

Max-Planck-Institut für Biochemie
Martinsried

**Rationales Wirkstoffdesign und Synthese niedermolekularer
Inhibitoren der Serinproteasen Faktor Xa und
Urokinase-Plasminogen Aktivator**

Neuartige Wirkstoffe zur anti-metastatischen bzw. antithrombotischen Therapie

Markus Michael Müller

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. W. Hiller

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. L. Moroder

2. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler

Die Dissertation wurde am 23.10.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 17.11.2003 angenommen.

Meinen Eltern

"Tempora mutantur, et nos mutamur in illis."

Publikationen und Präsentationen

Publikationen:

Mueller, M. M., Sperl, S., Stürzebecher, J., Bode, W., and Moroder, L. (2002) Derived Inhibitors of Factor Xa with a Novel Active-Site Binding Mode, *Biol. Chem.*, **383**, 1185-1191.

Magdolen, U., Krol, J., Sato, S., Mueller, M. M., Sperl, S., Krüger, A., Schmitt, M., and Magdolen, V. (2002) Natural Inhibitors of Tumor-associated Proteases, *Radiol. Oncol.*, **36**, 131-143.

Sperl, S., Mueller, M. M., Wilhelm, O. G., Schmitt, M., Magdolen, V., and Moroder, L. (2001) The uPA/uPA Receptor System as a Target for Tumor Therapy, *DN&P*, **7**, 401-411.

Vorträge:

- 2003: Winter School, "*(R)*-3-Amidinophenylalanine based highly selective inhibitors of Factor Xa: synthetic aspects", Tiers, Italien.
- 2002: 16th International Congress of the International Society for Fibrinolysis and Proteolysis, "*The high Selectivity of (R)*-3-Amidinophenylalanine-based inhibitors for Factor Xa derives from a new binding mode as determined by X-ray crystallography", München, Deutschland.
- 2001: Winter School, "*(R)*-3-Amidinophenylalanine derivatives as inhibitors of Factor Xa", Tiers, Italien.
- 2000: MPG workshop, "*Synthetic inhibitors of the serine protease Factor Xa*", Schloß Ringberg, Deutschland.

Poster Präsentationen:

- 2003: 18th American Peptide Symposium, "*Synthesis of guanidine compounds using resin-bound guanidinyllating reagents*", Boston, Massachusetts, USA.
- 2001: 2nd General Meeting of the International Proteolysis Society, "*Amidinophenylalanine-based inhibitors of blood coagulation Factor Xa – design, synthesis and modeling experiments*", Freising, Deutschland.

Danksagung

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

Mein besonders herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater **Herrn Prof. Dr. Luis Moroder**, der mir mit diesem Thema eine sehr interessante und vielfältige Aufgabe gestellt hat. Seine Tür stand immer offen, er hatte dabei stets ein offenes Ohr für neue Ideen und Diskussionen, er gewährte mir den nötigen Freiraum zur Ausarbeitung des Themas sowie zur Umsetzung meiner Ideen. Ich möchte mich hiermit bei ihm für dieses fruchtbare Arbeitsklima, die mir übertragene Verantwortung innerhalb der Arbeitsgruppe und das mir damit erwiesene Vertrauen herzlichst bedanken.

Ich bedanke mich hiermit recht herzlich bei allen Kooperationspartnern, ohne die diese interdisziplinäre Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Willex AG, München, für die fachliche und finanzielle Unterstützung sowie das Interesse an meiner Ausarbeitung,

Prof. Dr. Wolfram Bode (Abteilung Strukturforschung, *Prof. Dr. Robert Huber*) für die Röntgenstrukturanalyse des Faktor Xa/Inhibitor-Komplexes,

PD Dr. Jörg Stürzebecher und *Reiner Sieber* (Klinikum der Universität Jena, Zentrum für vaskuläre Biologie und Medizin, Erfurt) für die rasche Bestimmung der Inhibitionskonstanten, die pharmakokinetischen Untersuchungen und die fruchtbaren Diskussionen,

PD Dr. Achim Krüger, *Ingo Banke* und *Matthias Arldt* (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München) für die Durchführung der Tiermodelle mit meinen Inhibitoren im Bereich Metastasierung und die interessanten Diskussionen,

PD Dr. Viktor Magdolen (Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) und *Dr. Stefan Sperl* (*Wilex AG*, München) für die hilfreichen und zugleich interessanten Diskussionen,

Prof. Dr. Marianne Jochum und *Prof. Dr. Hans Fritz* für die finanzielle Unterstützung durch den Sonderforschungsbereich 469 der LMU München.

Mein weiterer Dank gilt:

Der ganzen Arbeitsgruppe „Bioorganische Chemie“, deren Mitglieder mich sehr freundlich aufgenommen haben, für ihr unvergessliches internationales Flair und die wunderbaren drei Jahre, die ich in deren Mitte verbringen konnte.

