Phenylalanin belegt und mit *N*-Fmoc-4-Methyl-2-(4-aminophenyl)-pentansäure (**15a**) nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach AAV 33 und nukleophile, aromatische Substitution nach AAV 39 lieferte nach Abspaltung vom Harz (AAV 37) und anschließender HPLC-Reinigung das TFA-Salz der Verbindung **16a** (0.16 g, 90%) als roten Feststoff. Die beiden Diastereomere **A** und **B** konnten getrennt werden.

Diastereomer **A**:

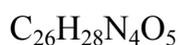
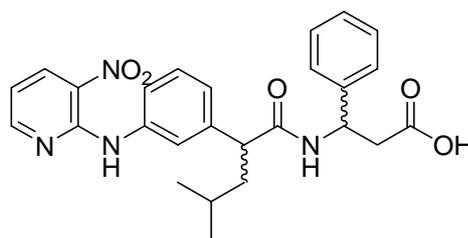
¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.87 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, -CH(CH₃)₂), 0.93 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz, -CH(CH₃)₂), 1.39-1.44 (m, 1H, -CH(CH₃)₂), 1.52-1.63 (m, 1H, -CHHCH-), 1.90-1.99 (m, 1H, -CHHCH-), 2.74 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, -CHHCOOH), 2.77 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz, -CHHCOOH), 3.69 (m, 1H, -CHCO-), 5.34 (m, 1H, -NHCHC_{Ar}), 6.95 (dd,

1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 4.5$ Hz, Ar-H), 7.27-7.42 (m, 7H, Ar-H₇), 7.63 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, Ar-H), 8.48 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, Ar-H), 8.61 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, Ar-H); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 23.10$ min; **ESI-MS**: m/z 477.4 (100) $[M+H]^+$.

Diastereomer **B**:

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.86$ (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, -CH(CH₃)₂), 0.91 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, -CH(CH₃)₂), 1.37-1.42 (m, 1H, -CH(CH₃)₂), 1.53-1.58 (m, 1H, -CHHCH-), 1.90-1.96 (m, 1H, -CHHCH-), 2.68-2.76 (m, 2H, -CH₂COOH), 3.69 (m, 1H, -CHCO-), 5.31 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, -NHCHC_{Ar}), 6.91 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 4.5$ Hz, Ar-H), 7.27-7.42 (m, 7H, Ar-H₇), 7.61 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, Ar-H), 8.45 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, Ar-H), 8.58 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, Ar-H); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 22.59$ min; **ESI-MS**: m/z 477.4 (100) $[M+H]^+$.

3-(2-(3-(3-nitropyridin-2-ylamino)phenyl)-4-methylpentanamido)-3-phenylpropansäure (16b)



M: 476.21 g/mol

0.50 g Wang-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 32 mit *N*-Fmoc- β -Phenylalanin belegt und mit *N*-Fmoc-4-Methyl-2-(4-aminophenyl)-pentansäure (**15b**) nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach AAV 33 und nukleophile, aromatische Substitution nach AAV 39 lieferte nach Abspaltung vom Harz (AAV 37) und anschließender HPLC-Reinigung das TFA-Salz der Verbindung **16b** (0.13 g, 85%) als roten Feststoff. Die beiden Diastereomere **A** und **B** konnten getrennt werden.

Diastereomer **A**:

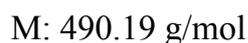
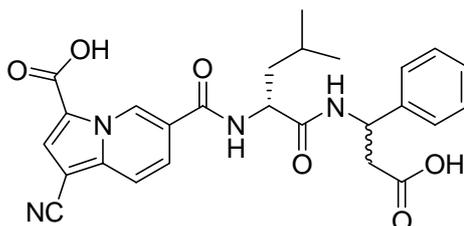
¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): $\delta = 1.00$ (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, -CH(CH₃)₂), 0.97 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, -CH(CH₃)₂), 1.55-1.67 (m, 2H, -CH(CH₃)₂, -CHHCH-), 1.97-2.07 (m, 1H, -CHHCH-), 2.80 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, -CH₂COOH), 3.72 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz, -CHCO-), 5.34-5.40 (m, 1H, -NHCHCO-), 6.93 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz,

$J_2 = 4.5$ Hz, Ar-H), 7.12-7.33 (m, 7H, Ar-H₇), 7.57 (bs, 1H, -NH), 8.42 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, Ar-H), 8.61 (dd, 1H, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, Ar-H); **HPLC** (20-100% in 30 min): $R_t = 19.32$ min; **ESI-MS**: m/z 477.4 (100) $[M+H]^+$.

Diastereomer **B**:

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.86$ (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, -CH(CH₃)₂), 0.91 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz, -CH(CH₃)₂), 1.39-1.45 (m, 1H, -CH(CH₃)₂), 1.56-1.60 (m, 1H, -CHHCH-), 1.91-1.97 (m, 1H, -CHHCH-), 2.71 (dd, 1H, $J_1 = 15.5$ Hz, $J_2 = 6.5$ Hz, -CHHCOOH), 2.77 (dd, 1H, $J_1 = 15.5$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, -CHHCOOH), 3.70 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz, -CHCO-), 5.31 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz, -NHCHC_{Ar}), 6.92 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 4.5$ Hz, Ar-H), 7.17-7.35 (m, 6H, Ar-H₆), 7.59 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, Ar-H), 7.63 (bs, 1H, -NH), 8.46 (dd, 1H, $J_1 = 4.5$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, Ar-H), 8.59 (dd, 1H, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, Ar-H); **HPLC** (20-100% in 30 min): $R_t = 19.82$ min; **ESI-MS**: m/z 477.4 (100) $[M+H]^+$.

3-(2-(6-Carbamoyl-1-cyanoindolizin-3-carboxylsäure)-4-methylpentanamido)-3-phenylpropansäure (25a)



0.50 g (0.6 mmol/g) TCP-Harz wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc- β -Phenylalanin belegt und nacheinander mit *N*-Fmoc-Leucin-OH bzw. Nicotinsäure nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Quarternisierung des Pyridinstickstoffs mit Bromessigsäureethylester nach AAV 40 und anschließende Synthese des Indolizins nach AAV 41 lieferte nach Abspaltung vom Harz (AAV 37b) und anschließender HPLC-Reinigung die Verbindung **25aEster** (0.10 g, 65%) als gelben Feststoff. Hydrolyse nach AAV 10 lieferte die freie Säure **25a**. Die beiden Diastereomere **A** und **B** konnten getrennt werden.

Diastereomer **A**:

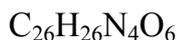
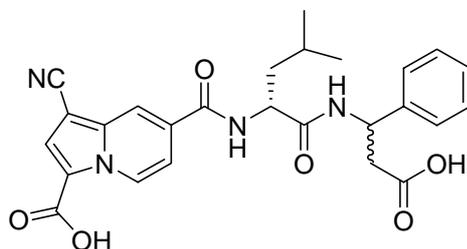
¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): $\delta = 1.00$ (d, 3H, $J = 6.0$ Hz, -CH(CH₃)₂), 1.02 (d, 3H, $J = 6.0$ Hz, -CH(CH₃)₂), 1.71-1.82 (m, 3H, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH-), 2.83 (d, 2H,

$J = 7.5$ Hz, $-CH_2COOH$), 4.70 (m, 1H, $-NHCHCO-$), 5.37 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, $-NHCHC_{Ar}$), 7.21-7.39 (m, 5H, Ar- H_5), 7.49 (dd, 1H, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, Ar-H), 7.89 (s, 1H, Ar-H), 8.32 (bs, 1H, Ar-H), 9.58 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, Ar-H); **HPLC** (20-100% in 30 min): $R_t = 19.05$ min; **ESI-MS**: m/z 1493.2 (15) $[3M+Na]^+$, 1471.2 (35) $[3M+H]^+$, 1003.4 (30) $[2M+Na]^+$, 981.4 (100) $[2M+H]^+$, 491.4 (35) $[M+H]^+$.

Diastereomer **B**:

1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 0.94$ (d, 3H, $J = 6.0$ Hz, $-CH(CH_3)_2$), 0.96 (d, 3H, $J = 6.0$ Hz, $-CH(CH_3)_2$), 1.63-1.76 (m, 3H, $-CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH-$), 2.82 (dd, 1H, $J_1 = 16.0$ Hz, $J_2 = 7.5$ Hz, $-CHHCOOH$), 2.89 (dd, 1H, $J_1 = 13.0$ Hz, $J_2 = 7.5$ Hz, $-CHHCOOH$), 4.69 (m, 1H, $-NHCHCO-$), 5.37 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, $NHCHC_{Ar}$), 7.24-7.36 (m, 5H, Ar- H_5), 7.55 (dd, 1H, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, Ar-H), 7.90 (s, 1H, Ar-H), 8.38 (bs, 1H, Ar-H), 9.61 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, Ar-H); **HPLC** (20-100% in 30 min): $R_t = 19.30$ min; **ESI-MS**: m/z 1493.2 (15) $[3M+Na]^+$, 1471.2 (35) $[3M+H]^+$, 1003.4 (30) $[2M+Na]^+$, 981.4 (100) $[2M+H]^+$, 491.4 (35) $[M+H]^+$.

3-(2-(7-Carbamoyl-1-cyanoindolizin-3-carboxylsäure)-4-methylpentanamido)-3-phenylpropansäure (**25b**)

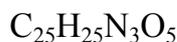
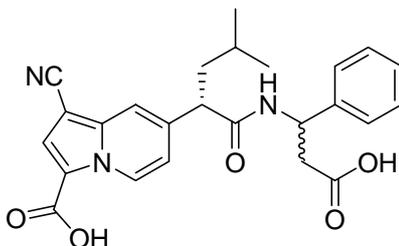


M: 490.19 g/mol

0.50 g (0.6 mmol/g) TCP-Harz wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc- β -Phenylalanin belegt und nacheinander mit *N*-Fmoc-Leucin-OH bzw. Isonicotinsäure nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Quarternisierung des Pyridinstickstoffs mit Bromessigsäureethylester nach AAV 40 und anschließende Synthese des Indolizins nach AAV 41 lieferte nach Abspaltung vom Harz (AAV 37b) und anschließender HPLC-Reinigung die Verbindung **25bEster** (0.10 g, 71%) als gelben Feststoff. Hydrolyse nach AAV 10 lieferte die freie Säure **25b**. Die beiden Diastereomere wurden nicht getrennt.

HPLC (5-100% in 30 min): $R_t = 15.08$ min und $R_t = 15.52$ min; **ESI-MS**: m/z 1508.8 (10) $[3M+K]^+$, 1493.2 (10) $[3M+Na]^+$, 1470.7 (15) $[3M+H]^+$, 1003.1 (15) $[2M+Na]^+$, 981.0 (100) $[2M+H]^+$, 491.3 (60) $[M+H]^+$.

3-(2-(7-(1-Cyano-indolizin-3-carboxylsäure))-4-methylpentanamido)-3-phenylpropansäure (30)

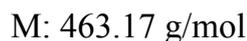
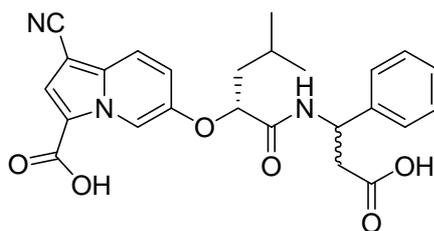


M: 447.18 g/mol

0.50 g (0.6 mmol/g) TCP-Harz wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc- β -Phenylalanin belegt und mit 4-Methyl-2-(pyridin-4-yl)-pentansäure (**28**) nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Quarternisierung des Pyridinstickstoffs mit Bromessigsäureethylester nach AAV 40 und anschließende Synthese des Indolizins nach AAV 41 lieferte nach Abspaltung vom Harz (AAV 37b) und anschließender HPLC-Reinigung die Verbindung **30Ester** (0.11 g, 81%) als gelben Feststoff. Hydrolyse nach AAV 10 lieferte die freie Säure **30**. Die beiden Diastereomere wurden nicht getrennt.

HPLC (5-100% in 30 min): $R_t = 19.86$ min und $R_t = 21.46$ min; **ESI-MS**: m/z 1381.0 (10) $[3M+K]^+$, 1363.9 (15) $[3M+Na]^+$, 1341.8 (15) $[3M+H]^+$, 917.0 (35) $[2M+Na]^+$, 895.0 (100) $[2M+H]^+$, 448.2 (60) $[M+H]^+$.

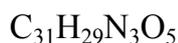
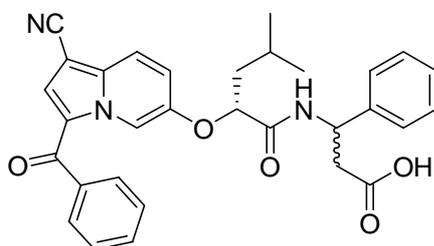
3-(2-(6-(1-Cyano-3-carboxy-indolizin-oxy))-4-methylpentanamido)-3-phenylpropansäure (35a)



An mit *N*-Fmoc- β -Phenylalanin belegtes TCP-Harz (0.50 g, 0.6 mmol/g) wurde nach AAV 33 und AAV 34 (S)-4-Methyl-2-(pyridin-3-yloxy)-pentansäure (**34**) gekuppelt. Quarternisierung des Pyridinstickstoffs mit Bromessigsäureethylester nach AAV 40 und anschließende Synthese des Indolizins nach AAV 41 lieferte nach Abspaltung vom Harz (AAV 37b) und anschließender HPLC-Reinigung die Verbindung **35aEster** (76.3 mg, 55%) als gelben Feststoff. Die beiden Diastereomere wurden nicht getrennt. Hydrolyse nach AAV 10 lieferte die freie Säure **35a**. Die beiden Diastereomere wurden nicht getrennt.

HPLC (5-100% in 30 min): $R_t = 20.06$ min und $R_t = 20.77$ min; **ESI-MS**: m/z 1427.7 (20) $[3\text{M}+\text{K}]^+$, 1411.7 (20) $[3\text{M}+\text{Na}]^+$, 1389.3 (5) $[3\text{M}+\text{H}]^+$, 965.2 (70) $[2\text{M}+\text{K}]^+$, 949.0 (65) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 926.9 (30) $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 714.9 (45) $[(3\text{M}+\text{K})/2]$, 486.3 (60) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 464.2 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-(2-(6-(1-Cyano-3-benzoyl-indolizin-oxy))-4-methylpentanamido)-3-phenylpropansäure (35b)

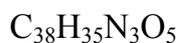
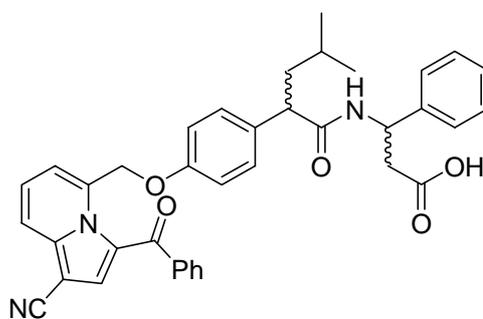


0.50 g (0.6 mmol/g) TCP-Harz wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc- β -Phenylalanin belegt und mit (S)-4-Methyl-2-(pyridin-3-yloxy)-pentansäure (**34**) nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Quarternisierung des Pyridinstickstoffs mit 2-Brom-1-

phenylethanon nach AAV 40 und anschließende Synthese des Indolizins nach AAV 41 lieferte nach Abspaltung vom Harz (AAV 37b) und anschließender HPLC-Reinigung die Verbindung **35b** (0.11 g, 70%) als gelben Feststoff. Die beiden Diastereomere wurden nicht getrennt.

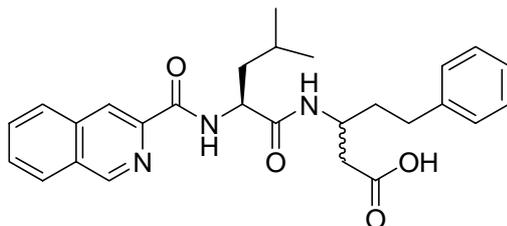
HPLC (5-100% in 30 min): $R_t = 25.77$ min und $R_t = 26.06$ min; **ESI-MS**: m/z 1609.8 (15) $[3M+K]^+$, 1592.8 (10) $[3M+Na]^+$, 1570.9 (15) $[3M+H]^+$, 1085.2 (60) $[2M+K]^+$, 1069.4 (60) $[2M+Na]^+$, 1047.0 (25) $[2M+H]^+$, 805.1 (50) $[(3M+K)/2]$, 546.3 (40) $[M+Na]^+$, 524.2 (100) $[M+H]^+$.

3-(2-((1-Cyano-3-benzoyl-indolizin-5-yl)methoxy)phenyl)-4-methylpentanamido)-3-phenylpropansäure (39)



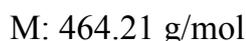
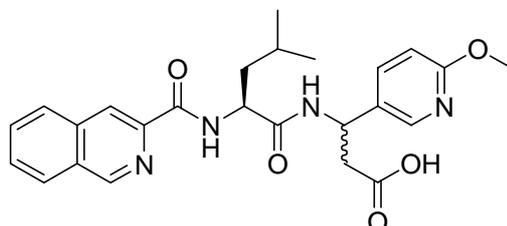
An mit *N*-Fmoc- β -Phenylalanin belegtes TCP-Harz (0.50 g, 0.6 mmol/g) wurde nach AAV 33 und AAV 34 2-(4-((Pyridin-2-yl)methoxy)phenyl)-4-methylpentansäure (**38**) gekuppelt. Quarternisierung des Pyridinstickstoffs mit 2-Brom-1-phenylethanon nach AAV 40 und anschließende Synthese des Indolizins nach AAV 41 lieferte nach Abspaltung vom Harz (AAV 37b) und anschließender HPLC-Reinigung die Verbindung **39** (91.9 mg, 50%) als gelben Feststoff. Die beiden Diastereomere wurden nicht getrennt.

HPLC (5-100% in 30 min): $R_t = 26.45$ min und $R_t = 27.16$ min; **ESI-MS**: m/z 1879.0 (10) $[3M+K]^+$, 1862.0 (5) $[3M+Na]^+$, 1839.4 (5) $[3M+H]^+$, 1265.2 (60) $[2M+K]^+$, 1249.2 (15) $[2M+Na]^+$, 1227.1 (100) $[2M+H]^+$, 652.4 (30) $[M+K]^+$, 636.2 (15) $[M+Na]^+$, 614.2 (100) $[M+H]^+$.

Isochinolincarbonsäure-Leu-(3-amino-5-phenylpentansäure) (65)

0.50 g TCP-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc-3-Amino-5-phenylpentansäure (**62**) belegt und mit *N*-Fmoc-(L)-Leucin-OH und Isochinolincarbonsäure nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Abspaltung vom Harz (AAV 37) und anschließende HPLC-Reinigung lieferte die Verbindung **65** (0.12 g, 90%) als weißen Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): $\delta = 1.03\text{-}1.08$ (m, 6H), 1.81-1.94 (m, 5H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{NHCHCH}_2-$), 2.53-2.73 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_{\text{Ar}}$), 4.26-4.30 (m, 1H, $-\text{NHCH}-$), 4.72-4.77 (m, 1H, $-\text{NHCHCO}-$), 7.14-7.27 (m, 5H, Ar-H₅), 7.82-7.96 (m, 2H, Ar-H₂), 8.13 (d, 1H, $J = 16.5$ Hz, Ar-H), 8.25 (d, 1H, $J = 16.5$, Ar-H), 8.62 (d, 1H, $J = 6.5$ Hz, Ar-H), 9.38 (s, 1H, Ar-H); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 25.10$ min; **ESI-MS**: m/z 1422.0 (10) $[3\text{M}+\text{K}]^+$, 1406.0 (5) $[3\text{M}+\text{Na}]^+$, 1383.4 (5) $[3\text{M}+\text{H}]^+$, 961.2 (60) $[2\text{M}+\text{K}]^+$, 945.2 (15) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 922.1 (100) $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 500.4 (30) $[\text{M}+\text{K}]^+$, 484.2 (15) $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 462.2 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Isochinolincarbonsäure-Leu-(3-amino-3-(6-methoxypyridin-3-yl)-propansäure)**(75a)**

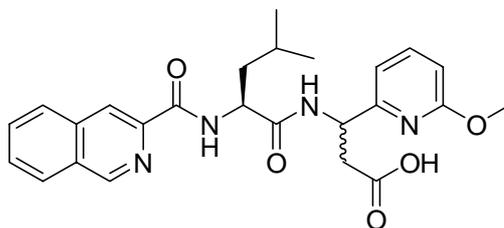
0.50 g TCP-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc-3-amino-3-(6-methoxypyridin-3-yl)-propansäure (**74a**) belegt und mit *N*-Fmoc-(L)-Leucin-OH und Isochinolincarbonsäure nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Abspaltung vom Harz

(AAV 37) und anschließende HPLC-Reinigung lieferte nach Lyophilisieren die Verbindung **75** (0.14 g, 90%) als weißen Feststoff. Die beiden Diastereomere wurden nicht getrennt.

HPLC (5-100% in 30 min): $R_t = 18.38$ min und 19.05 min; **ESI-MS**: m/z 1431.1 (20) $[3M+K]^+$, 1415.9 (35) $[3M+Na]^+$, 1393.1 (5) $[3M+H]^+$, 967.4 (15) $[2M+K]^+$, 952.2 (100) $[2M+Na]^+$, 929.2 (45) $[2M+H]^+$, 487.4 (15) $[M+Na]^+$, 465.2 (100) $[M+H]^+$.

Isochinolincarbonsäure-Leu-(3-amino-3-(6-methoxypyridin-2-yl)-propansäure)

(**75b**)



$C_{25}H_{28}N_4O_5$

M: 464.21 g/mol

0.50 g TCP-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc-3-amino-3-(6-methoxypyridin-2-yl)-propansäure (**74b**) belegt und mit *N*-Fmoc-(*L*)-Leucin-OH und Isochinolincarbonsäure nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Abspaltung vom Harz (AAV 37) und anschließende HPLC-Reinigung lieferte nach Lyophilisieren die Verbindung **75** (0.14 g, 90%) als weißen Feststoff. Die beiden Diastereomere konnten getrennt werden.

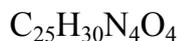
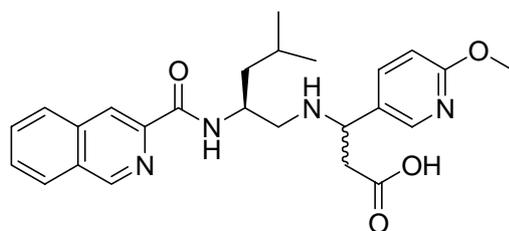
Diastereomer **A**:

1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.02$ (ψt , 6H, $J = 6.0$ Hz, $-CH(CH_3)_2$), 1.80-1.85 (m, 3 H, $-CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH-$), 2.84 (dd, 1H, $J_1 = 16.0$ Hz, $J_2 = 7.6$ Hz, $-CHHCOOH$), 3.02 (dd, 1H, $J_1 = 16.0$ Hz, $J_2 = 6.6$ Hz, $-CHHCOOH$), 3.84 (s, 3H, $-CH_3$), 4.77-4.83 (m, 1H, $-NHCHCO-$), 5.41 (t, 1H, $J = 6.6$ Hz, $-NHCHC_{Ar}$), 6.62 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 7.00 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, Ar-H), 7.58 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, Ar-H), 7.82 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz, Ar-H), 7.89 (t, 1H, 7.0 Hz, Ar-H), 8.10 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, Ar-H), 8.21 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, Ar-H), 8.57 (s, 1H, Ar-H), 9.13 (s, 1H, Ar-H); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 21.56$ min; **ESI-MS**: m/z 1431.1 (20) $[3M+K]^+$, 1415.9 (35) $[3M+Na]^+$, 1393.1 (5) $[3M+H]^+$, 967.4 (15) $[2M+K]^+$, 952.2 (100) $[2M+Na]^+$, 929.2 (45) $[2M+H]^+$, 487.4 (15) $[M+Na]^+$, 465.2 (100) $[M+H]^+$.

Diastereomer **B**:

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.97 (ψ t, 6H, J = 7.0 Hz, -CH(CH₃)₂), 1.71-1.81 (m, 3 H, -CH(CH₃)₂, -CH₂CH-), 2.87 (dd, 1H, J_1 = 16.0 Hz, J_2 = 6.5 Hz, -CHHCOOH), 3.02 (dd, 1H, J_1 = 16.0 Hz, J_2 = 7.0 Hz, -CHHCOOH), 3.84 (s, 3H, -CH₃), 4.77-4.83 (m, 1H, -NHCHCO-), 5.41 (t, 1H, J = 7.0 Hz, -NHCHC_{Ar}), 6.62 (d, 1H, J = 8.5 Hz, Ar-H), 6.94 (d, 1H, J = 7.5 Hz, Ar-H), 7.59 (t, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.82 (t, 1H, J = 7.0 Hz, Ar-H), 7.89 (t, 1H, 7.0 Hz, Ar-H), 8.10 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 8.21 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 8.56 (s, 1H, Ar-H), 9.13 (s, 1H, Ar-H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 22.06 min; **ESI-MS**: m/z 1431.1 (20) [3M+K]⁺, 1415.9 (35) [3M+Na]⁺, 1393.1 (5) [3M+H]⁺, 967.4 (15) [2M+K]⁺, 952.2 (100) [2M+Na]⁺, 929.2 (45) [2M+H]⁺, 487.4 (15) [M+Na]⁺, 465.2 (100) [M+H]⁺.

3-((S)-2-(Isoquinolin-3-carboxamido)-4-methylpentylamino)-3-(6-methoxypyridin-3-yl)-propansäure (80a)

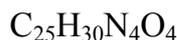
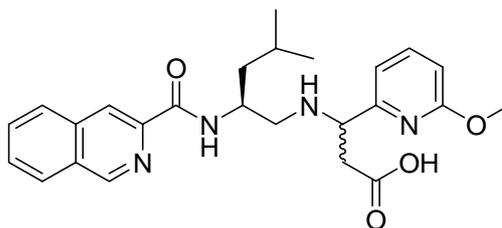


M: 450.23 g/mol

0.50 g TCP-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc-3-amino-3-(6-methoxypyridin-3-yl)-propansäure (**74a**) belegt und nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach AAV 33 reaktiv mit *tert*-Butyl-(*S*)-1-formyl-3-methylbutylcarbammat (**78**) nach AAV 38 gekuppelt. Das so gebildete Intermediat wurde nach AAV 37 mit TFA/DCM 1:1 vom Harz abgespalten und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen bzw. mit Toluol koevaporiert. Das freie Amin **79a** (1.16 mg, 0.20 mmol) wurde mit 53.0 mg (0.20 mmol) Isochinolin-OSu und 50.0 mg (0.59 mmol) NaHCO₃ nach AAV 1 zu der Zielverbindung umgesetzt. HPLC-Reinigung lieferte nach Lyophilisieren die Verbindung **80a** (0.55 mg, 41%) als weißen Feststoff. Die beiden Diastereomere wurden nicht getrennt.

HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 18.08 min; **ESI-MS**: m/z 1389.1 (20) [3M+K]⁺, 1373.9 (35) [3M+Na]⁺, 1351.1 (5) [3M+H]⁺, 939.4 (15) [2M+K]⁺, 923.2 (35) [2M+Na]⁺, 901.2 (30) [2M+H]⁺, 473.4 (35) [M+Na]⁺, 451.3 (100) [M+H]⁺, 433.5 (15) [M-OH]⁺.

3-((S)-2-(Isoquinolin-3-carboxamido)-4-methylpentylamino)-3-(6-methoxypyridin-2-yl)-propansäure (80b)

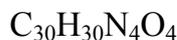
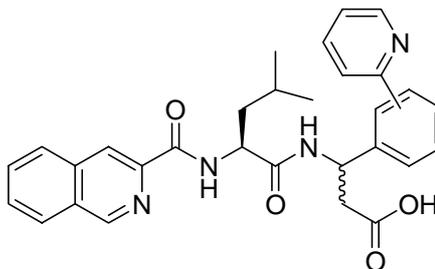


M: 450.23 g/mol

0.50 g TCP-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc-3-amino-3-(6-methoxypyridin-2-yl)-propansäure (**74b**) belegt und nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach AAV 33 reduktiv mit *tert*-Butyl-(*S*)-1-formyl-3-methylbutylcarbammat (**78**) nach AAV 38 gekuppelt. Das so gebildete Intermediat wurde nach AAV 37 mit TFA/DCM 1:1 vom Harz abgespalten und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen bzw. mit Toluol coevaporiert. Das freie Amin **79b** (1.16 mg, 0.20 mmol) wurde mit 53.0 mg (0.20 mmol) Isochinolin-OSu und 50.0 mg (0.59 mmol) NaHCO₃ nach AAV 1 zu der Zielverbindung umgesetzt. HPLC-Reinigung lieferte nach Lyophilisieren die Verbindung **80b** (0.55 mg, 41%) als weißen Feststoff. Die beiden Diastereomere wurden nicht getrennt.

HPLC (5-100% in 30 min): $R_t = 19.34$ min; **ESI-MS**: m/z 1389.1 (20) [3M+K]⁺, 1373.9 (35) [3M+Na]⁺, 1351.1 (5) [3M+H]⁺, 939.4 (15) [2M+K]⁺, 923.2 (35) [2M+Na]⁺, 901.2 (30) [2M+H]⁺, 473.4 (35) [M+Na]⁺, 451.3 (100) [M+H]⁺, 433.5 (15) [M-OH]⁺.

Isochinolin-Leu-(3-amino-3-((pyridin-2-yl)phenyl)-propansäure) (85)

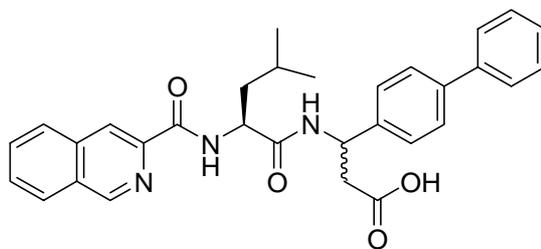


M: 510.23 g/mol

0.30 g Wang-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 32 mit *N*-Fmoc-3-amino-3-(bromphenyl)-propansäure (**82**) belegt und jeweils mit *N*-Fmoc-Leu-OH und Isochinolincarbonsäure nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Anschließend wurde die Synthese der Biaryle über eine *Suzuki*-Reaktion nach AAV 42 mit (Pyridin-2-yl)-boronsäure durchgeführt. Abspaltung vom Harz (AAV 37) und anschließende HPLC-Reinigung lieferte die Verbindungen **85a** (*ortho*: 36.7 mg, 40%) und **85b** (*meta*: 34.0 mg, 37%) als weiße Feststoffe. Die beiden Diastereomere wurden jeweils nicht getrennt.

HPLC_{*ortho*} (20-100% in 30 min): $R_t = 12.62$ min; **HPLC**_{*meta*} (5-100% in 30 min): $R_t = 12.43$ min; **ESI-MS**: m/z 1059.4 (20) $[2M+K]^+$, 1043.2 (60) $[2M+Na]^+$, 1021.2 (65) $[2M+H]^+$, 533.4 (10) $[M+Na]^+$, 511.2 (100) $[M+H]^+$.

Isochinolin-Leu-(3-amino-3-(4-(phenyl)phenyl)-propansäure) (**86**)



M: 509.23 g/mol

0.30 g Wang-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 32 mit *N*-Fmoc-3-amino-3-(4-bromphenyl)-propansäure (**82c**) belegt und jeweils mit *N*-Fmoc-Leu-OH und Isochinolincarbonsäure nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Anschließend wurde die Synthese der Biaryle über eine *Suzuki*-Reaktion nach AAV 42 mit Phenylboronsäure durchgeführt. Abspaltung vom Harz (AAV 37) und anschließende HPLC-Reinigung lieferte 73.3 mg (80%) der Verbindung **86** als weißen Feststoff. Die beiden Diastereomere konnten getrennt werden.

Diastereomer A:

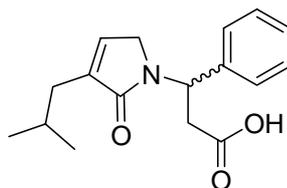
¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): $\delta = 1.05$ (d, 6H, $J = 8.5$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.77-1.83 (m, 3H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}-$), 2.89 (d, 2H, $J = 14.5$ Hz, $-\text{CH}_2\text{COOH}$), 4.82 (m, 1H, $-\text{NHCHCO}-$), 5.45 (m, 1H, $-\text{NHCHC}_{\text{Ar}}$), 7.28-7.58 (m, 9H, Ar-H₉), 7.77-7.90 (m, 2H, Ar-H₂), 8.08 (d, 1H, $J = 14.0$ Hz, Ar-H), 8.18 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz, Ar-H), 8.54 (s, 1H, Ar-H), 9.30 (s, 1H, Ar-H); **HPLC** (5-100% in 30 min): $R_t = 25.20$ min; **ESI-MS**: m/z 1566.5 (10) $[3M+K]^+$, 1550 (10) $[3M+Na]^+$, 1528.3 (10) $[3M+H]^+$, 1057.6 (10)

$[2M+K]^+$, 1041.4 (40) $[2M+Na]^+$, 1019.4 (45) $[2M+H]^+$, 532.5 (10) $[M+Na]^+$, 510.3 (100) $[M+H]^+$.

Diasereromer **B**:

1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): δ = 0.98 (ψ t, 6H, J = 4.5 Hz, $-CH(CH_3)_2$), 1.67-1.78 (m, 3H, $-CH(CH_3)_2$, $-CH_2CH-$), 2.86 (dd, 1H, J_1 = 16.0 Hz, J_2 = 7.0 Hz, $-CHHCOOH$), 2.94 (dd, 1H, J_1 = 16.0 Hz, J_2 = 8.0 Hz, $-CHHCOOH$), 4.80 (m, 1H, $-NHCHCO-$), 5.43 (t, 1H, J = 7.0 Hz, $-NHCHC_{Ar}$), 7.30-7.58 (m, 9H, Ar-H₉), 7.80 (t, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.86 (t, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 8.09 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 8.18 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 8.54 (s, 1H, Ar-H), 9.30 (s, 1H, Ar-H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 26.05 min; **ESI-MS**: m/z 1566.5 (10) $[3M+K]^+$, 1550 (10) $[3M+Na]^+$, 1528.3 (10) $[3M+H]^+$, 1057.6 (10) $[2M+K]^+$, 1041.4 (40) $[2M+Na]^+$, 1019.4 (45) $[2M+H]^+$, 532.5 (10) $[M+Na]^+$, 510.3 (100) $[M+H]^+$.

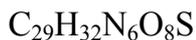
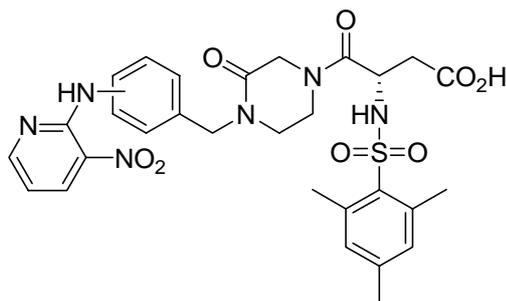
3-(3-Isobutyl-2-oxo-2H-pyrrol-1(5H)-yl)-3-phenylpropansäure (**92**)



M: 287.15 g/mol

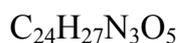
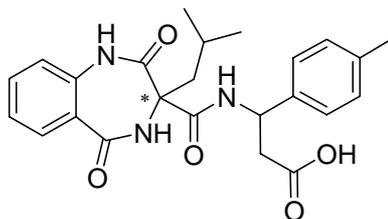
0.40 g TCP-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc- β -Phenylalanin belegt und nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach AAV 33 reduktiv mit *N,N*-Bis-(*tert*-butoxycarbonyl)-2-amino-2-(formylmethyl)-4-methylpentansäuremethylester (**91**) nach AAV 38 gekuppelt. Die Zyklisierung zu dem entsprechenden γ -Lactam erfolgt nach Waschen des Harzes mit DMF und DCM (3 x je 5 min) durch Zugabe einer 3 M Lösung von DIPEA in DMF bei 65°C über 12 Stunden. Das so gebildete Intermediat wurde nach AAV 37 mit TFA/DCM 1:1 vom Harz abgespalten und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen bzw. mit Toluol coevaporiert. Anschließende HPLC-Reinigung lieferte 20.7 mg (30%) der Verbindung **92** als weißen Feststoff.

HPLC (5-100% in 30 min): R_t = 19.15 min; **ESI-MS**: m/z 900.3 (40) $[3M+K]^+$, 613.4 (100) $[2M+K]^+$, 597.4 (30) $[2M+Na]^+$, 310.3 (15) $[M+Na]^+$, 288.2 (20) $[M+H]^+$.

Verbindung 115 ($\alpha_5\beta_1$ -Ligand)

0.25 g Wang-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 32 mit (9*H*-Fluoren-9-yl)methyl-(*S*)-3-(*tert*-butoxycarbonyl)-1-(4-(nitrobenzyl)-3-oxopiperazin-1-yl)-1-oxopropan-2-ylcarbammat (**113**) belegt. Der *tert*-Butylester der Ausgangsverbindung **113** wurde zuvor nach AAV 9 hydrolysiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Lyophilisieren konnte die freie Säure zur Belegung des Harzes verwendet werden. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe nach AAV 33 und anschließende Überführung des freienamins mit jeweils 5 Äquivalenten Mesitylsulfonsäurechlorid und DIPEA in Dichlormethan bei Raumtemperatur zum Sulfonamid wurde die Nitrogruppe mit einer 2 M Lösung von Zinn(II)-chlorid in DMF zum Anilin reduziert. Nukleophile, aromatische Substitution nach AAV 39 mit 2-Chlor-3-Nitropyridin lieferte nach Abspaltung vom Harz (AAV 37) und anschließender HPLC-Reinigung das TFA-Salz der Verbindung **115** (49.6 mg, 53%) als roten Feststoff. Nach jedem Schritt an der festen Phase wurde das Harz gewaschen (5 x je 3 min).

$^1\text{H-NMR}_{para}$ (500 MHz, CD_3OD): δ = 2.41-4.60 (m, 13H), 2.61 (s, 9H), 4.83 (t, 1H, J = 7.0 Hz), 5.67 und 5.94 (d, 1H, J = 6.5 Hz), 6.86 (m, 1H), 6.94 (s, 2H), 7.27-7.30 (m, 2H), 7.54-7.58 (m, 2H), 8.43 (d, 1H, J = 20.5 Hz), 8.53 (d, 1H, J = 4.0 Hz), 10.07 (d, 1H, J = 15.5 Hz); $\text{HPLC}_{meta, para}$ (5-100% in 30 min): R_t = 22.06 min für beide Regioisomere; **ESI-MS**: m/z 1873.9 (15) $[\text{3M+H}]^+$, 1249.1 (70) $[\text{2M+H}]^+$, 956.4 (5) $[(\text{3M+K})/2]^+$, 625.4 (100) $[\text{M+H}]^+$.

(2,3,4,5-Tetrahydro-3-isobutyl-2,5-dioxo-1H-benzo[e][1,4]diazepin-3-carbonylamido)- 3-para-tolylpropansäure (121)

M: 437.2 g/mol

0.25 g TCP-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc-3-amino-3-*para*-tolylpropansäure belegt und mit 2,3,4,5-Tetrahydro-3-isobutyl-2,5-dioxo-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-3-carbonsäure (**120**) nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Abspaltung vom Harz (AAV 37) und anschließende HPLC-Reinigung lieferte nach Lyophilisieren die Verbindung **121** (59.0 mg, 90%) als weißen Feststoff. Die beiden Diastereomere konnten getrennt werden.

Diastereomer A:

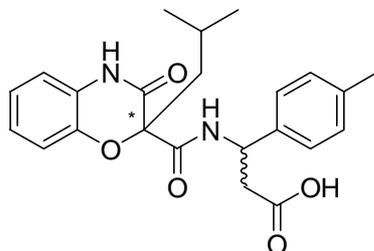
¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.75 (d, 3H, J = 6.0 Hz, -CH(CH₃)₂), 0.85 (d, 3H, J = 6.0 Hz, -CH(CH₃)₂), 1.65-1.72 (m, 2H, -CH(CH₃)₂, -CHHCH-), 2.21 (dd, 1H, J_1 = 13.5 Hz, J_2 = 3.5 Hz, -CHHCH-), 2.29-2.33 (m, 4H, -CH₃, -CHHCOOH), 2.38 (dd, 1H, J_1 = 16.0 Hz, J_2 = 8.0 Hz, -CHHCOOH), 4.91-4.93 (m, 1H, -NHCHC_{Ar}), 6.98 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.04-7.07 (m, 4H, Ar-H₄), 7.23 (t, 1H, J = 7.5 Hz, Ar-H), 7.46 (t, 1H, J = 7.5 Hz, Ar-H), 7.79 (d, 1H, J = 7.5 Hz, Ar-H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 16.00 min; **ESI-MS**: m/z 1350.4 (15) [3M+K]⁺, 1334.3 (65) [3M+Na]⁺, 1312.2 (15) [3M+H]⁺, 913.5 (30) [2M+K]⁺, 897.4 (100) [2M+Na]⁺, 875.4 (75) [2M+H]⁺, 676.2 (20) [(3M+K)/2]⁺, 460.5 (15) [M+Na]⁺, 438.3 (30) [M+H]⁺.