Meinem Laborpartner *Dr. Dirk Barth* danke ich für drei fantastische Jahre, die ich mit ihm im „HL Ia“ erleben konnte und die mich einiges gelehrt haben: eine tiefgehende Freundschaft zwischen Hessen und Bayern ist trotz aller „offensichtlichen Gegensätzlichkeiten“ durchaus möglich, unermüdlicher Humor verbessert nicht nur das Arbeitsklima, er fördert auch stark die Kreativität und danke, dass du meine Toleranzgrenzen in Sachen „Laborentropie“ gewaltig erweitert hast. Unsere gemeinsame Zeit bleibt unvergessen!

Hans-Jürgen Musiol danke ich für seine stets ausgeglichene, humorvolle Art, seine unendliche Geduld, sein stetiges Interesse und seine Ratschläge zum Thema „Fragen aus der Synthesechemie“, seine legendären „Zugriffszeiten“ auf dafür geeignete Publikationen - mit der er leichthin jede computerbasierte Recherche in den Schatten stellt, für seinen Beitrag zum Thema Guanidinylierung am Harz und für unsere gemeinsamen Abende an der Oper, wo ich mit ihm Wagner entdecken und verarbeiten konnte.

Dr. Norbert Schaschke danke ich für seine kollegiale Art und seine Hilfs-, Diskussions- und Kritikbereitschaft zu Problemen aller Facetten aus dem Laboralltag.

Des weiteren danke ich *Dr. Markus Kaiser* für unsere tiefschwarzen „Humorexperimente“ und daraus abgeleitete Diskussionen aktueller Themen, *Markus H. Löweneck* (*geb. Schütt*), der mich schon seit dem Grundstudium begleitet hat und den Laboralltag stets mit seiner Art und geistreichen Bemerkungen aufzuhellen wusste, *Ulrike Kusebauch*, die durch Dirk und mich ihre chemische sowie

humoristische Schlagfertigkeitserprobung erlangen musste, *Leslie Hötzer* als „Teilzeitnachbarin“ im Nebenlabor für ihr nettes Lachen und die „Schokoladenversorgung“, *Jose M. Pfizer* für seine kollegiale Art und meine „Nachfolge“ als Systemadministrator, *Dr. Alina Ariosa-Alvarez*, *Alessandra Barazza* („*Ale*“), und *Martha Centena Figueras* für das „südländische Klima“ des Labors M 331 und die Einführung in die kubanische, italienische und spanische Kultur und Lebensart, meinen weiteren „internationalen Kollegen“ *Dr. Babara Saccà* („*Babsina*“, alles Gute für dich und „*il vero Kaiserino*“), *Dr. Stella Fiori*, *Dr. Ferdinando Fiorino* („*Ferdl*“), *Dr. Carlo Sicilano* („*Kater Carlo*“, für den „süddeutsch-süditalienischen“ Austausch von Gemeinsamkeiten und Gegensätzlichkeiten), *Dr. Cyril Boulegue* (für's „*Servus*“), „*Tabby*“ *Pal Prajna Paramita*, *Silva Andric*, für den gewährten Einblick in andere Kulturen, Lebensweisen und –philosophien sowie *Alexander G. Milbradt* für das stete und enthusiastische Aussprechen meines Spitznamens. Darüber hinaus danke ich den Männern des Peptidservices mit *Dr. Raymond Behrendt* und *Dr. Frank Freudenmann*, „*Ray*“ für unsere bayrischen Momente in der Chemie und im Sportgeschehen, „*Franky*“ für seine „beispielhafte Abteilungsführung“ und gelegentliches Augenzwinkern. Ebenso danke ich meinem „neuen“ Laborkollegen und „Projektleiter aller Projekte“ *Dr. Stefan Alefelder* für seine vorbildhafte Präsenz an fast allen Arbeitsplätzen und hessischen Weisheiten.

Für die physikalischen und SGI-Momente im Laboralltag: dass er sich immer Zeit dafür nahm und seine Ratschläge dazu, danke ich *Dr. Christian Renner* ebenso wie für Messungen und Diskussionen von NMR-Spektren.