Diastereomer B:

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.76 (d, 3H, J = 6.5 Hz, -CH(CH₃)₂), 0.85 (d, 3H, J = 6.5 Hz, -CH(CH₃)₂), 1.65-1.74 (m, 2H, -CH(CH₃)₂, -CHHCH-), 2.21 (dd, 1H, J_1 = 14.0 Hz, J_2 = 4.5 Hz, -CHHCH-), 2.25-2.33 (m, 4H, -CH₃, -CHHCOOH), 2.37 (dd, 1H, J_1 = 24.0 Hz, J_2 = 8.5 Hz, -CHHCOOH), 4.91-4.94 (m, 1H, -NHCHC_{Ar}), 6.98 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.04-7.05 (m, 4H, Ar-H₄), 7.23 (t, 1H, J = 7.0 Hz, Ar-H), 7.46 (t, 1H, J = 7.0 Hz, Ar-H), 7.78 (d, 1H, J = 7.5 Hz, Ar-H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 16.41 min; **ESI-MS**: m/z 1350.4 (15) [3M+K]⁺, 1334.3 (65) [3M+Na]⁺,

1312.2 (15) $[3M+H]^+$, 913.5 (30) $[2M+K]^+$, 897.4 (100) $[2M+Na]^+$, 875.4 (75) $[2M+H]^+$, 676.2 (20) $[(3M+K)/2]^+$, 460.5 (15) $[M+Na]^+$, 438.3 (30) $[M+H]^+$.

3-(3,4-Dihydro-2-isobutyl-3-oxo-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-carbonylamido) - 3-*para*-tolylpropansäure (143)



M: 410.17 g/mol

0.25 g TCP-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc-3-amino-3-*para*-tolylpropansäure belegt und mit 3,4-Dihydro-2-isobutyl-3-oxo-2H-benzo[b][1,4]oxazin-2-carboxylsäure (**141**) nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Abspaltung vom Harz (AAV 37) und anschließende HPLC-Reinigung lieferte nach Lyophilisieren die Verbindung **143** (56.0 mg, 95%) als weißen Feststoff. Die beiden Diastereomere konnten getrennt werden.

Diastereomer A:

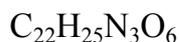
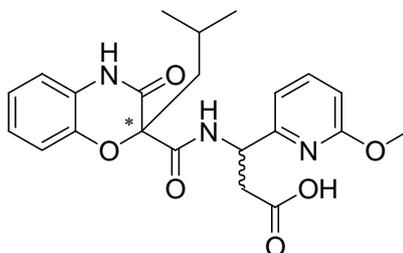
¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 1.00 (d, 3H, J = 6.5 Hz, -CH(CH₃)₂), 1.02 (d, 3H, J = 6.5 Hz, -CH(CH₃)₂), 2.00-2.08 (m, 2H, -CH(CH₃)₂, -CHHCH-), 2.18-2.22 (m, 1H, -CHHCH-), 2.22 (s, 3H, -CH₃), 2.75-2.84 (m, 2H, -CH₂COOH), 5.23 (t, 1H, J = 6.5 Hz, -NHCHC_{Ar}), 6.78 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ar-H₂), 6.84-6.86 (m, 1H, Ar-H), 6.91 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ar-H₂), 6.99-7.02 (m, 2H, Ar-H₂), 7.14-7.16 (m, 1H, Ar-H); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 21.05 min; **ESI-MS**: m/z 859.2 (25) $[2M+K]^+$, 843.1 (85) $[2M+Na]^+$, 635.4 (25) $[(3M+K)/2]^+$, 433.3 (15) $[M+Na]^+$, 411.2 (100) $[M+H]^+$.

Diastereomer B:

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 0.94 (sept, 6H, J = 5.0 Hz, -CH(CH₃)₂), 1.92-2.02 (m, 2H, -CH(CH₃)₂, -CHHCH-), 2.09 (dd, 1H, J_1 = 14.0 Hz, J_2 = 6.5 Hz, -CHHCH-), 2.29 (s, 3H, -CH₃), 2.64 (dd, 1H, J_1 = 16.0 Hz, J_2 = 6.5 Hz, -CHHCOOH), 2.72 (dd, 1H, J_1 = 16.0 Hz, J_2 = 6.5 Hz, -CHHCOOH), 5.19 (t, 1H, J = 6.5 Hz, -NHCHC_{Ar}), 6.86-6.88 (m, 2H, Ar-H₂), 6.96-7.00 (m, 2H, Ar-H₂), 7.09-7.11 (m, 2H, Ar-H₂), 7.17-7.18 (m, 2H, Ar-H₂); **HPLC** (5-100% in 30 min): R_t = 21.69 min; **ESI-MS**: m/z 859.2

(25) $[2M+K]^+$, 843.1 (85) $[2M+Na]^+$, 635.4 (25) $[(3M+K)/2]^+$, 433.3 (15) $[M+Na]^+$, 411.2 (100) $[M+H]^+$.

3-(3,4-Dihydro-2-isobutyl-3-oxo-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-carboxylamido)-3-(6-methoxypyridin-2-yl)-propansäure (144)

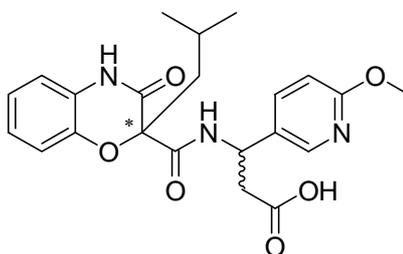


M: 427.17 g/mol

0.25 g TCP-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc-3-amino-3-(6-methoxypyridin-2-yl)-propansäure (**74b**) belegt und mit 3,4-Dihydro-2-isobutyl-3-oxo-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-carboxylsäure (**141**) nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Abspaltung vom Harz (AAV 37) und anschließende HPLC-Reinigung lieferte nach Lyophilisieren die Verbindung **144** (0.14 g, 90%) als weißen Feststoff. Die beiden Diastereomere wurden nicht getrennt.

HPLC (10-100% in 24 min): $R_t = 10.80$ min und 11.11 min; **ESI-MS**: m/z 1319.7 (5) $[3M+K]^+$, 1303.9 (40) $[3M+Na]^+$, 893.1 (5) $[2M+K]^+$, 878.2 (30) $[2M+Na]^+$, 855.3 (100) $[2M+H]^+$, 428.4 (45) $[M+H]^+$.

3-(3,4-Dihydro-2-isobutyl-3-oxo-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-carboxylamido)-3-(6-methoxypyridin-3-yl)-propansäure (145)



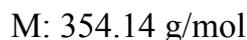
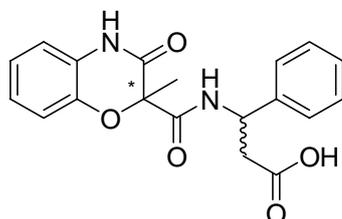
M: 427.17 g/mol

0.25 g TCP-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc-3-amino-3-(6-methoxypyridin-3-yl)-propansäure (**74a**) belegt und mit 3,4-Dihydro-2-isobutyl-3-oxo-

2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-carboxylsäure (**141**) nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Abspaltung vom Harz (AAV 37) und anschließende HPLC-Reinigung lieferte nach Lyophilisieren die Verbindung **145** (0.15 g, 92%) als weißen Feststoff. Die beiden Diastereomere wurden nicht getrennt.

HPLC (10-100% in 24 min): $R_t = 11.90$ min und 12.15 min; **ESI-MS**: m/z 1746.7 (20) [4M+K]⁺, 1731.0 (15) [4M+Na]⁺, 1319.7 (5) [3M+K]⁺, 1303.9 (40) [3M+Na]⁺, 893.1 (5) [2M+K]⁺, 878.2 (30) [2M+Na]⁺, 855.3 (100) [2M+H]⁺, 428.4 (45) [M+H]⁺.

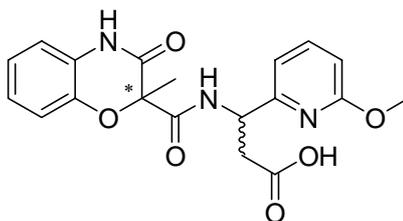
3-(3,4-Dihydro-2-methyl-3-oxo-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-carbonylamido)-3-phenylpropansäure (146**)**



0.25 g TCP-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc- β -Phenylalanin belegt und mit 3,4-Dihydro-2-methyl-3-oxo-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-carboxylsäure (**140**) nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Abspaltung vom Harz (AAV 37) und anschließende HPLC-Reinigung lieferte nach Lyophilisieren die Verbindung **146** (48.0 mg, 90%) als weißen Feststoff. Die beiden Diastereomere wurden nicht getrennt.

HPLC (10-100% in 24 min): $R_t = 17.35$ min; **ESI-MS**: m/z 1100.8 (10) [3M+K]⁺, 1084.6 (40) [3M+Na]⁺, 1083.5 (5) [3M+H]⁺, 747.0 (5) [2M+K]⁺, 731.0 (45) [2M+Na]⁺, 709.0 (5) [2M+H]⁺, 520.1 (65) [(3M+K)/2]⁺, 355.2 (35) [M+H]⁺.

3-(3,4-Dihydro-2-methyl-3-oxo-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-carboxylamido)-3-(6-methoxypyridin-2-yl)-propansäure (147)

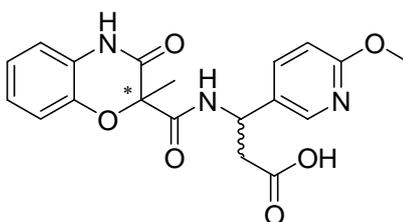


M: 385.13 g/mol

0.25 g TCP-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc-3-amino-3-(6-methoxypyridin-2-yl)-propansäure (**74b**) belegt und mit 3,4-Dihydro-2-methyl-3-oxo-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-carboxylsäure (**140**) nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Abspaltung vom Harz (AAV 37) und anschließende HPLC-Reinigung lieferte nach Lyophilisieren die Verbindung **147** (55.0 g, 95%) als weißen Feststoff. Die beiden Diastereomere wurden nicht getrennt.

HPLC (10-100% in 24 min): $R_t = 9.15$ min; **ESI-MS**: m/z 1578.5 (20) $[4\text{M}+\text{K}]^+$, 1562.8 (1) $[4\text{M}+\text{Na}]^+$, 1193.9 (30) $[3\text{M}+\text{K}]^+$, 1178.0 (45) $[3\text{M}+\text{Na}]^+$, 793.2 (30) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 771.3 (30) $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 386.5 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-(3,4-Dihydro-2-methyl-3-oxo-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-carboxylamido)-3-(6-methoxypyridin-2-yl)-propansäure (148)



M: 385.13 g/mol

0.25 g TCP-Harz (0.6 mmol/g) wurden nach AAV 31 mit *N*-Fmoc-3-amino-3-(6-methoxypyridin-3-yl)-propansäure (**74a**) belegt und mit 3,4-Dihydro-2-methyl-3-oxo-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazin-2-carboxylsäure (**140**) nach AAV 33 und AAV 34 gekuppelt. Abspaltung vom Harz (AAV 37) und anschließende HPLC-Reinigung lieferte nach

Lyophilisieren die Verbindung **148** (55.0 g, 95%) als weißen Feststoff. Die beiden Diastereomere wurden nicht getrennt.

HPLC (10-100% in 24 min): $R_t = 10.29$ min; **ESI-MS**: m/z 1578.5 (20) $[4M+K]^+$, 1562.8 (1) $[4M+Na]^+$, 1193.9 (30) $[3M+K]^+$, 1178.0 (45) $[3M+Na]^+$, 793.2 (30) $[2M+Na]^+$, 771.3 (30) $[2M+H]^+$, 386.5 (100) $[M+H]^+$.

7 Literatur

- (1) Fruton, J. S. *Proc. Am. Philos. Soc.* **1985**, *129*, 313.
- (2) Hruby, V. J.; Hadley, M. E. *Design and Synthesis of Organic Molecules Based on Molecular Recognition*; Springer-Verlag: Heidelberg, 1986.
- (3) Bonner, G. G.; Davis, P.; Stropova, D.; Ferguson, R.; Yamamura, H. I.; Porreca, F.; Hruby, V. J. *Peptides* **1997**, *18*, 93-100.
- (4) Toogood, P. L. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1543-1558.
- (5) Gadek, T. R.; McDowell, R. S. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 545-550.
- (6) Gadek, T. R.; Nicholas, J. B. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 1-8.
- (7) Berg, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2462-2481.
- (8) Giannis, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1244-1267.
- (9) Hirschmann, R.; Nicolaou, K. C.; Pietranico, S.; Leahy, E. M.; Salvino, J.; Arison, B.; Cichy, M. A.; Spoor, P. G.; Shakespeare, W. C.; Sprengeler, P. A.; Hamley, P.; Smith, A. B.; Reisine, T.; Raynor, K.; Maechler, L.; Donaldson, C.; Vale, W.; Freidinger, R. M.; Cascieri, M. R.; Strader, C. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12550-12568.
- (10) Gante, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1699-1720.
- (11) Yusuf-Makagiansar, H.; Anderson, M. E.; Yakovleva, T. V.; Murray, J. S.; Siahhan, T. J. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 146-167.
- (12) von Andrian, U. H.; Engelhardt, B. *New Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 68-72.
- (13) Gottschling, D.; Boer, J.; Schuster, A.; Holzmann, B.; Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3007-3011.
- (14) Gottschling, D.; Boer, J.; Marinelli, L.; Voll, G.; Haupt, M.; Schuster, A.; Holzmann, B.; Kessler, H. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 575-578.
- (15) Arkin, M. R.; Wells, J. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 301-317.
- (16) Ball, L. J.; Kühne, R.; Schneider-Mergener, J.; Oschkinat, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2852-2869.
- (17) Krieger, D. T. *Science* **1983**, *222*, 975-985.
- (18) Schmidt, G. *Top. Curr. Chem.* **1986**, *136*, 109-159.
- (19) Hruby, V. J.; Alobeidi, F.; Kazmierski, W. *Biochem. J.* **1990**, *268*, 249-262.
- (20) Rizo, J.; Gierasch, L. M. *Ann. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 387-418.
- (21) Jung, G.; Beck-Sickinger, A. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 367-383.
- (22) Hirschmann, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 1278-1301.
- (23) Wiley, R. A.; Rich, D. H. *Med. Res. Rev.* **1993**, *13*, 327-384.
- (24) Morgan, B. A.; Gainor, J. A. *Ann. Rep. Med. Chem.* **1989**, *24*, 243-252.
- (25) Hruby, V. J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 847-858.
- (26) Kessler, H. *Chimia* **1982**, *36*, 248-248.
- (27) Wüthrich, K.; Vonfreyberg, B.; Weber, C.; Wider, G.; Traber, R.; Widmer, H.; Braun, W. *Science* **1991**, *254*, 953-954.
- (28) Rossmann, M. G.; Morais, M. C.; Leiman, P. G.; Zhang, W. *Structure* **2005**, *13*, 355-362.
- (29) Veber, D. F.; Freidinger, R. M. *Trends Neurosci.* **1985**, *8*, 392-396.
- (30) Widdowson, K. L.; Elliott, J. D.; Veber, D. F.; Nie, H.; Rutledge, M. C.; McClelland, B. W.; Xiang, J.-N.; Jurewicz, A. J.; Hertzberg, R. P.; Foley, J. J.; Griswold, D. E.; Martin, L.; Lee, J. M.; White, J. R.; Sarau, H. M. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1319-1321.
- (31) Freidinger, R. M. *Trends Pharmacol. Sci.* **1989**, *10*, 270-274.
- (32) Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, *21*, 512-523.
- (33) Rose, G. D.; Gierasch, L. M.; Smith, J. A. *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 1-109.

- (34) Saudek, V.; Atkinson, R. A.; Pelton, J. T. *Biochemistry-Us* **1991**, *30*, 7369-7372.
- (35) Chorev, M. *Chim. Oggi* **2002**, *20*, 81-85.
- (36) Kaiser, E. T.; Kezdy, F. J. *Science* **1984**, *223*, 249-255.
- (37) Nakanishi, S.; Inoue, A.; Kita, T.; Nakamura, M.; Chang, A. C. Y.; Cohen, S. N.; Numa, S. *Nature* **1979**, *278*, 423-427.
- (38) Simon, E. J.; Hiller, J. M. In *Basic Neurochemistry*; Siegel, G. J.; Agranoff, B. W.; Albers, R. W.; Molinoff, P. B., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1989; 271.
- (39) Walters, W. P.; Murcko, A.; Murcko, M. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 384-387.
- (40) Sawada, G. A.; Barsuhn, C. L.; Lutzke, B. S.; Houghton, M. E.; Padbury, G. E.; Ho, N. F. H.; Raub, T. J. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.* **1999**, *288*, 1317-1326.
- (41) Hansch, C.; Maloney, P. P.; Fujita, T. *Nature* **1962**, *194*, 178-180.
- (42) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
- (43) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
- (44) Hebert, M. F. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **1997**, *27*, 201-214.
- (45) Navia, M. A.; Chaturvedi, P. R. *Drug Discov. Today* **1996**, *1*, 179-189.
- (46) Chan, O. H.; Stewart, B. H. *Drug Discov. Today* **1996**, *1*, 461-473.
- (47) Rishton, G. M. *Drug Discov. Today* **1997**, *2*, 382-384.
- (48) Pearlman, R. S.; Smith, K. M. *Perspect. Drug Discov.* **1998**, *9-11*, 339-353.
- (49) Bemis, G. W.; Murcko, M. A. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2887-2893.
- (50) Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 55-68.
- (51) Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615-2623.
- (52) Rees, D. C.; Congreve, M.; Murray, C. W.; Carr, R. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 660-672.
- (53) Böhm, H. J.; Klebe, G.; Kubinyi, H. *Wirkstoffdesign*; Spektrum Verlag: Heidelberg, 1996.
- (54) Rodi, D. J.; Makowski, L. *Curr. Opin. Biotech.* **1999**, *10*, 87-93.
- (55) Atherton, E.; Sheppard, R. C. *Solid Phase Peptide Synthesis- A Practical Approach*; IRL Press: Oxford, 1989.
- (56) Letsinger, L.; Mahadeva, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3526-3527.
- (57) Barany, G.; Kneib-Cordonier, N.; Mullen, D. G. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1987**, *30*, 705-739.
- (58) Houghten, R. A.; Pinilla, C.; Blondelle, S. E.; Appel, J. R.; Dooley, C. T.; Cuervo, J. H. *Nature* **1991**, *354*, 84-86.
- (59) Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp, R. J. *Nature* **1991**, *354*, 82-84.
- (60) Furka, A.; Sebestyen, F.; Asgedom, M.; Dibo, G. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487-493.
- (61) Dove, A. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 859-863.
- (62) Bunin, B. A.; Ellman, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10997-10998.
- (63) Bunin, B. A.; Plunkett, M. J.; Ellman, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4708-4712.
- (64) Booth, S.; Hermkens, P. H. H.; Ottenheijm, H. C. J.; Rees, D. C. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15385-15443.
- (65) Bräse, S. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 805-816.
- (66) Ziegert, R. E.; Toraeng, J.; Knepper, K.; Bräse, S. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 147-169.
- (67) James, I. W. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4855-4946.
- (68) Tao, Z. F.; Leitheiser, C. J.; Smith, K. L.; Hashimoto, S.; Hecht, S. M. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 426-434.

- (69) Smith, K. L.; Tao, Z. F.; Hashimoto, S.; Leitheiser, C. J.; Wu, X. H.; Hecht, S. M. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1079-1082.
- (70) Thutewohl, M.; Kissau, L.; Popkirova, B.; Karaguni, I. M.; Nowak, T.; Bate, M.; Kuhlmann, J.; Müller, O.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3616-3620.
- (71) Myers, A. G.; Lanman, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12969-12971.
- (72) Hynes, R. O. *Cell* **1987**, *48*, 549-554.
- (73) Hynes, R. O. *Cell* **1992**, *69*, 11-25.
- (74) Yamada, K. M.; Geiger, B. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 76-85.
- (75) Williams, A. F.; Barclay, A. N. *Annu. Rev. Immunol.* **1988**, *6*, 381-405.
- (76) Lasky, L. A. *J. Cell. Biochem.* **1991**, *45*, 139-146.
- (77) Lasky, L. A. *Science* **1992**, *258*, 964-969.
- (78) Takeichi, M. *Science* **1991**, *251*, 1451-1455.
- (79) Shapiro, L.; Fannon, A. M.; Kwong, P. D.; Thompson, A.; Lehmann, M. S.; Grubel, G.; Legrand, J. F.; Alsniesen, J.; Colman, D. R.; Hendrickson, W. A. *Nature* **1995**, *374*, 327-337.
- (80) Fazleabas, A. T.; Kim, J. J. *Science* **2003**, *299*, 355-356.
- (81) Curley, G. P.; Blum, H.; Humphries, M. J. *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, *56*, 427-441.
- (82) Haubner, R.; Finsinger, D.; Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1375-1389.
- (83) Jin, H.; Varner, J. *Brit. J. Cancer* **2004**, *90*, 561-565.
- (84) Arroyo, A. G.; Yang, J. T.; Rayburn, H.; Hynes, R. O. *Immunity* **1999**, *11*, 555-566.
- (85) Bray, P. F. *Thromb. Haemostasis* **1999**, *82*, 337-344.
- (86) Scarborough, R. M.; Gretler, D. D. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3453-3473.
- (87) Giblin, P. A.; Kelly, T. A. *Ann. Rep. Med. Chem.* **2001**, *36*, 181-190.
- (88) Varner, J. A.; Cheresch, D. A. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 724-730.
- (89) Hynes, R. O. *Cell* **2002**, *110*, 673-687.
- (90) Porter, J. C.; Hogg, N. *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 390-396.
- (91) Green, L. J.; Mould, A. P.; Humphries, M. J. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1998**, *30*, 179-184.
- (92) Emsley, J.; Knight, C. G.; Farndale, R. W.; Barnes, M. J.; Liddington, R. C. *Cell* **2000**, *101*, 47-56.
- (93) Williams, M. J.; Hugjes, P. E.; Ginsberg, M. H. *Trends Cell Biol.* **1994**, *4*, 109.
- (94) Haas, T. A.; Plow, E. F. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6017-6026.
- (95) Xiong, J. P.; Stehle, T.; Diefenbach, B.; Zhang, R. G.; Dunker, R.; Scott, D. L.; Joachimiak, A.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. *Science* **2001**, *294*, 339-345.
- (96) Xiong, J. P.; Stehle, T.; Zhang, R. G.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. *Science* **2002**, *296*, 151-155.
- (97) Xiao, T.; Takagi, J.; Collier, B. S.; Wang, J. H.; Springer, T. A. *Nature* **2004**, *432*, 59-67.
- (98) Horwitz, A.; Duggan, K.; Buck, C.; Beckerle, M. C.; BurrIDGE, K. *Nature* **1986**, *320*, 531-533.
- (99) Otey, C. A.; Pavalko, F. M.; BurrIDGE, K. *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 721-729.
- (100) Pavalko, F. M.; Laroche, S. M. *J. Immunol.* **1993**, *151*, 3795-3807.
- (101) Giancotti, F. G.; Ruoslahti, E. *Science* **1999**, *285*, 1028-1032.
- (102) DeMali, K. A.; Wennerberg, K.; BurrIDGE, K. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 572-582.
- (103) Grashoff, C.; Thievensen, I.; Lorenz, K.; Ussar, S.; Faessler, R. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**, *16*, 565-571.
- (104) Adair, B. D.; Xiong, J.-P.; Maddock, C.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A.; Yeager, M. J. *Cell Biol.* **2005**, *168*, 1109-1118.
- (105) Humphries, M. J. *Biochem. Soc. T.* **2000**, *28*, 311-340.

- (106) Weisel, J. W.; Nagaswami, C.; Vilaire, G.; Bennett, J. S. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16637-16643.
- (107) Michishita, M.; Videm, V.; Arnaout, M. A. *Cell* **1993**, *72*, 857-867.
- (108) Shimaoka, M.; Springer, T. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 703-716.
- (109) Lee, J. O.; Rieu, P.; Arnaout, M. A.; Liddington, R. *Cell* **1995**, *80*, 631-638.
- (110) Arnaout, M. A.; Goodman, S. L.; Xiong, J. P. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 641-651.
- (111) Smith, J. W.; Ruggeri, Z. M.; Kunicki, T. J.; Cheresh, D. A. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 12267-12271.
- (112) Tidswell, M.; Pachynski, R.; Wu, S. W.; Qiu, S. Q.; Dunham, E.; Cochran, N.; Briskin, M. J.; Kilshaw, P. J.; Lazarovits, A. I.; Andrew, D. P.; Butcher, E. C.; Yednock, T. A.; Erle, D. J. *J. Immunol.* **1997**, *159*, 1497-1505.
- (113) Chen, L. L.; Lobb, R. R.; Cuervo, J. H.; Lin, K. C.; Adams, S. P.; Pepinsky, R. B. *Biochemistry* **1998**, *37*, 8743-8753.
- (114) Bella, J.; Berman, H. M. *Structure* **2000**, *8*, R121-R126.
- (115) Gould, R. J.; Polokoff, M. A.; Friedman, P. A.; Huang, T. F.; Holt, J. C.; Cook, J. J.; Niewiarowski, S. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1990**, *195*, 168-171.
- (116) Reddy, V. B.; Kouna, K.; Mariano, F.; Lerner, E. A. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 15861-15867.
- (117) Jones, E. Y.; Harlos, K.; Bottomley, M. J.; Robinson, R. C.; Driscoll, P. C.; Edwards, R. M.; Clements, J. M.; Dudgeon, T. J.; Stuart, D. I. *Nature* **1995**, *373*, 539-544.
- (118) Leahy, D. J.; Aukhil, I.; Erickson, H. P. *Cell* **1996**, *84*, 155-164.
- (119) Bella, J.; Kolatkar, P. R.; Marlor, C. W.; Greve, J. M.; Rossmann, M. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 4140-4145.
- (120) Plow, E. F.; Haas, T. K.; Zhang, L.; Loftus, J.; Smith, J. W. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785-21788.
- (121) Gottschalk, K. E.; Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3767-3774.
- (122) Hu, D. D.; Barbas, C. F.; Smith, J. W. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 21745-21751.
- (123) Onley, D. J.; Knight, C. G.; Tuckwell, D. S.; Barnes, M. J.; Farndale, R. W. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 24560-24564.
- (124) Brekken, R. A.; Sage, E. H. *Matrix Biol.* **2000**, *19*, 569-580.
- (125) Schaffner, P.; Dard, M. M. *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 119-132.
- (126) Kato, A. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **1997**, *26*, 1-23.
- (127) Rosenkranz, A. R.; Mayadas, T. N. *Exp. Nephrol.* **1999**, *7*, 125-136.
- (128) Jackson, D. Y. *Curr. Pharm. Design* **2002**, *8*, 1229-1253.
- (129) Noseworthy, J. H.; Kirkpatrick, P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 101-102.
- (130) Grabovsky, V.; Feigelson, S.; Chen, C.; Bleijs, D. A.; Peled, A.; Cinamon, G.; Baleux, F.; Arenzana-Seisdedos, F.; Lapidot, T.; van Kooyk, Y.; Lobb, R. R.; Alon, R. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 495-505.
- (131) Shamri, R.; Grabovsky, V.; Feigelson, S. W.; Dwir, O.; van Kooyk, Y.; Alon, R. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40027-40035.
- (132) Kucik, D. F.; Dustin, M. L.; Miller, J. M.; Brown, E. J. *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 2139-2144.
- (133) Gottschalk, K. E.; Günther, R.; Kessler, H. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 470-473.
- (134) Takagi, J.; Petre, B. M.; Walz, T.; Springer, T. A. *Cell* **2002**, *110*, 599-611.
- (135) Liu, C.; Takagi, J.; Springer, T. A. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 14642.
- (136) Lu, C. F.; Takagi, J.; Springer, T. A. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 14642-14648.
- (137) Arnaout, M. A. *Immunol. Rev.* **2002**, *186*, 125-140.
- (138) Mould, A. P.; Garratt, A. N.; Puzon-McLaughlin, W.; Takada, Y.; Humphries, M. J. *Biochem. J.* **1998**, *331*, 821-828.

- (139) Tsuchida, J.; Ueki, S.; Takada, Y.; Saito, Y.; Takagi, J. *J. Cell Sci.* **1998**, *111*, 1759-1766.
- (140) Foster, C. A. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1996**, *98*, 270.
- (141) Cinamon, G.; Shinder, V.; Alon, R. *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 515-522.
- (142) Dwir, O.; Kansas, G. S.; Alon, R. *J. Cell Biol.* **2001**, *155*, 145-156.
- (143) Hughes, P. E.; Pfaff, M. *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 359-364.
- (144) Laudanna, C.; Campbell, J. J.; Butcher, E. C. *Science* **1996**, *271*, 981-983.
- (145) Tanaka, Y.; Minami, Y.; Mine, S.; Hirano, H.; Hu, C. D.; Fujimoto, H.; Fujii, K.; Saito, K.; Tsukada, J.; van Kooyk, Y.; Figdor, C. G.; Kataoka, T.; Eto, S. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 6209-6216.
- (146) Chen, C.; Mobley, J. L.; Dwir, O.; Shimron, F.; Grabovsky, V.; Lobb, R. R.; Shimizu, Y.; Alon, R. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 1084-1095.
- (147) Tilley, J. W. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2002**, *12*, 991-1008.
- (148) Kilger, G.; Holzmann, B. *J. Mol. Med.-Jmm.* **1995**, *73*, 347-354.
- (149) Hemler, M. E.; Huang, C.; Takada, Y.; Schwarz, L.; Strominger, J. L.; Clabby, M. L. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 11478-11485.
- (150) Williams, D. A.; Rios, M.; Stephens, C.; Patel, V. P. *Nature* **1991**, *352*, 438-441.
- (151) Humphries, M. J.; Akiyama, S. K.; Komoriya, A.; Olden, K.; Yamada, K. M. *J. Cell Biol.* **1986**, *103*, 2637-2647.
- (152) Humphries, M. J.; Akiyama, S. K.; Komoriya, A.; Olden, K.; Yamada, K. M. *J. Cell Biol.* **1988**, *106*, 1289-1297.
- (153) Osborn, L.; Hession, C.; Tizard, R.; Vassallo, C.; Luhowskyj, S.; Chirosso, G.; Lobb, R. *Cell* **1989**, *59*, 1203-1211.
- (154) Elices, M. J.; Osborn, L.; Takada, Y.; Crouse, C.; Luhowskyj, S.; Hemler, M. E.; Lobb, R. R. *Cell* **1990**, *60*, 577-584.
- (155) Campanero, M. R.; Pulido, R.; Ursa, M. A.; Rodríguez-Moya, M.; de Landázuri, M. O.; Sánchez-Madrid, F. *J. Cell Biol.* **1990**, *110*, 2157-2165.
- (156) Muñoz, M.; Serrador, J.; Sánchez-Madrid, F.; Teixidó, J. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 2696-2702.
- (157) Bayless, K. J.; Davis, G. E. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 13483-13489.
- (158) Dustin, M. L.; Olive, D.; Springer, T. A. *J. Exp. Med.* **1989**, *169*, 503-517.
- (159) Pepinsky, R. B.; Chen, L. L.; Meier, W.; Wallner, B. P. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 18244-18249.
- (160) Shimizu, Y.; Varsevter, G. A.; Horgan, K. J.; Shaw, S. *Nature* **1990**, *345*, 250-253.
- (161) Chan, B. M. C.; Wong, J. G. P.; Rao, A.; Hemler, M. E. *J. Immunol.* **1991**, *147*, 398-404.
- (162) Erle, D. J.; Briskin, M. J.; Butcher, E. C.; Garciapardo, A.; Lazarovits, A. I.; Tidswell, M. *J. Immunol.* **1994**, *153*, 517-528.
- (163) Wagner, N.; Lohler, J.; Kunkel, E. J.; Ley, K.; Leung, E.; Krissansen, G.; Rajewsky, K.; Müller, W. *Nature* **1996**, *382*, 366-370.
- (164) Bayless, K. J.; Meininger, G. A.; Scholtz, J. M.; Davis, G. E. *J. Cell Sci.* **1998**, *111*, 1165-1174.
- (165) Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E. *Nature* **1984**, *309*, 30-33.
- (166) Komoriya, A.; Green, L. J.; Mervic, M.; Yamada, S. S.; Yamada, K. M.; Humphries, M. J. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 15075-15079.
- (167) Springer, T. A. *Cell* **1994**, *76*, 301-314.
- (168) Conner, E. M.; Eppihimer, M. J.; Morise, Z.; Granger, D. N.; Grisham, M. B. *J. Leucocyte Biol.* **1999**, *65*, 349-355.
- (169) Nakache, M.; Berg, E. L.; Streeter, P. R.; Butcher, E. C. *Nature* **1989**, *337*, 179-181.
- (170) Berlin, C.; Berg, E. L.; Briskin, M. J.; Andrew, D. P.; Kilshaw, P. J.; Holzmann, B.; Weissman, I. L.; Hamann, A.; Butcher, E. C. *Cell* **1993**, *74*, 185-195.

- (171) Osborn, L.; Vassallo, C.; Benjamin, C. D. *J. Exp. Med.* **1992**, *176*, 99-107.
- (172) Viney, J. L.; Jones, S.; Chiu, H. H.; Lagrimas, B.; Renz, M. E.; Presta, L. G.; Jackson, D.; Hillan, K. J.; Lew, S.; Fong, S. *J. Immunol.* **1996**, *157*, 2488-2497.
- (173) Briskin, M. J.; Rott, L.; Butcher, E. C. *J. Immunol.* **1996**, *156*, 719-726.
- (174) Tan, K.; Casanovas, J. M.; Liu, J. H.; Briskin, M. J.; Springer, T. A.; Wang, J. H. *Structure* **1998**, *6*, 793-801.
- (175) Dando, J.; Wilkinson, K. W.; Ortlepp, S.; King, D. J.; Brady, R. L. *Acta Cryst. D* **2002**, *58*, 233-241.
- (176) Clements, J. M.; Newham, P.; Shepherd, M.; Gilbert, R.; Dudgeon, T. J.; Needham, L. A.; Edwards, R. M.; Berry, L.; Brass, A.; Humphries, M. J. *J. Cell. Sci.* **1994**, *107* (Pt 8), 2127-2135.
- (177) Siegel, G.; Malmsten, M. *Int. J. Microcirc.* **1997**, *17*, 257-272.
- (178) Schnapp, L. M. *Mt. Sinai J. Med.* **1998**, *65*, 224-231.
- (179) Malissen, B. *Science* **1999**, *285*, 207-208.
- (180) Butcher, E. C.; Picker, L. J. *Science* **1996**, *272*, 60-66.
- (181) Bourke, E.; Moynagh, P. N. *J. Immunol.* **1999**, *163*, 2113-2119.
- (182) Mori, N.; Horie, Y.; Gerritsen, M. E.; Anderson, D. C.; Granger, D. N. *Gut* **1999**, *44*, 186-195.
- (183) Cox, M. T.; Heaton, D. W.; Horbury, J. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1980**, 799-800.
- (184) Fitzgerald, G. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 1025-1025.
- (185) Drazen, J. M.; Israel, E.; O'Byrne, P. M. *New Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 197-206.
- (186) Feldmann, M.; Charles, P.; Taylor, P.; Maini, R. N. *Springer Semin. Immun.* **1998**, *20*, 211-228.
- (187) Miller, D. H.; Khan, O. A.; Sheremata, W. A.; Blumhardt, L. D.; Rice, G. P. A.; Libonati, M. A.; Willmer-Hulme, A. J.; Dalton, C. M.; Miszkiel, K. A.; O'Connor, P. W.; Sclerosis, I. N. M. *New Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 15-23.
- (188) Ghosh, S.; Goldin, E.; Gordon, F. H.; Malchow, H. A.; Rask-Madsen, J.; Rutgeerts, P.; Vyhnalek, P.; Zadorova, Z.; Palmer, T.; Donoghue, S.; Grp, N. P.-E. S. *New Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 24-32.
- (189) Tilly, J. W.; Sidduri, A. *Drug Future* **2001**, *26*, 985-998.
- (190) Vanderslice, P.; Biediger, R. J.; Woodside, D. G.; Berens, K. L.; Holland, G. W.; Dixon, R. A. F. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **2004**, *17*, 1-10.
- (191) Brandtzaeg, P.; Haraldsen, G.; Helgeland, L.; Nilsen, E. M.; Rugtveit, J. *Drugs Today* **1999**, *35*, 33-70.
- (192) Drillenbug, P.; van der Voort, R.; Koopman, G.; Dragosics, B.; van Krieken, J. H.; Kluin, P.; Meenan, J.; Lazarovits, A. I.; Radaszkiewicz, T.; Pals, S. T. *Am. J. Pathol.* **1997**, *150*, 919-927.
- (193) Holzmann, B.; Gossler, U.; Bittner, M. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1998**, *231*, 125-141.
- (194) Wayner, E. A.; Kovach, N. L. *J. Cell Biol.* **1992**, *116*, 489-497.
- (195) Bochner, B. S.; Luscinikas, F. W.; Gimbrone, M. A.; Newman, W.; Sterbinsky, S. A.; Derseanthy, C. P.; Klunk, D.; Schleimer, R. P. *J. Exp. Med.* **1991**, *173*, 1553-1556.
- (196) Vanderslice, P.; Ren, K. J.; Revelle, J. K.; Kim, D. C.; Scott, D.; Bjercke, R. J.; Yeh, E. T. H.; Beck, P. J.; Kogan, T. P. *J. Immunol.* **1997**, *158*, 1710-1718.
- (197) Dutta, A. S.; Crowther, M.; Gormley, J. J.; Hassall, L.; Hayward, C. F.; Gellert, P. R.; Kittlety, R. S.; Alcock, P. J.; Jamieson, A.; Moores, J. M.; Rees, A.; Wood, L. J.; Reilly, C. F.; Haworth, D. *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 321-341.
- (198) Dutta, A. S.; Gormley, J. J.; Coath, M.; Hassall, L.; Hayward, C. F.; Gellert, P. R.; Kittlety, R. S.; Alcock, P. J.; Ferguson, R.; Halterman, T.; Jamieson, A.; Moors, J. A.; Moores, J. M.; Rees, A.; Wood, L. J.; Reilly, C. F.; Haworth, D. *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 398-412.

- (199) Nowlin, D. M.; Gorcsan, F.; Moscinski, M.; Chiang, S. L.; Lobl, T. J.; Cardarelli, P. *M. J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 20352-20359.
- (200) Jackson, D. Y.; Quan, C.; Artis, D. R.; Rawson, T.; Blackburn, B.; Struble, M.; Fitzgerald, G.; Chan, K.; Mullins, S.; Burnier, J. P.; Fairbrother, W. J.; Clark, K.; Berisini, M.; Chui, H.; Renz, M.; Jones, S.; Fong, S. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3359-3368.
- (201) Fotouhi, N.; Joshi, P.; Fry, D.; Cook, C.; Tilley, J. W.; Kaplan, G.; Hanglow, A.; Rowan, K.; Schwinge, V.; Wolitzky, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1171-1173.
- (202) Fotouhi, N.; Joshi, P.; Tilley, J. W.; Rowan, K.; Schwinge, V.; Wolitzky, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1167-1169.
- (203) Singh, S. B.; Zink, D. L.; Liesch, J. M.; Mosley, R. T.; Dombrowski, A. W.; Bills, G. F.; Darkin-Rattray, S. J.; Schmatz, D. M.; Goetz, M. A. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 815-825.
- (204) Singh, J.; van Vlijmen, H.; Liao, Y. S.; Lee, W. C.; Cornebise, M.; Harris, M.; Shu, I. H.; Gill, A.; Cuervo, J. H.; Abraham, W. M.; Adams, S. P. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2988-2993.
- (205) Singh, J.; Adams, S.; Carter, M. B.; Cuervo, H.; Lee, W. C.; Lobb, R. R.; Pepinsky, R. B.; Petter, R.; Scott, D. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1497-1507.
- (206) Yang, G. X.; Hagmann, W. K. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 369-392.
- (207) Tilley, J. W.; Sidduri, A. *Drug Future* **2001**, *26*, 985-998.
- (208) Tilley, J. W.; Chen, L.; Sidduri, A.; Fotouhi, N. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1509-1523.
- (209) Hagmann, W. K. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1461-1471.
- (210) Shroff, H. N.; Schwender, C. F.; Dottavio, D.; Yang, L. L.; Briskin, M. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2495-2500.
- (211) Shroff, H. N.; Schwender, C. F.; Baxter, A. D.; Brookfield, F.; Payne, L. J.; Cochran, N. A.; Gallant, D. L.; Briskin, M. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1601-1606.
- (212) Lin, K.-C.; Castro, A. C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 453-457.
- (213) Chen, L.; Tilley, J. W.; Guthrie, R. W.; Mennona, F.; Huang, T. N.; Kaplan, G.; Trilles, R.; Miklowski, D.; Huby, N.; Schwinge, V.; Wolitzky, B.; Rowan, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 729-733.
- (214) Hagmann, W. K.; Durette, P. L.; Lanza, T.; Kevin, N. J.; de Laszlo, S. E.; Kopka, H. E.; Young, D.; Magriotis, P. A.; Li, B.; Lin, L. S.; Yang, G.; Kamenecka, T.; Chang, L. L.; Wilson, J.; MacCoss, M.; Mills, S. G.; Van Riper, G.; McCauley, E.; Egger, L. A.; Kidambi, U.; Lyons, K.; Vincent, S.; Stearns, R.; Colletti, A.; Teffera, J.; Tong, S.; Fenyk-Melody, J.; Owens, K.; Levorse, D.; Kim, P.; Schmidt, J. A.; Mumford, R. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2709-2713.
- (215) Payne, J. W.; Marshall, N. J.; Grail, B. M.; Gupta, S. *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 1221-1246.
- (216) Hruby, V. J.; Balse, P. M. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 945-970.
- (217) Davidson, J. P.; Lubman, O.; Rose, T.; Waksman, G.; Martin, S. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 205-215.
- (218) Gilon, C.; Mang, C.; Lohof, E.; Friedler, A.; Kessler, H. In *Houben-Weyl: Methods of Organic Chemistry*; Goodman, M.; Felix, A.; Moroder, L.; Toniolo, C., Eds.; Thieme Verlag: Stuttgart, New York, 2003; Vol. E 22b, pp 461-542.
- (219) Freidinger, R. M. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5553-5566.
- (220) Matter, H.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3347-3359.
- (221) Bisang, C.; Weber, C.; Robinson, J. A. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1825-1842.
- (222) Balaram, H.; Uma, K.; Balaram, P. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1990**, *35*, 495-500.
- (223) Hutchinson, E. G.; Thornton, J. M. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 2207-2216.

- (224) Souers, A. J.; Ellman, J. A. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7431-7448.
- (225) Kee, K. S.; Jois, S. D. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 1209-1224.
- (226) Cluzeau, J.; Lubell, W. D. *Biopolymers* **2005**, *80*, 98-150.
- (227) Veber, D. F.; Holly, F. W.; Nutt, R. F.; Bergstrand, S. J.; Brady, S. F.; Hirschmann, R.; Glitzer, M. S.; Saperstein, R. *Nature* **1979**, *280*, 512-514.
- (228) Rew, Y.; Malkmus, S.; Svensson, C.; Yaksh, T. L.; Chung, N. N.; Schiller, P. W.; Cassel, J. A.; DeHaven, R. N.; Taulane, J. P.; Goodman, M. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5414-5414.
- (229) Fasan, R.; Dias, R. L. A.; Moehle, K.; Zerbe, O.; Vrijbloed, J. W.; Obrecht, D.; Robinson, J. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2109-2112.
- (230) Malicka, J.; Czaplewski, C.; Groth, M.; Wicz, W.; Oldziej, S.; Lankiewicz, L.; Ciarkowski, J.; Liwo, A. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 123-133.
- (231) Hirschmann, R.; Sprengeler, P. A.; Kawasaki, T.; Leahy, J. W.; Shakespeare, W. C.; Smith, A. B. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3665-3676.
- (232) Hirschmann, R.; Hynes, J.; Cichy-Knight, M. A.; van Rijn, R. D.; Sprengeler, P. A.; Spoons, P. G.; Shakespeare, W. C.; Pietranico-Cole, S.; Barbosa, J.; Liu, J.; Yao, W. Q.; Rohrer, S.; Smith, A. B. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1382-1391.
- (233) Le, G. T.; Abbenante, G.; Becker, B.; Grathwohl, M.; Halliday, J.; Tometzki, G.; Zuegg, J.; Meutermans, W. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 701-709.
- (234) Nicolaou, K. C.; Trujillo, J. I.; Chibale, K. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 8751-8778.
- (235) Wermuth, J.; Goodman, S. L.; Jonczyk, A.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1328-1335.
- (236) Ohkanda, J.; Lockman, J. W.; Kothare, M. A.; Qian, Y. M.; Blaskovich, M. A.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 177-188.
- (237) Gibson, C.; Sulyok, G. A. G.; Hahn, D.; Goodman, S. L.; Hölzemann, G.; Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 165-169.
- (238) Ramakrishnan, C.; Rao, B. N. N. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1980**, *15*, 81-95.
- (239) Mierke, D. F.; Kurz, M.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1042-1049.
- (240) Gurrath, M.; Müller, G.; Kessler, H.; Aumailley, M.; Timpl, R. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911-921.
- (241) Kessler, H.; Gratias, R.; Hessler, G.; Gurrath, M.; Müller, G. *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1201-1205.
- (242) Boer, J.; Gottschling, D.; Schuster, A.; Semmrich, M.; Holzmann, B.; Kessler, H. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2586-2592.
- (243) Boer, J.; Gottschling, D.; Schuster, A.; Holzmann, B.; Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3870-+.
- (244) Locardi, E.; Boer, J.; Modlinger, A.; Schuster, A.; Holzmann, B.; Kessler, H. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5752-5762.
- (245) Rockwell, A.; Melden, M.; Copeland, R. A.; Hardman, K.; Decicco, C. P.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10337-10338.
- (246) Sulyok, G. A. G.; Gibson, C.; Goodman, S. L.; Hölzemann, G.; Wiesner, M.; Kessler, H. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1938-1950.
- (247) McDowell, R. S.; Gadek, T. R.; Barker, P. L.; Burdick, D. J.; Chan, K. S.; Quan, C. L.; Skelton, N.; Struble, M.; Thorsett, E. D.; Tischler, M.; Tom, J. Y. K.; Webb, T. R.; Burnier, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5069-5076.
- (248) Blackburn, B. K.; Lee, A.; Baier, M.; Kohl, B.; Olivero, A. G.; Matamoros, R.; Robarge, K. D.; McDowell, R. S. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 717-729.
- (249) Fisher, M. J.; Gunn, B.; Harms, C. S.; Kline, A. D.; Mullaney, J. T.; Nunes, A.; Scarborough, R. M.; Arfsten, A. E.; Skelton, M. A.; Um, S. L.; Utterback, B. G.; Jakubowski, J. A. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2085-2101.
- (250) Greenspoon, N.; Hershkovich, R.; Alon, R.; Varon, D.; Shenkman, B.; Marx, G.; Federman, S.; Kapustina, G.; Lider, O. *Biochemistry-US* **1993**, *32*, 1001-1008.

- (251) Fields, G. B.; Noble, R. L. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1990**, *35*, 161-214.
- (252) Krchnak, V.; Smith, J.; Vagner, J. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1627-1630.
- (253) Smith, J. M.; Krchnak, V. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7633-7636.
- (254) Han, S.-Y.; Kim, Y.-A. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.
- (255) Radionov, W. J. A. C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1929**, *51*, 847-852.
- (256) Uchida, T.; Matsumoto, K. *Synthesis-Stuttgart* **1976**, 209-239.
- (257) Swinbourne, F. T.; Hunt, J. H.; Klinkert, K. *Advances in Heterocyclic Chemistry*; Academic Press: New York, 1978; Vol. 32.
- (258) Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1968**, *7*, 321-328.
- (259) Huisgen, R. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 403-419.
- (260) Huisgen, R.; Temme, R. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 387-401.
- (261) Goff, D. A. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8741-8745.
- (262) Druta, I. I.; Andrei, M. A.; Ganj, C. I.; Aburel, P. S. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 13063-13070.
- (263) Durst, T.; Finke, J. A.; Huisgen, R.; Temme, R. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2363-2382.
- (264) Molina, P.; Fresneda, P. M.; Lajara, M. C. *J. Heterocyclic Chem.* **1985**, *22*, 113-119.
- (265) Sliwa, W. *Heterocycles* **1986**, *24*, 181-219.
- (266) Hu, Y.; Hu, H. *Synth. Comm.* **1992**, *22*, 1491-1496.
- (267) Wei, X.; Hu, Y.; Li, T.; Hu, H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1993**, 2487.
- (268) Hoemann, M. Z.; Melikian-Badalian, A.; Kumaravel, G.; Hauske, J. R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4749-4752.
- (269) Kolasa, T.; Miller, M. J. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4978-4984.
- (270) Hunter, T. *Cell* **2000**, *100*, 113-127.
- (271) Bridges, A. J. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2541-2571.
- (272) Shawver, L. K.; Slamon, D.; Ullrich, A. *Cancer Cell* **2002**, *1*, 117-123.
- (273) Grosios, K.; Traxler, P. *Drug Future* **2003**, *28*, 679-697.
- (274) Noble, M. E. M.; Endicott, J. A.; Johnson, L. N. *Science* **2004**, *303*, 1800-1805.
- (275) Zhang, Z. Y. *Annu. Rev. Pharmacol.* **2002**, *42*, 209-234.
- (276) Bialy, L.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3814-3839.
- (277) Lyon, M. A.; Ducruet, A. P.; Wipf, P.; Lazo, J. S. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 961-976.
- (278) van Huijsduijnen, R. H.; Bombrun, A.; Swinnen, D. *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, 1013-1019.
- (279) Liu, G. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1407-1421.
- (280) Elchebly, M.; Payette, P.; Michaliszyn, E.; Cromlish, W.; Collins, S.; Loy, A. L.; Normandin, D.; Cheng, A.; Himms-Hagen, J.; Chan, C. C.; Ramachandran, C.; Gresser, M. J.; Tremblay, M. L.; Kennedy, B. P. *Science* **1999**, *283*, 1544-1548.
- (281) Klamann, L. D.; Boss, O.; Peroni, O. D.; Kim, J. K.; Martino, J. L.; Zabolotny, J. M.; Moghal, N.; Lubkin, M.; Kim, Y. B.; Sharpe, A. H.; Stricker-Krongrad, A.; Shulman, G. I.; Neel, B. G.; Kahn, B. B. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 5479-5489.
- (282) Johnson, T. O.; Ermolieff, J.; Jirousek, M. R. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 696-709.
- (283) DeVinney, I.; Steele-Mortimer, I.; Finlay, B. B. *Trends Microbiol.* **2000**, *8*, 29-33.
- (284) Koul, A.; Choidas, A.; Treder, M.; Tyagi, A. K.; Drlica, K.; Singh, Y.; Ullrich, A. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 5425-5432.
- (285) Obaya, A. J.; Sedivy, J. M. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 126-142.
- (286) Galaktionov, K.; Lee, A. K.; Eckstein, J.; Draetta, G.; Meckler, J.; Loda, M.; Beach, D. *Science* **1995**, *269*, 1575-1577.
- (287) Dixon, D.; Moyana, T.; King, M. J. *Exp. Cell Res.* **1998**, *240*, 236-243.
- (288) Alonso, A.; Saxena, M.; Williams, S.; Mustelin, T. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 4766-4771.

- (289) Todd, J. L.; Rigas, J. D.; Rafty, L. A.; Denu, J. M. *Oncogene* **2002**, *21*, 2573-2583.
- (290) Hamaguchi, T.; Masuda, A.; Morino, T.; Osada, H. *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 279-286.
- (291) Takai, A.; Mieskes, G. *Biochem. J.* **1991**, *275 (Pt 1)*, 233-239.
- (292) Barford, D.; Flint, A. J.; Tonks, N. K. *Science* **1994**, *263*, 1397-1404.
- (293) Pannifer, A. D. B.; Flint, A. J.; Tonks, N. K.; Barford, D. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 10454-10462.
- (294) Katz, A. H.; Demerson, C. A.; Shaw, C. C.; Asselin, A. A.; Humber, L. G.; Conway, K. M.; Gavin, G.; Guinosso, C.; Jensen, N. P.; Mobilio, D.; Noureldin, R.; Schmid, J.; Shah, U.; Vanengen, D.; Chau, T. T.; Weichman, B. M. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1244-1250.
- (295) Lanzilotti, A. E.; Littell, R.; Fanshawe, W. J.; McKenzie, T. C.; Lovell, F. M. J. *Org. Chem.* **1979**, *44*, 4809-4813.
- (296) Schloemer, G. C.; Greenhouse, R.; Muchowski, J. M. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5230-5234.
- (297) Greenhouse, R.; Ramirez, C.; Muchowski, J. M. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2961-2965.
- (298) Lainton, J. A. H.; Huffman, J. W.; Martin, B. R.; Compton, D. R. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1401-1404.
- (299) Kimbaris, A.; Varvounis, G. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9675-9682.
- (300) Baciocchi, E.; Muraglia, E.; Sleiter, G. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2486-2490.
- (301) Baciocchi, E.; Muraglia, E.; Sleiter, G. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6817-6820.
- (302) Davies, S. G.; Ichihara, O. *Tetrahedron-Asymm.* **1991**, *2*, 183-186.
- (303) Bull, S. D.; Davies, S. G.; Smith, A. D. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, 2931-2938.
- (304) Bianco, A.; Passacantilli, P.; Righi, G. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1405-1408.
- (305) Zhong, H. M.; Cohen, J. H.; Abdel-Magid, A. F.; Kenney, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D.; Villani, F. J.; Zhang, F.; Zhang, X. N. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7721-7725.
- (306) Cohen, J. H.; Abdel-Magid, A. F.; Almond, H. R.; Maryanoff, C. A. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1977-1981.
- (307) Yasuda, N.; Hsiao, Y.; Jensen, M. S.; Rivera, N. R.; Yang, C. H.; Wells, K. M.; Yau, J.; Palucki, M.; Tan, L. S.; Dormer, P. G.; Volante, R. P.; Hughes, D. L.; Reider, P. J. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1959-1966.
- (308) Bull, S. D.; Davies, S. G.; Fox, D. J.; Gianotti, M.; Kelly, P. M.; Pierres, C.; Savory, E. D.; Smith, A. D. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2002**, 1858-1868.
- (309) Comins, D. L.; Killpack, M. O. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 104-109.
- (310) Comins, D. L.; Killpack, M. O. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 69-73.
- (311) Szelke, M.; Leckie, B.; Hallett, A.; Jones, D. M.; Sueiras, J.; Atrash, B.; Lever, A. F. *Nature* **1982**, *299*, 555-557.
- (312) Krchnak, V.; Weichsel, A. S.; Cabel, D.; Flegelova, Z.; Lebl, M. *Molecular Diversity* **1996**, *1*, 149-164.
- (313) Hou, D.-R.; Reibenspies, J. H.; Burgess, K. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 206-215.
- (314) Hajduk, P. J.; Bures, M.; Praestgaard, J.; Fesik, S. W. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3443-3447.
- (315) Miyaura, N.; Suzuki, A. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1979**, 866-867.
- (316) Miyaura, N.; Yano, T.; Suzuki, A. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 2865-2868.
- (317) Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483.
- (318) Shen, W. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5575-5578.
- (319) Littke, A. F.; Fu, G. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3387-3388.
- (320) Inada, K.; Miyaura, N. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8657-8660.
- (321) Inada, K.; Miyaura, N. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8661-8664.
- (322) LeBlond, C. R.; Andrews, A. T.; Sun, Y. K.; Sowa, J. R. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1555-1557.

- (323) Saito, S.; Ohtani, S.; Miyaura, N. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8024-8030.
- (324) Indolese, A. F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3513-3516.
- (325) Frenette, R.; Friesen, R. W. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9177-9180.
- (326) Ruhland, B.; Bombrun, A.; Gallop, M. A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7820-7826.
- (327) Fraley, M. E.; Rubino, R. S. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3365-3368.
- (328) Gardner, R. R.; Liang, G. B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3280-3281.
- (329) Wipf, P.; Henninger, T. C.; Geib, S. J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6088-6089.
- (330) Vasbinder, M. M.; Jarvo, E. R.; Miller, S. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2824-2827.
- (331) Gardner, R. R.; Liang, G. B.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1806-1816.
- (332) Boros, L. G.; Decorte, B.; Gimi, R. H.; Welch, J. T.; Wu, Y.; Handschumacher, R. E. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6033-6036.
- (333) Hart, S. A.; Sabat, M.; Etzkorn, F. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7580-7581.
- (334) Hart, S. A.; Trindle, C. O.; Etzkorn, F. A. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1789-1791.
- (335) Fischer, G. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 119-127.
- (336) Schiene-Fischer, C.; Fischer, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6227-6231.
- (337) Hann, M. M.; Sammes, P. G.; Kennewell, P. D.; Taylor, J. B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1982**, 307-314.
- (338) Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1351-1354.
- (339) Spaltenstein, A.; Carpino, P. A.; Miyake, F.; Hopkins, P. B. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3759-3766.
- (340) Grubbs, R. H.; Miller, S. J.; Fu, G. C. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 446-452.
- (341) Grubbs, R. H.; Chang, S. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4413-4450.
- (342) Katz, T. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3010-3019.
- (343) Reichwein, J. F.; Versluis, C.; Liskamp, R. M. J. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 6187-6195.
- (344) Reichwein, J. F.; Liskamp, R. M. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2335-2344.
- (345) Boruah, A.; Rao, I. N.; Nandy, J. P.; Kumar, S. K.; Kunwar, A. C.; Iqbal, J. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 10199-10199.
- (346) Waid, P. P.; Flynn, G. A.; Huber, E. W.; Sabol, J. S. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4091-4094.
- (347) Cuny, G. D.; Cao, J. R.; Hauske, J. R. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5237-5240.
- (348) Chatterjee, A. K.; Grubbs, R. H. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1751-1753.
- (349) Conde-Frieboes, K.; Andersen, S.; Breinholt, J. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9153-9156.
- (350) Freidinger, R. M.; Perlow, D. S.; Veber, D. F. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 104-109.
- (351) Garvey, D. S.; May, P. D.; Nadzan, A. M. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 936-940.
- (352) Yanagisawa, H.; Ishihara, S.; Ando, A.; Kanazaki, T.; Miyamoto, S.; Koike, H.; Iijima, Y.; Oizumi, K.; Matsushita, Y.; Hata, T. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1984-1991.
- (353) Sukumaran, D. K.; Prorok, M.; Lawrence, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 706-707.
- (354) Flynn, G. A.; Burkholder, T. P.; Huber, E. W.; Bey, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*, 309-312.
- (355) Flynn, G. A.; Giroux, E. L.; Dage, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7914-7915.
- (356) Son, J.-K.; Rosazza, J. P. N.; Duffel, M. W. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1848-1851.
- (357) Genin, M. J.; Ojala, W. H.; Gleason, W. B.; Johnson, R. L. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2334-2337.
- (358) Genin, M. J.; Gleason, W. B.; Johnson, R. L. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 860-866.
- (359) Khalil, E. M.; Ojala, W. H.; Pradhan, A.; Nair, V. D.; Gleason, W. B.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 628-637.

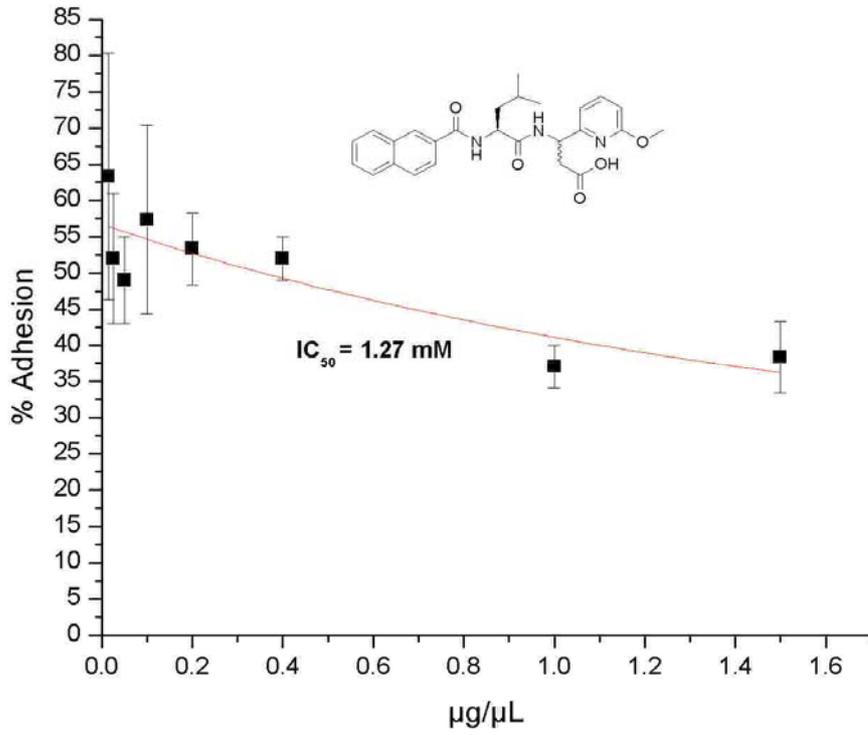
- (360) Belvisi, L.; Bernardi, A.; Manzoni, L.; Potenza, D.; Scolastico, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2563-2569.
- (361) Thaisrivongs, S.; Pals, D. T.; Turner, S. R.; Kroll, L. T. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1369-1376.
- (362) Smith, A. B.; Favor, D. A.; Sprengeler, P. A.; Guzman, M. C.; Carroll, P. J.; Furst, G. T.; Hirschmann, R. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 9-22.
- (363) Genin, M. J.; Johnson, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8778-8783.
- (364) Gunnarsson, K.; Grehn, L.; Ragnarsson, U. *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 411-412.
- (365) DiMaio, J.; Belleau, B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1989**, 1687-1689.
- (366) Duorish, C. T.; Clark, M. L.; Hawley, D.; Williams, B. J.; Iversen, S. D. *Regul. Pept.* **1988**, *22*, 58.
- (367) Kitamura, S.; Fukushi, H.; Miyawaki, T.; Kawamura, M.; Konishi, N.; Terashita, Z.; Naka, T. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2438-2450.
- (368) Piró, J.; Rubiralta, M.; Giralt, E.; Diez, A. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 871-873.
- (369) Seibel, J.; Brown, D.; Amour, A.; Macdonald, S. J.; Oldham, N. J.; Schofield, C. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 387-389.
- (370) Gosain, R.; Norrish, A. M.; Wood, M. E. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1399-1410.
- (371) Keenan, R. M.; Miller, W. H.; Barton, L. S.; Bondinell, W. E.; Cousins, R. D.; Eppley, D. F.; Hwang, S. M.; Kwon, C.; Lago, M. A.; Nguyen, T. T.; Smith, B. R.; Uzinskas, I. N.; Yuan, C. C. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1801-1806.
- (372) Miller, W. H.; Alberts, D. P.; Bhatnagar, P. K.; Bondinell, W. E.; Callahan, J. F.; Calvo, R. R.; Cousins, R. D.; Erhard, K. F.; Heerding, D. A.; Keenan, R. M.; Kwon, C.; Manley, P. J.; Newlander, K. A.; Ross, S. T.; Samanen, J. M.; Uzinskas, I. N.; Venslavsky, J. W.; Yuan, C. C. K.; Haltiwanger, R. C.; Gowen, M.; Hwang, S. M.; James, I. E.; Lark, M. W.; Rieman, D. J.; Stroup, G. B.; Azzarano, L. M.; Salyers, K. L.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Johanson, K. O.; Huffman, W. F. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 22-26.
- (373) Xue, C. B.; Wityak, J.; Sielecki, T. M.; Pinto, D. J.; Batt, D. G.; Cain, G. A.; Sworin, M.; Rockwell, A. L.; Roderick, J. J.; Wang, S. G.; Orwat, M. J.; Fietze, W. E.; Bostrom, L. L.; Liu, J.; Higley, C. A.; Rankin, F. W.; Tobin, A. E.; Emmett, G.; Lalka, G. K.; Sze, J. Y.; DiMeo, S. V.; Mousa, S. A.; Thoolen, M. J.; Racanelli, A. L.; Hausner, E. A.; Reilly, T. M.; DeGrado, W. F.; Wexler, R. R.; Olson, R. E. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2064-2084.
- (374) Olson, R. E.; Sielecki, T. M.; Wityak, J.; Pinto, D. J.; Batt, D. G.; Fietze, W. E.; Liu, J.; Tobin, A. E.; Orwat, M. J.; DiMeo, S. V.; Houghton, G. C.; Lalka, G. K.; Mousa, S. A.; Racanelli, A. L.; Hausner, E. A.; Kapil, R. P.; Rabel, H. R.; Thoolen, M. J.; Reilly, T. M.; Anderson, P. S.; Wexler, R. R. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1178-1192.
- (375) Pitts, W. J.; Wityak, J.; Smallheer, J. M.; Tobin, A. E.; Jetter, J. W.; Buynitsky, J. S.; Harlow, P. P.; Solomon, K. A.; Corjay, M. H.; Mousa, S. A.; Wexler, R. R.; Jadhav, P. K. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 27-40.
- (376) Tomkinson, N. C. O.; Sefler, A. M.; Plunket, K. D.; Blanchard, S. G.; Parks, D. J.; Willson, T. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2491-2496.
- (377) Sarges, R.; Lyga, J. W. *J. Heterocyclic Chem.* **1988**, *25*, 1475-1479.
- (378) Mehrotra, M. M.; Heath, J. A.; Rose, J. W.; Smyth, M. S.; Seroogy, J.; Volkots, D. L.; Ruhter, G.; Schotten, T.; Alaimo, L.; Park, G.; Pandey, A.; Scarborough, R. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1103-1107.
- (379) Scarborough, R. M.; Kleiman, N. S.; Phillips, D. R. *Circulation* **1999**, *100*, 437-444.
- (380) McDowell, R. S.; Blackburn, B. K.; Gadek, T. R.; McGee, L. R.; Rawson, T.; Reynolds, M. E.; Robarge, K. D.; Somers, T. C.; Thorsett, E. D.; Tischler, M.; Webb, R. R.; Venuti, M. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5077-5083.

- (381) Ku, T. W.; Miller, W. H.; Bondinell, W. E.; Erhard, K. F.; Keenan, R. M.; Nichols, A. J.; Peishoff, C. E.; Samanen, J. M.; Wong, A. S.; Huffman, W. F. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 9-12.
- (382) Samanen, J. M.; Ali, F. E.; Barton, L. S.; Bondinell, W. E.; Burgess, J. L.; Callahan, J. F.; Calvo, R. R.; Chen, W. T.; Chen, L. C.; Erhard, K.; Feuerstein, G.; Heys, R.; Hwang, S. M.; Jakas, D. R.; Keenan, R. M.; Ku, T. W.; Kwon, C.; Lee, C. P.; Miller, W. H.; Newlander, K. A.; Nichols, A.; Parker, M.; Peishoff, C. E.; Rhodes, G.; Ross, S.; Shu, A.; Simpson, R.; Takata, D.; Yellin, T. O.; Uzsinskas, I.; Venslavsky, J. W.; Yuan, C. K.; Huffman, W. F. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4867-4870.
- (383) Davis, H. M.; Hwang, S. M.; Freed, M. I. *Blood* **1997**, *90*, 1322-1322.
- (384) Wong, A.; Hwang, S. M.; Johanson, K.; Samanen, J.; Bennett, D.; Landvatter, S. W.; Chen, W. T.; Heys, J. R.; Ali, F. E.; Ku, T. W.; Bondinell, W.; Nichols, A. J.; Powers, D. A.; Stadel, J. M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *285*, 228-235.
- (385) Fisher, M. J.; Arfstan, A. E.; Giese, U.; Gunn, B. P.; Harms, C. S.; Khau, V.; Kinnick, M. D.; Lindstrom, T. D.; Martinelli, M. J.; Mest, H. J.; Mohr, M.; Morin, J. M.; Mullaney, J. T.; Nunes, A.; Paal, M.; Rapp, A.; Ruhter, G.; Ruterbories, K. J.; Sall, D. J.; Scarborough, R. M.; Schotten, T.; Sommer, B.; Stenzel, W.; Towner, R. D.; Um, S. L.; Utterback, B. G.; Vasileff, R. T.; Vöelkers, S.; Wyss, V. L.; Jakubowski, J. A. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4875-4889.
- (386) Fisher, M. J.; Giese, U.; Harms, C. S.; Kinnick, M. D.; Lindstrom, T. D.; McCowan, J. R.; Mest, H. J.; Morin, J. M.; Mullaney, J. T.; Paal, M.; Rapp, A.; Ruhter, G.; Ruterbories, K. J.; Sall, D. J.; Scarborough, R. M.; Schotten, T.; Stenzel, W.; Towner, R. D.; Um, S. L.; Utterback, B. G.; Wyss, V. L.; Jakubowski, J. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 385-389.
- (387) Tilley, J. W.; Kaplan, G.; Rowan, K.; Schwinge, V.; Wolitzky, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1-4.
- (388) Chen, L.; Tilley, J.; Trilles, R. V.; Yun, W. Y.; Fry, D.; Cook, C.; Rowan, K.; Schwinge, V.; Campbell, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 137-140.
- (389) Harriman, G. C. B.; Schwender, C. F.; Gallant, D.; Cochran, N. A.; Briskin, M. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1497-1499.
- (390) Lin, L. S.; Kopka, I. E.; Mumford, R. A.; Magriotis, P. A.; Lanza, T.; Durette, P. L.; Kamenecka, T.; Young, D. N.; de Laszlo, S. E.; McCauley, E.; Van Riper, G.; Kidambi, U.; Egger, L. A.; Tong, X. C.; Lyons, K.; Vincent, S.; Stearns, R.; Colletti, A.; Teffera, Y.; Fenyk-Melody, J.; Schmidt, J. A.; MacCoss, M.; Hagmann, W. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1695-1695.
- (391) Kopka, I. E.; Young, D. N.; Lin, L. S.; Mumford, R. A.; Magriotis, P. A.; MacCoss, M.; Mills, S. G.; Van Riper, G.; McCauley, E.; Egger, L. E.; Kidambi, U.; Schmidt, J. A.; Lyons, K.; Stearns, R.; Vincent, S.; Colletti, A.; Wang, Z.; Tong, S.; Wang, J. Y.; Zheng, S.; Owens, K.; Levorse, D.; Hagmann, W. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 637-640.
- (392) Chang, L. L.; Truong, Q.; Mumford, R. A.; Egger, L. A.; Kidambi, U.; Lyons, K.; McCauley, E.; Van Riper, G.; Vincent, S.; Schmidt, J. A.; MacCoss, M.; Hagmann, W. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 159-163.
- (393) Lin, L. S.; Lanza, T.; McCauley, E.; Van Riper, G.; Kidambi, U.; Cao, J.; Egger, L. A.; Mumford, R. A.; Schmidt, J. A.; MacCoss, M.; Hagmann, W. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 133-136.
- (394) Huryn, D. M.; Konradi, A. W.; Ashwell, S.; Freedman, S. B.; Lombardo, L. J.; Pleiss, M. A.; Thorsett, E. D.; Yednock, T.; Kennedy, J. D. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1473-1484.

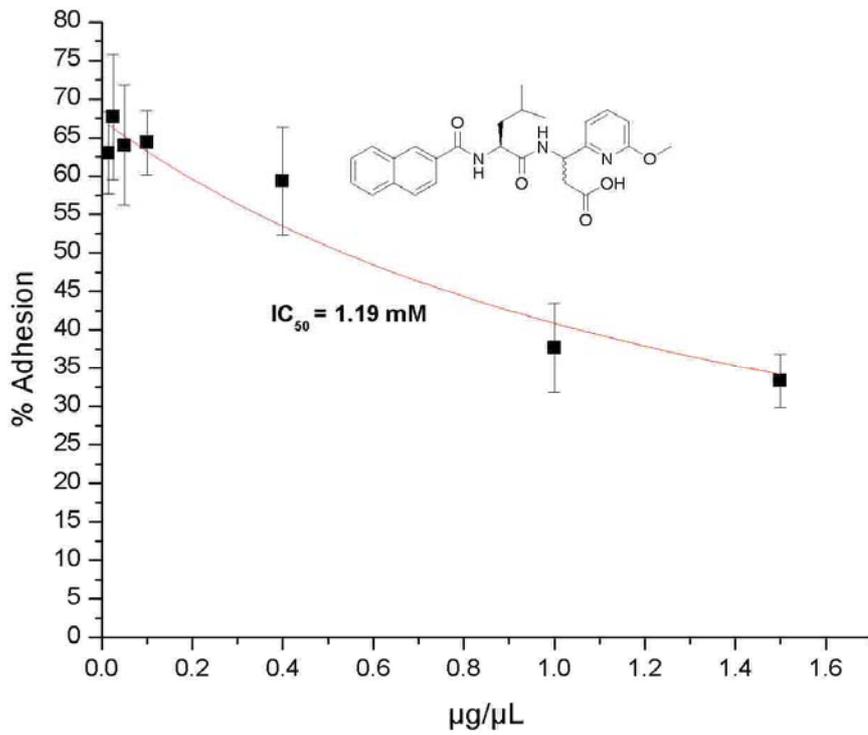
- (395) Sidduri, A.; Tilley, J. W.; Hull, K.; Lou, J. P.; Kaplan, G.; Sheffron, A.; Chen, L.; Campbell, R.; Guthrie, R.; Huang, T. N.; Huby, N.; Rowan, K.; Schwinge, V.; Renzetti, L. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2475-2478.
- (396) Sidduri, A.; Tilley, J. W.; Lou, J. P.; Chen, L.; Kaplan, G.; Mennona, F.; Campbell, R.; Guthrie, R.; Huang, T. N.; Rowan, K.; Schwinge, V.; Renzetti, L. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2479-2482.
- (397) Williams, R. M.; Im, M. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9276-9286.
- (398) Tenbrink, R. E. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 418-422.
- (399) Norman, B. H.; Kroin, J. S. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4151-4154.
- (400) Norman, B. H.; Kroin, J. S. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4990-4998.
- (401) Arndt, H. D.; Ziemer, B.; Koert, U. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3269-3272.
- (402) Bourlot, A. S.; Sánchez, I.; Dureng, G.; Guillaumet, G.; Massingham, R.; Monteil, A.; Winslow, E.; Pujol, M. D.; Mérour, J. Y. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3142-3158.
- (403) Dudley, D. A.; Bunker, A. M.; Chi, L. G.; Cody, W. L.; Holland, D. R.; Ignasiak, D. P.; Janiczek-Dolphin, N.; McClanahan, T. B.; Mertz, T. E.; Narasimhan, L. S.; Rapundalo, S. T.; Trautschold, J. A.; Van Huis, C. A.; Edmunds, J. J. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4063-4070.
- (404) Caliendo, G.; Perissutti, E.; Santagada, V.; Fiorino, F.; Severino, B.; Bianca, R. D. D.; Lippolis, L.; Pinto, A.; Sorrentino, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2663-2669.
- (405) Huang, W. R.; Zhang, P. L.; Zuckett, J. F.; Wang, L. Y.; Woolfrey, J.; Song, Y. H.; Jia, Z. Z. J.; Clizbe, L. A.; Su, T.; Tran, K.; Huang, B.; Wong, P.; Sinha, U.; Park, G.; Reed, A.; Malinowski, J.; Hollenbach, S. J.; Scarborough, R. M.; Zhu, B. Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 561-566.
- (406) Rybczynski, P. J.; Zeck, R. E.; Combs, D. W.; Turchi, I.; Burris, T. P.; Xu, J. Z.; Yang, M.; Demarest, K. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2359-2362.
- (407) Rybczynski, P. J.; Zeck, R. E.; Dudash, J.; Combs, D. W.; Burris, T. P.; Yang, M.; Osborne, M. C.; Chen, X. L.; Demarest, K. T. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 196-209.
- (408) Sastry, C. V. R.; Rao, K. S.; Krishnan, V. S. H.; Rastogi, K.; Jain, M. L.; Verma, R. K.; Tripathi, R. M.; Singh, P. P.; Rao, C. S.; Kaushal, R. *Indian J. Chem. B* **1989**, *28*, 882-884.
- (409) Tawada, H.; Sugiyama, Y.; Ikeda, H.; Yamamoto, Y.; Meguro, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 1238-1245.
- (410) Kajino, M.; Shibouta, Y.; Nishikawa, K.; Meguro, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 2896-2905.
- (411) Kikelj, D.; Suhadolc, E.; Urleb, U.; Zbontar, U. *J. Heterocyclic Chem.* **1993**, *30*, 597-602.
- (412) Rutar, A.; Kikelj, D. *Synth. Comm.* **1998**, *28*, 2737-2749.
- (413) Breznik, M.; Hrast, V.; Mrcina, A.; Kikelj, D. *Tetrahedron-Asymm.* **1999**, *10*, 153-167.
- (414) Bartsch, H.; Neubauer, G. *Sci. Pharm.* **1985**, *53*, 111.
- (415) Dallacrose, P.; Ferraccioli, R.; Larosa, C. *Heterocycles* **1995**, *40*, 349-355.
- (416) Moustafa, H. M. *Phosphorus Sulfur* **2001**, *175*, 129-142.
- (417) Štefanič, P.; Breznik, M.; Lah, N.; Leban, I.; Plavec, J.; Kikelj, D. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5295-5297.
- (418) Štefanič, P.; Turnšek, K.; Kikelj, D. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 7123-7129.
- (419) Schuster, M. C.; Mann, D. A.; Buchholz, T. J.; Johnson, K. M.; Thomas, W. D.; Kiessling, L. L. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1407-1410.
- (420) Armstrong, A.; Brackenridge, I.; Jackson, R. F. W.; Kirk, J. M. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2483-2486.
- (421) Babudri, F.; Di Nunno, L.; Florio, S. *Tetrahedron* **1982**, *38*, 3059-3065.
- (422) Dellaria, J. F.; Santarsiero, B. D. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3916-3926.

- (423) Remuzon, P.; Soumeillant, M.; Dussy, C.; Bouzard, D. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 17711-17726.
- (424) Rand, L.; Albinak, M. J. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 1837-1837.
- (425) Miller, J. M.; So, K. H.; Clark, J. H. *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1887-1889.
- (426) Clark, J. H.; Miller, J. M. *Tetrahedron Lett.* **1977**, 599-602.
- (427) Arrault, A.; Touzeau, F.; Guillaumet, G.; Leger, J. M.; Jarry, C.; Merour, J. Y. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8145-8152.
- (428) Ghose, A. K.; Crippen, G. M. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **1987**, *27*, 21-35.
- (429) Cardillo, G.; Gentilucci, L.; Tolomelli, A.; Tomasini, C. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2351-2353.
- (430) Blaskovich, M. A.; Lajoie, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5021-5030.
- (431) Genin, M. J.; Johnson, R. L. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1992**, *203*, 91-Medi.
- (432) Blankemeyer-Menge, B.; Nimtz, M.; Frank, R. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1701-1704.

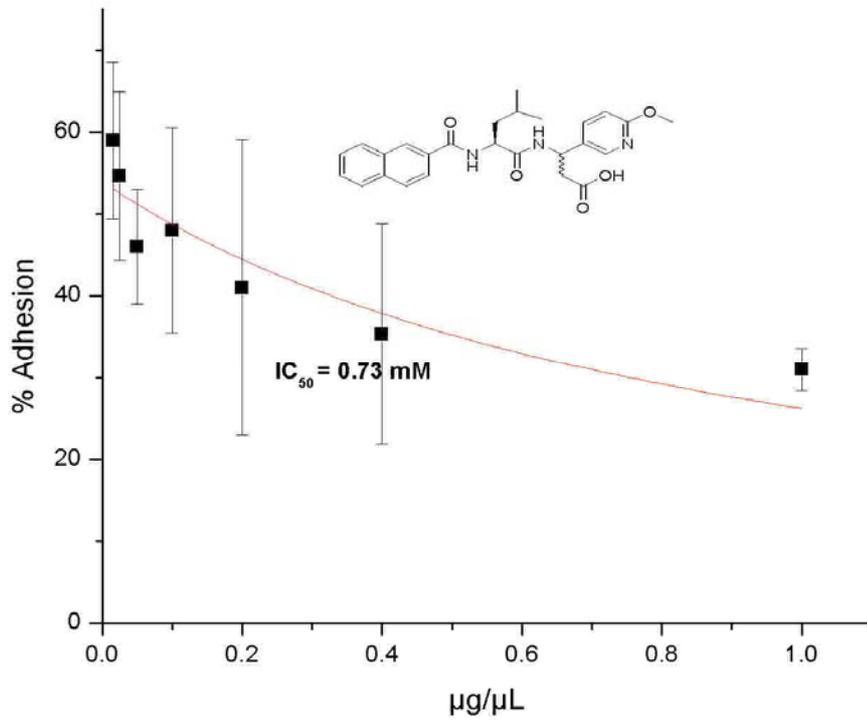
8 Anhang



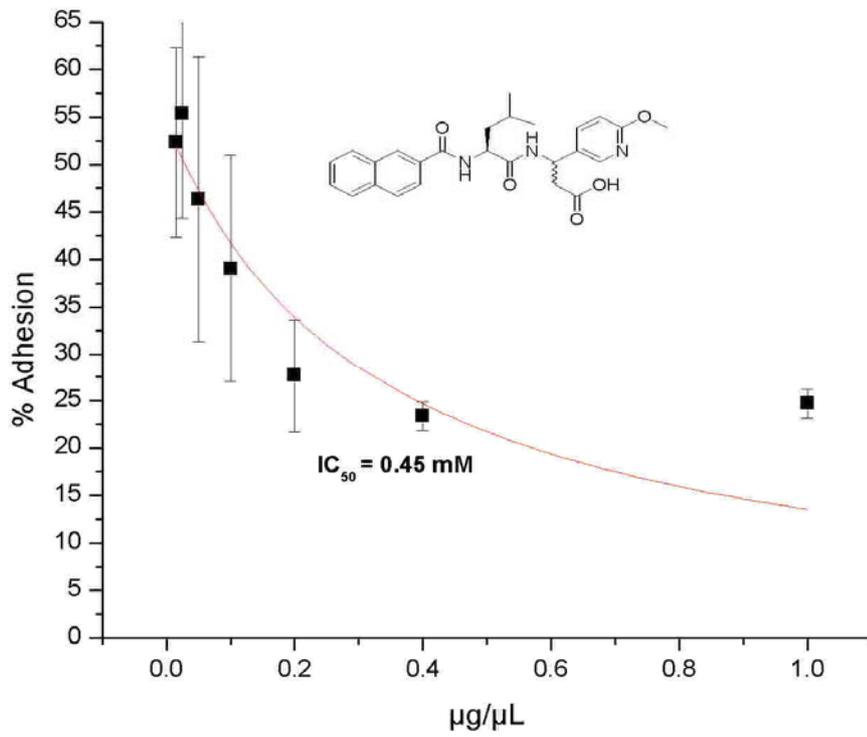
Diastereomer A



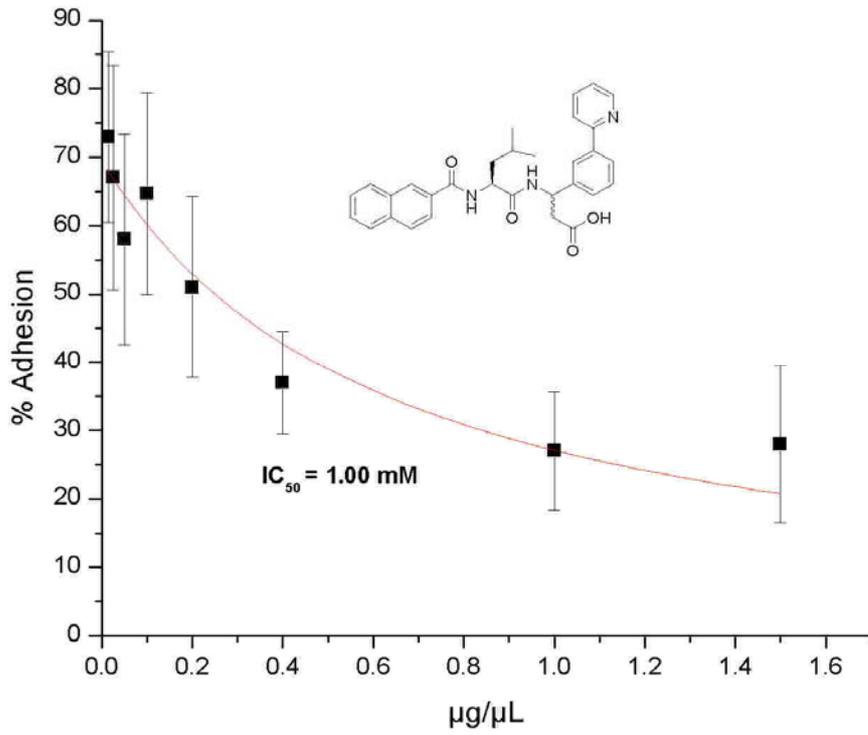
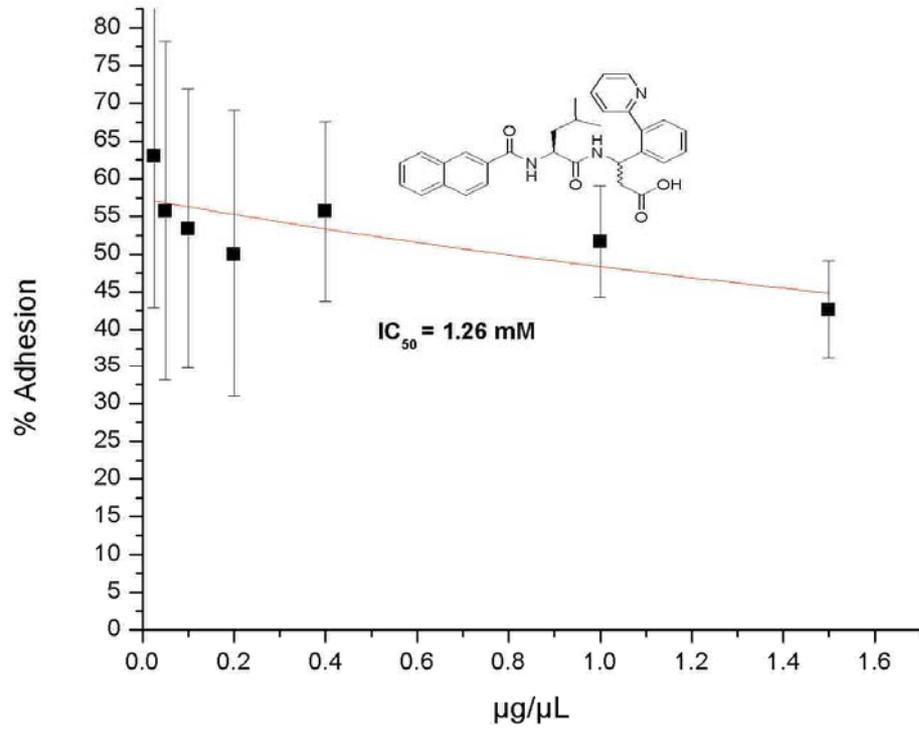
Diastereomer B

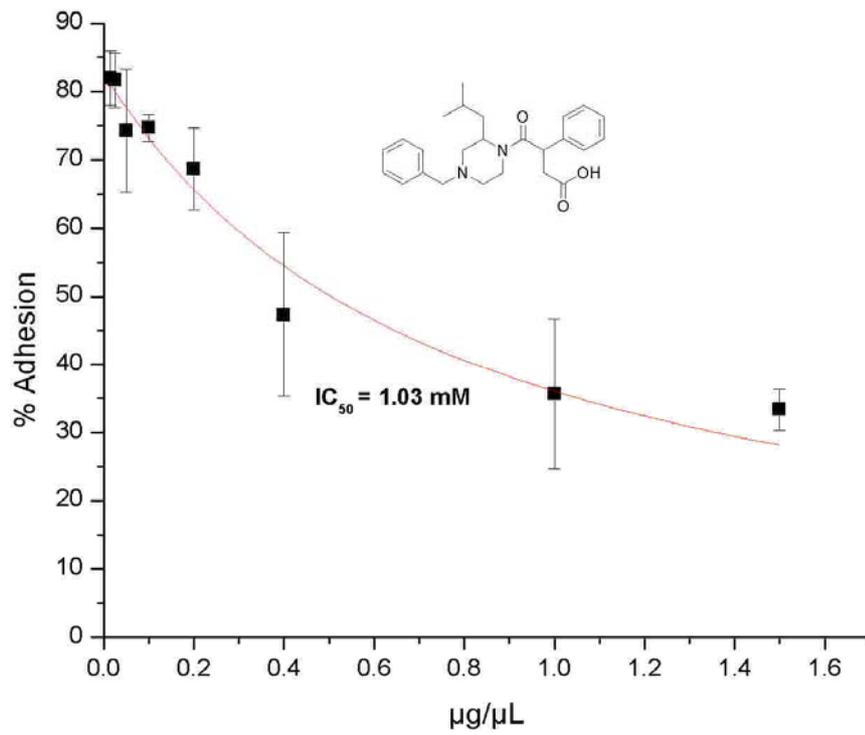


Diastereomer A

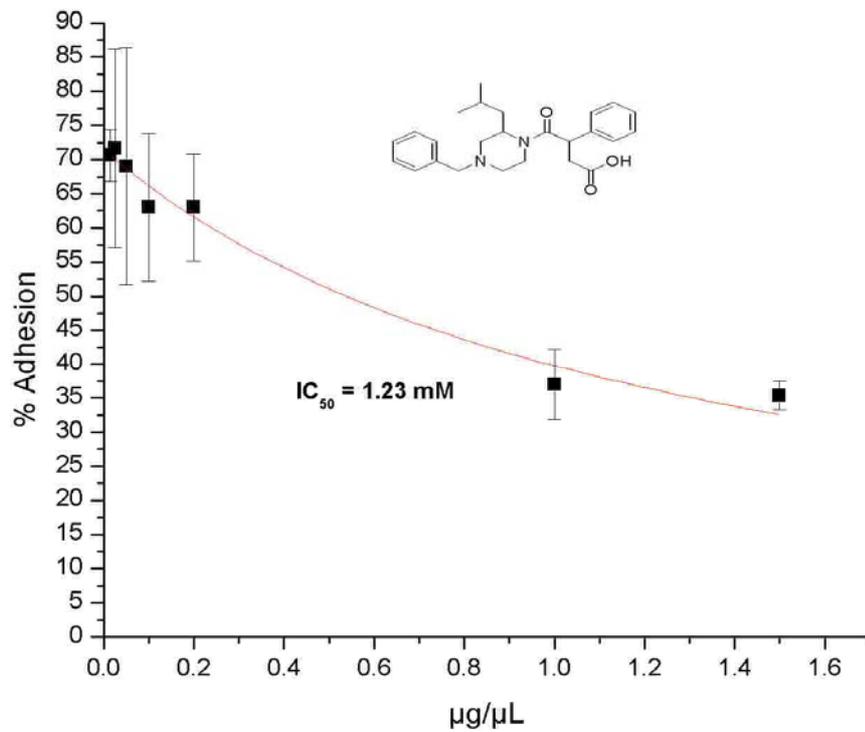


Diastereomer B

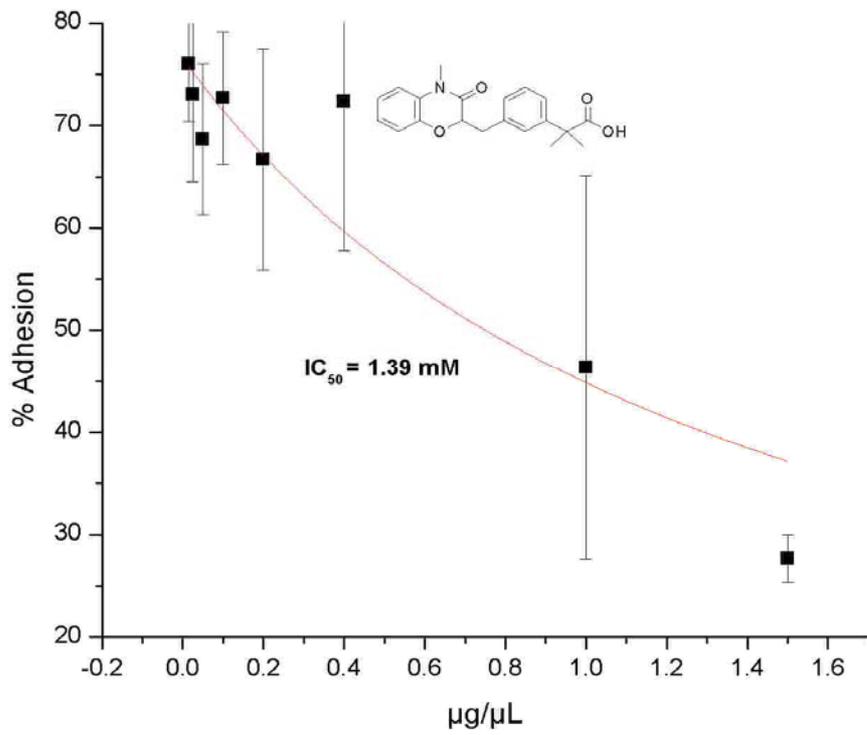
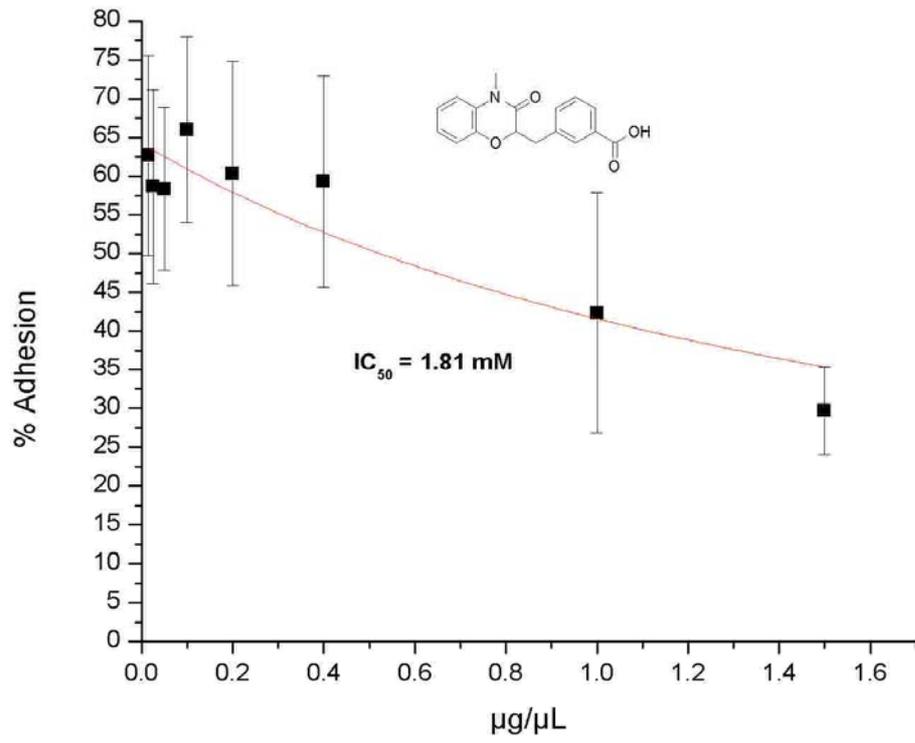


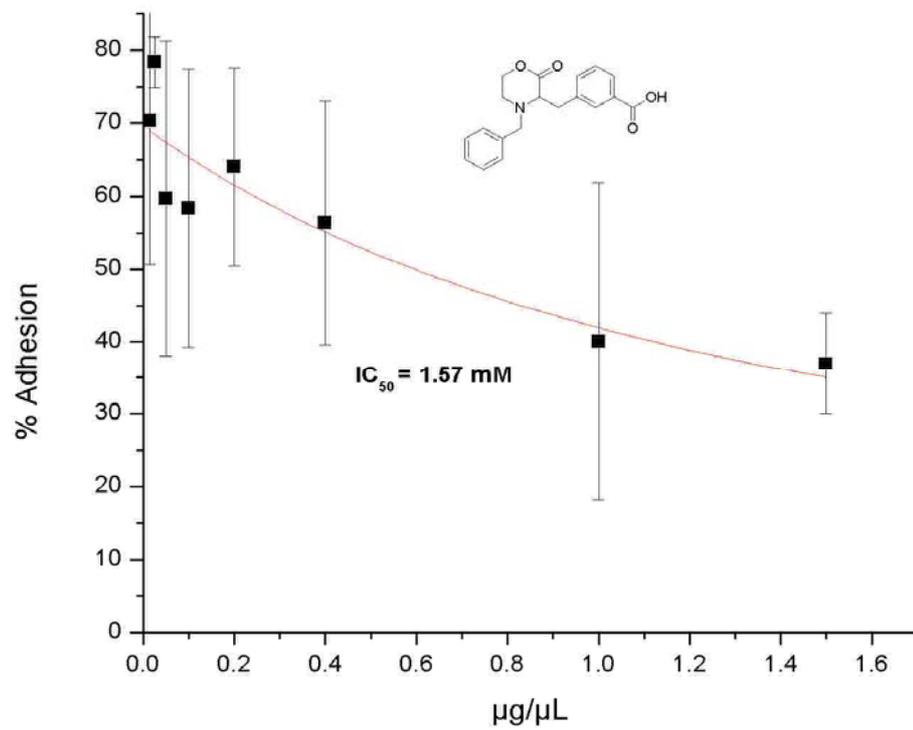
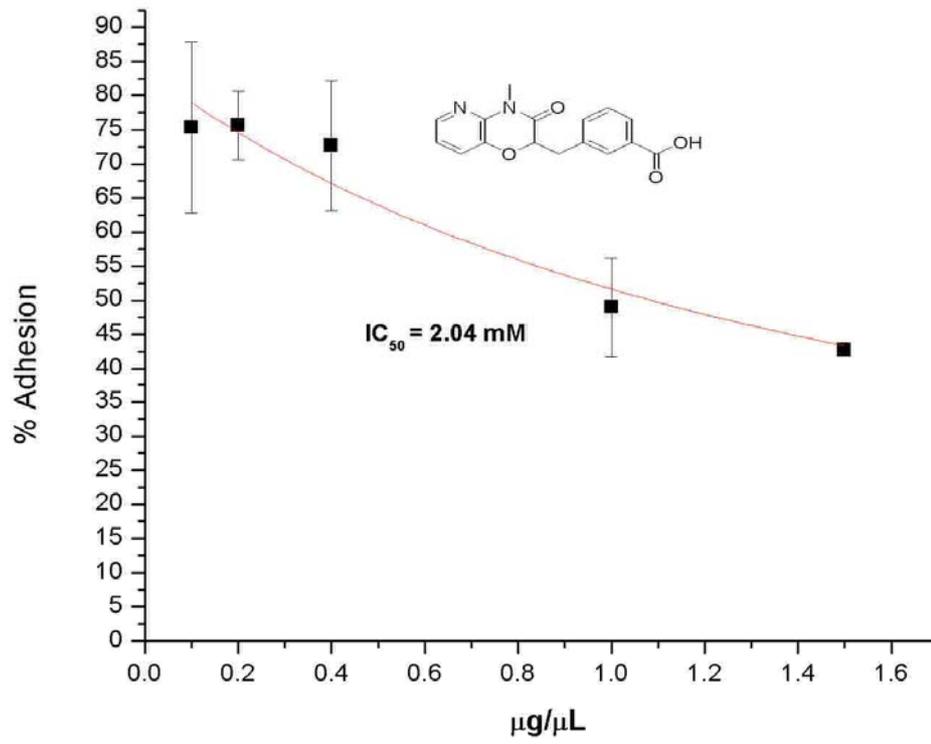


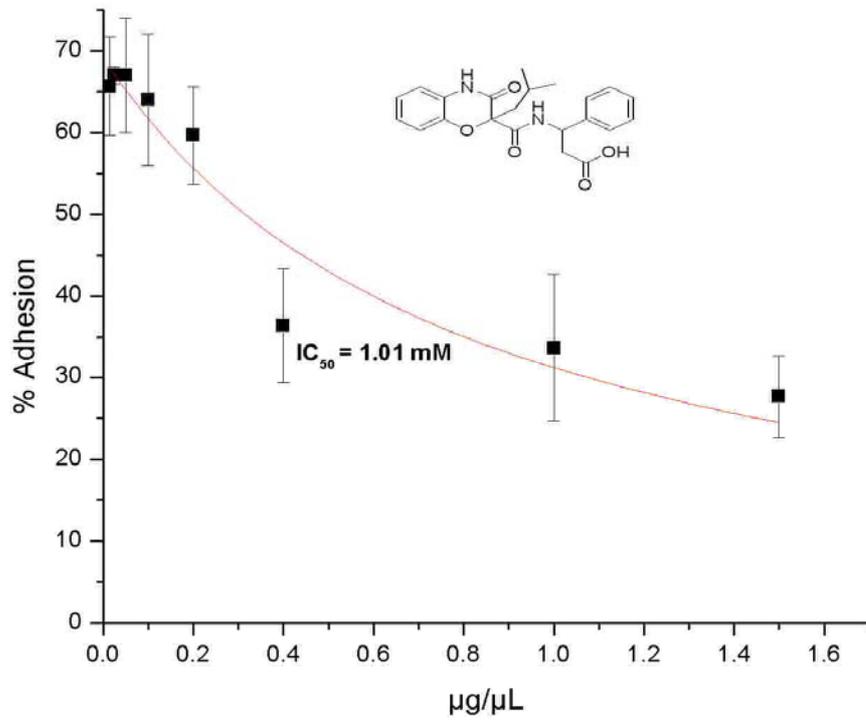
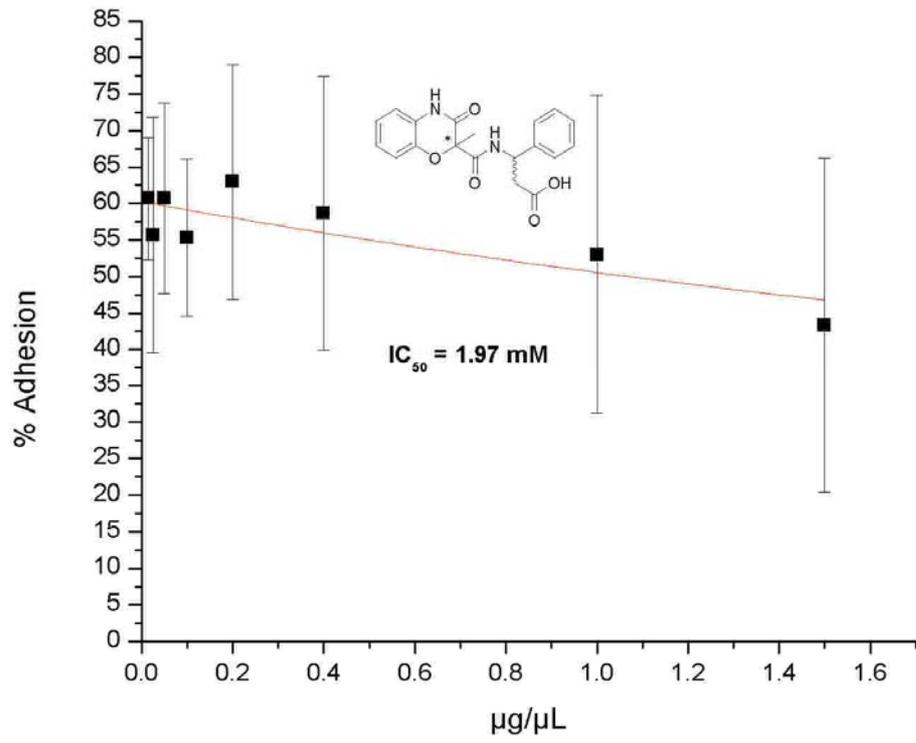
Diastereomer A

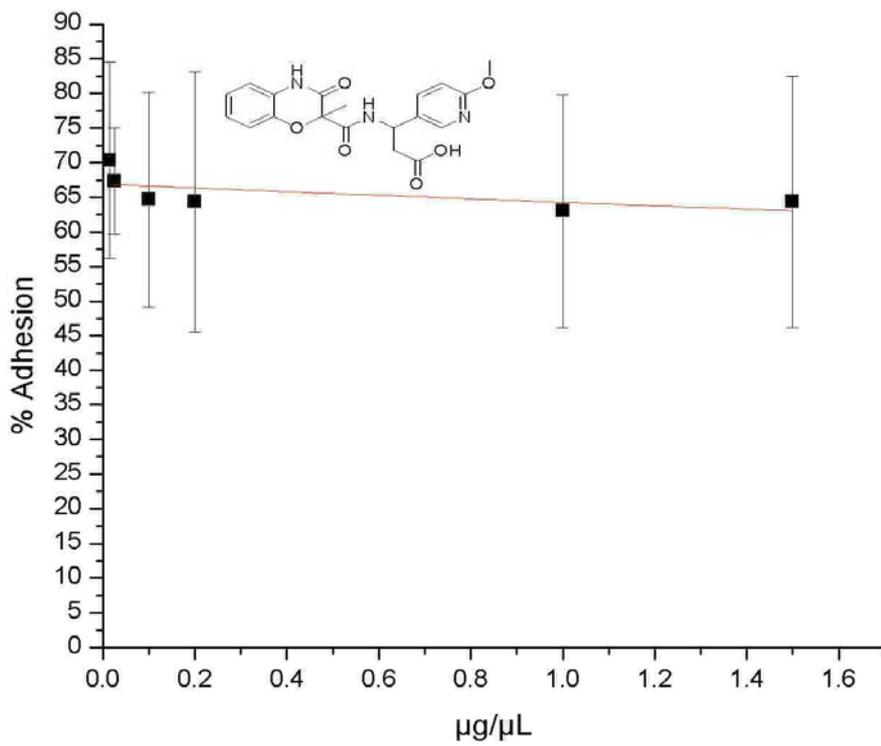
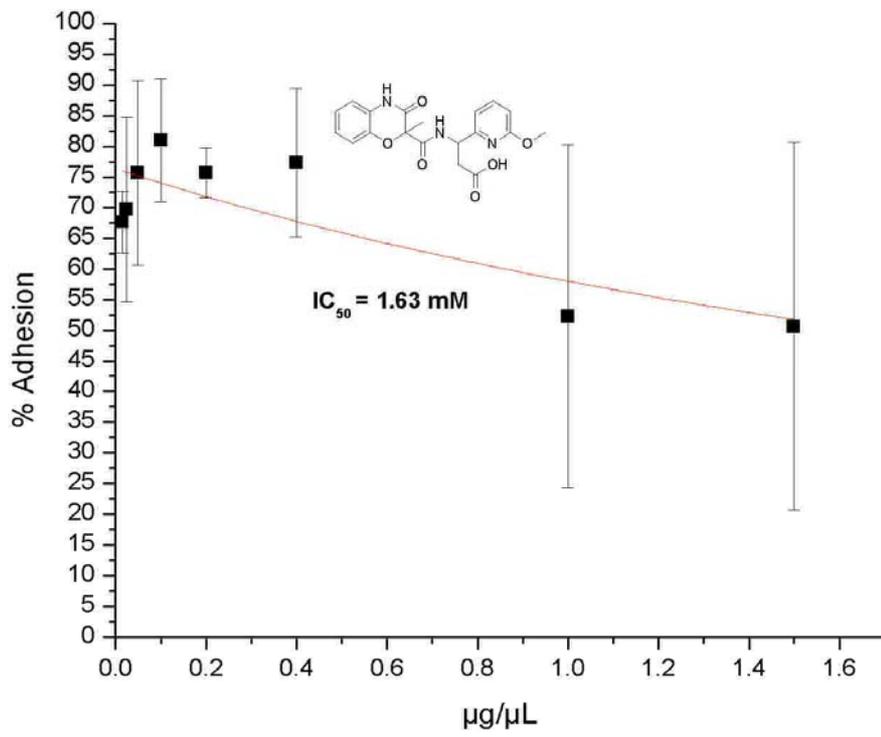


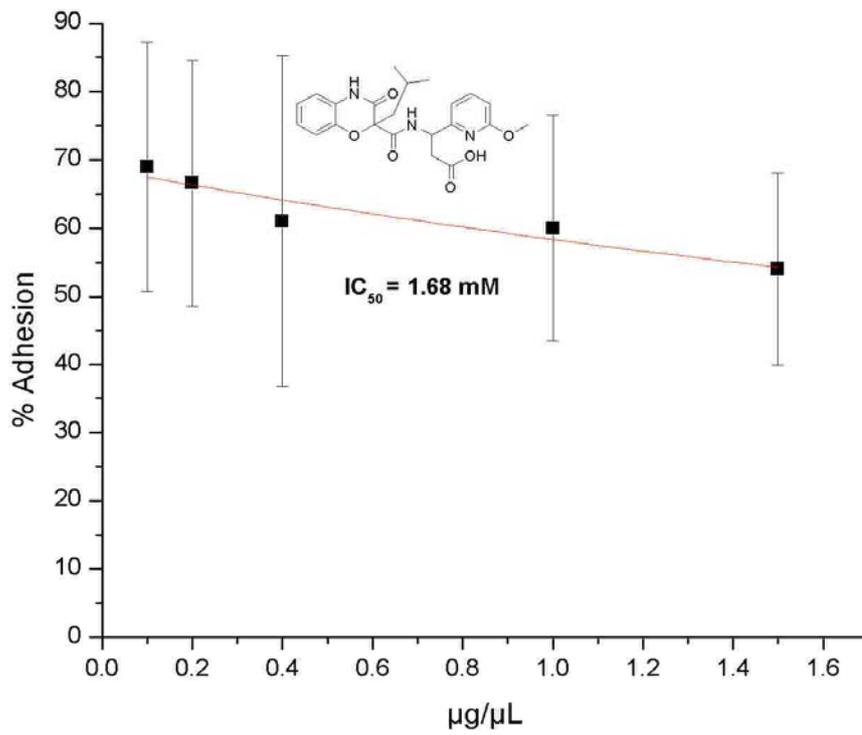
Diastereomer B



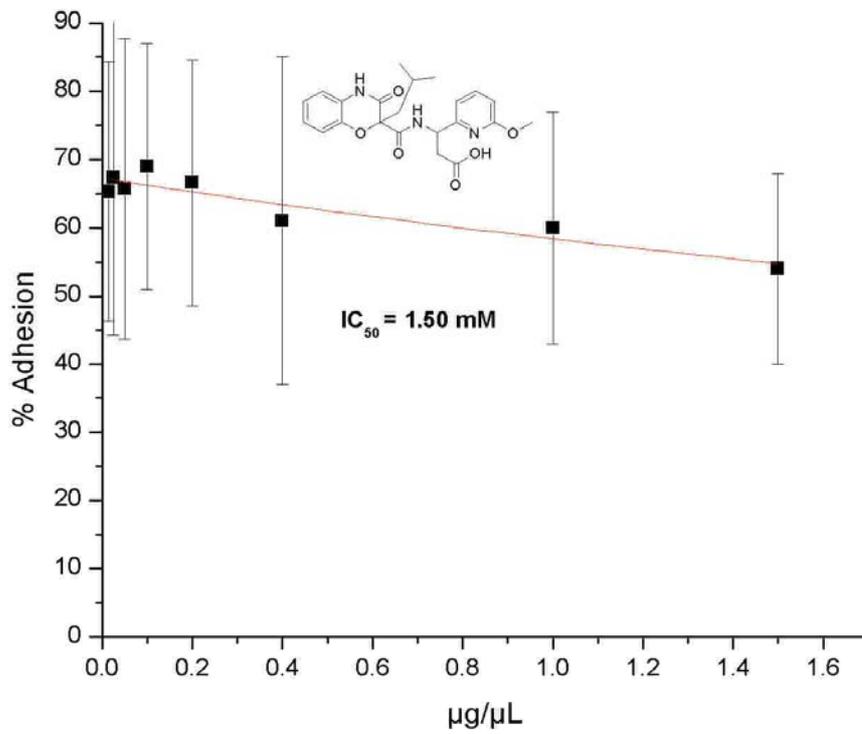




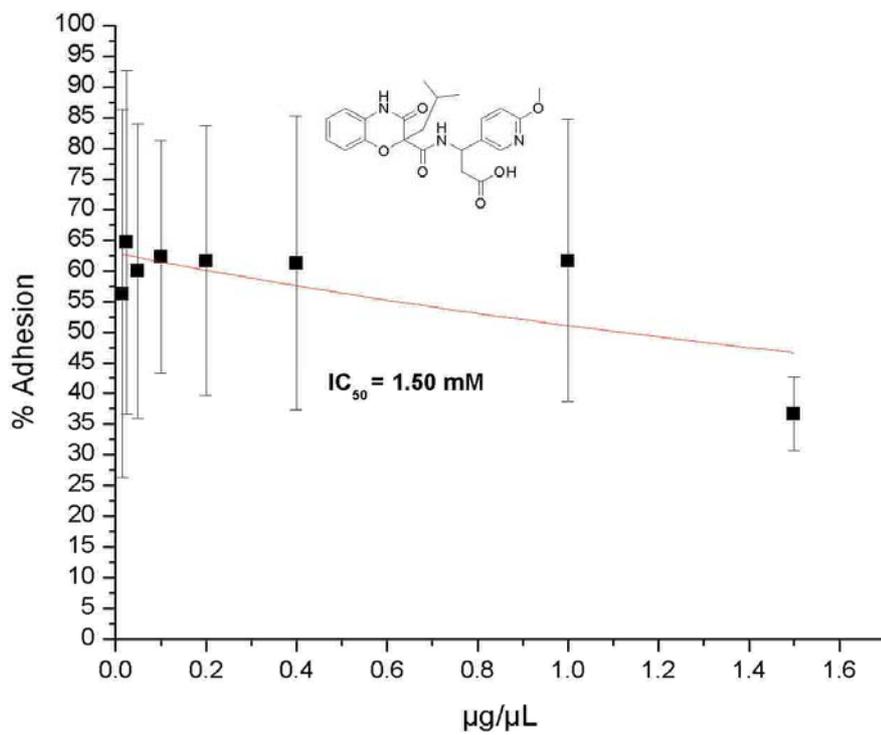




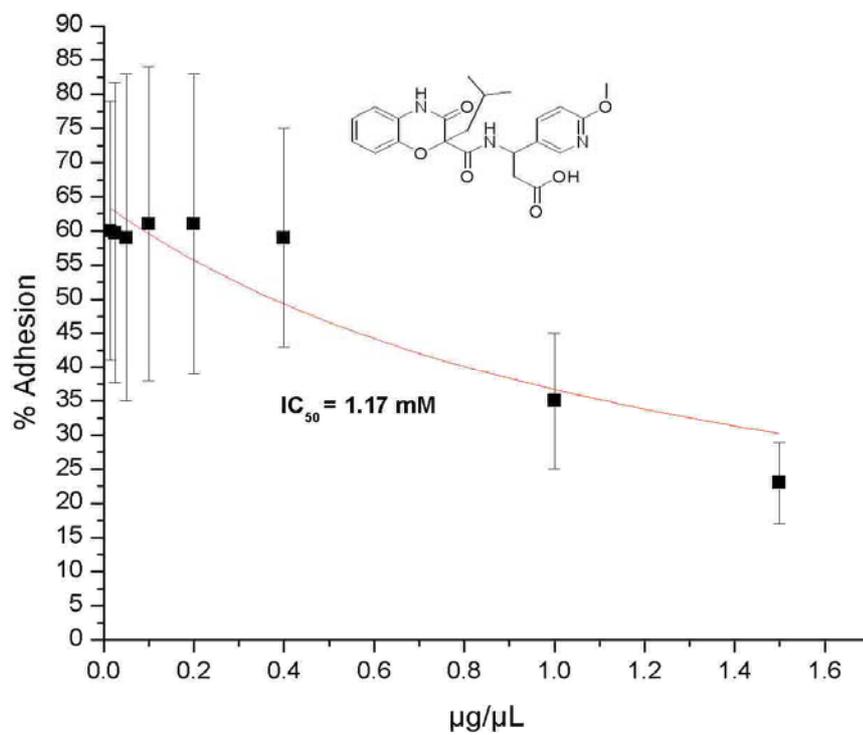
Diastereomer A



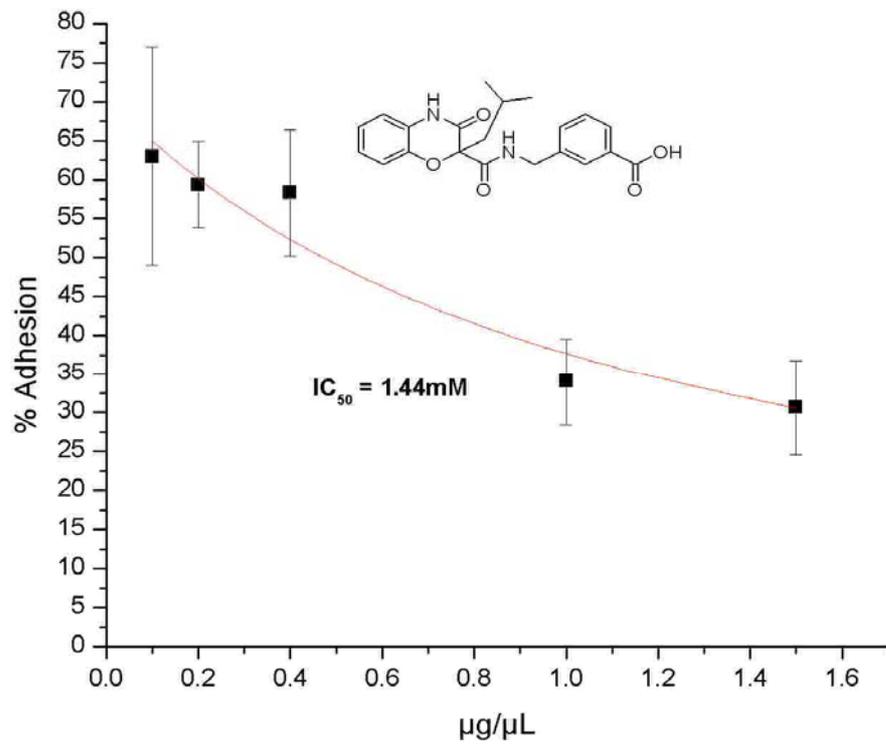
Diastereomer B

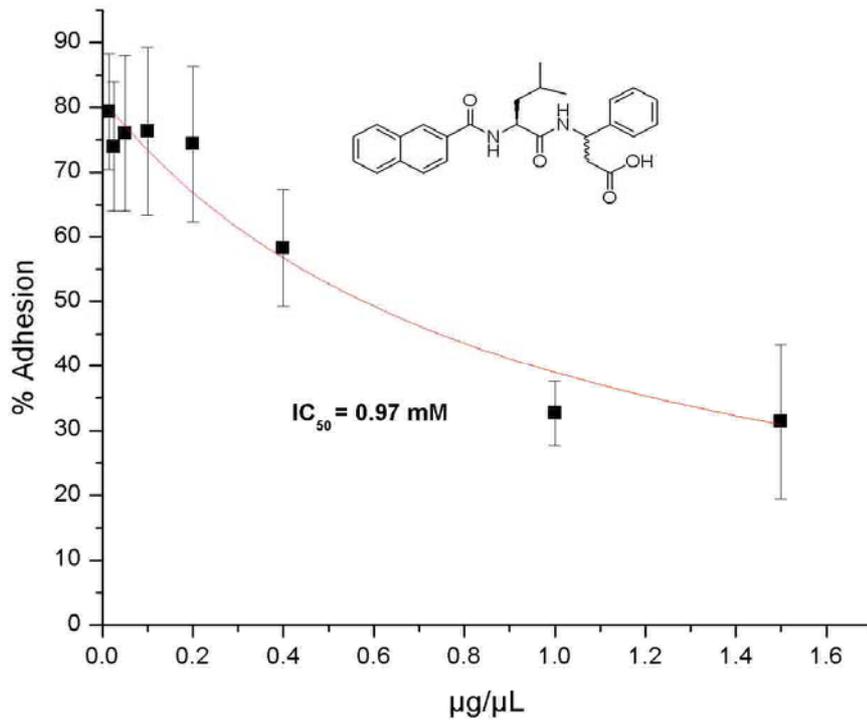


Diastereomer A

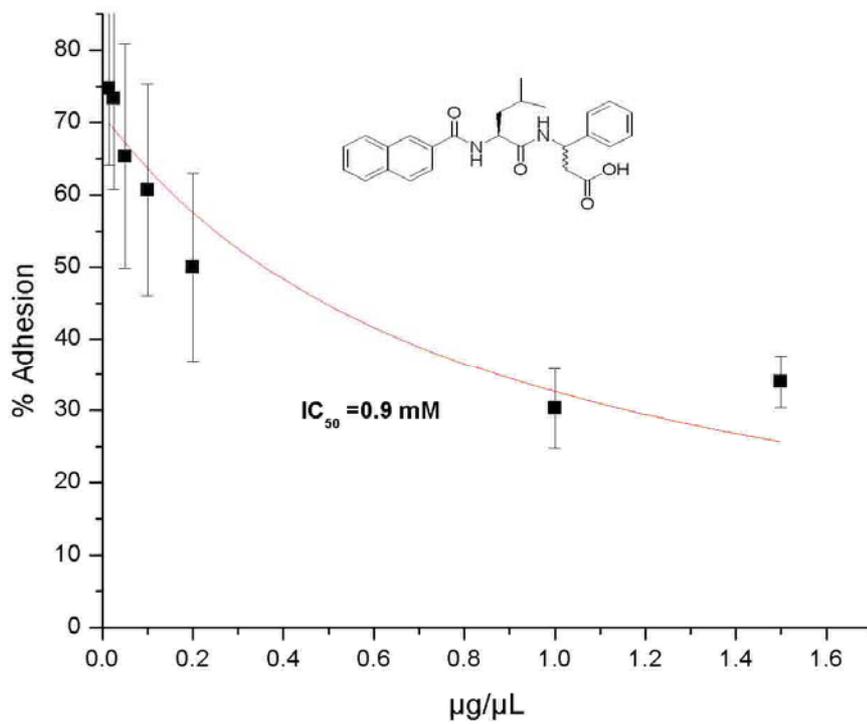


Diastereomer B





Diastereomer A



Diastereomer B