Lissy Weyher-Stingl danke ich für die zuverlässige Aufnahme zahlloser Massenspektren und die stete Bereitschaft auf meine „Sonderwünsche“ diesbezüglich einzugehen.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern *Ingrid* und *Michael G. Müller*, meiner Tante *Rosi Wittur*, meinen Onkeln *Horst Wittur* und *Helmut Märkl*. Bei ihnen möchte ich mich für die stetige Unterstützung bedanken. Euch sei diese Arbeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	KLASSIFIZIERUNG DER PROTEASEN.....	1
1.2	SPALTUNGSMECHANISMEN.....	3
1.3	NOMENKLATURKONVENTION ZUR BESCHREIBUNG VON WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN SUBSTRATEN UND PROTEASEN.....	7
1.4	RÄUMLICHE STRUKTUR TRYPSIN-ÄHNLICHER SERINPROTEASEN	8
1.5	STRUKTUR DER AKTIVEN ZENTREN VON TRYPSIN, THROMBIN, FAKTOR Xa, UND UPA.	10
2	AUFGABENSTELLUNG.....	13
2.1	HEMMUNG VON FAKTOR Xa DURCH NIEDERMOLEKULARE INHIBITOREN	13
2.2	HEMMUNG VON UPA DURCH NIEDERMOLEKULARE INHIBITOREN	14
3	FAKTOR Xa-INHIBITOREN	15
3.1	DER PROZESS DER BLUTGERINNUNG.....	15
3.2	PHARMAZEUTISCHE TARGETS IN DER BLUTGERINNUNGSKASKADE.....	18
3.3	FAKTOR Xa	23
3.4	NATÜRLICHE FAKTOR Xa-INHIBITOREN.....	24
3.5	SYNTHETISCHE FAKTOR Xa-INHIBITOREN	26
3.6	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	30
3.6.1	<i>Inhibition von Faktor Xa und verwandten trypsin-ähnlichen Serinproteasen.....</i>	<i>30</i>
3.6.2	<i>Synthesestrategien.....</i>	<i>39</i>
3.6.2.1	Synthese in Lösung	39
3.6.2.2	Festphasensynthese	45
3.6.3	<i>Röntgenkristallstruktur-Analyse des Faktor Xa/Inhibitor 11 Komplexes.....</i>	<i>52</i>
3.6.4	<i>Studien zur Gerinnungshemmung und in vivo-Eliminierung.....</i>	<i>60</i>
3.6.5	<i>In vivo-Untersuchung zur anti-metastatischen Wirkung von 11.....</i>	<i>67</i>
4	UPA-INHIBITOREN.....	70
4.1	TUMORPROGRESSION UND METASTASIERUNG	70
4.2	DAS UPA-UPAR-SYSTEM	73
4.3	KLINISCHE RELEVANZ VON UPA, UPAR, PAI-1 UND PAI-2	75
4.4	PHARMAZEUTISCHE TARGETS IM UPA-UPAR-SYSTEM.....	77
4.5	UROKINASE-TYP PLASMINOGEN AKTIVATOR (UPA)	80

4.6	NATÜRLICHE UPA-INHIBITOREN	82
4.7	SYNTHETISCHE UPA-INHIBITOREN	84
4.8	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	88
4.8.1	<i>Leitstrukturen</i>	88
4.8.2	<i>Inhibition von uPA und verwandten trypsin-ähnlichen Serinproteasen</i>	94
4.8.3	<i>Synthesestrategien</i>	99
4.8.3.1	Synthese in Lösung	99
4.8.3.2	Festphasensynthese	111
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	127
5.1	FAKTOR Xa INHIBITOREN	127
5.2	UPA INHIBITOREN	129
6	EXPERIMENTELLER TEIL	131
6.1	MATERIAL UND METHODEN	131
6.2	ENZYMKINETIK	136
6.3	FAKTOR Xa-INHIBITOREN	138
6.3.1	<i>Synthesevorschriften</i>	138
6.3.1.1	Synthese in Lösung	138
6.3.1.2	Festphasensynthese	149
6.3.2	<i>Röntgenstrukturanalyse des Faktor Xa/Inhibitor 11-Komplexes</i>	153
6.3.3	<i>Studien zur in vivo-Eliminierung von 11 und 25</i>	156
6.3.4	<i>In vivo-Untersuchung zur anti-metastatischen Wirkung von 11</i>	157
6.4	UPA-INHIBITOREN	158
6.4.1	<i>Synthesevorschriften</i>	158
6.4.1.1	Synthese in Lösung	158
6.4.1.2	Festphasensynthese	167
7	LITERATURVERZEICHNIS	178

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
AcOEt	Essigsäureethylester
AcOH	Essigsäure
Adoc	1-Adamantylloxycarbonyl
ADP	Adenosin-Diphosphat
Aloc	Allyloxycarbonyl
APC	Aktiviertes Protein C
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
aq.	wässrig
ATF	Aminoterminales Fragment
ATIII	Antithrombin III
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	<i>N,O</i> -Bis-(Trimethylsilyl)-acetamid
Bz	Benzyl
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
CPK	Farbschema der Moleküldarstellung (Corey, Pauling, Koltun)
Dap	Diaminopropionsäure
DAST	<i>N,N</i> -Diethylaminoschwefeltrifluorid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
Dde	Bis- <i>N</i> -1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-ethyl
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
DIPE	Diisopropylether
DMAP	Dimethylaminopyridin
DME	Dimethoxyethan

DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
Domain	Domäne
EC	Enzyme Commission
EDCI	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethyl-carbodiimid-hydrochlorid
EGF	Epidermal Growth Factor, epidermaler Wachstumsfaktor
equiv	Äquivalent
ESI	Elektro-Spray-Ionisierung
EtOH	Ethanol
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FXa	Faktor X (aktiviert)
GFD	Growth-Factor-Like Domain
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde(n)
H-Brücken	Wasserstoffbrücken
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-Tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat
HCl	Salzsäure
HCTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -6-Chlorbenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat
HMW-uPA	hochmolekularer uPA
HOAT	1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	Hydroxysuccinimid
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IC ₂₀₀	inhibitory concentration 200%, benötigte Konzentration für eine Verdoppelung der Blutgerinnungszeit
IC ₅₀	inhibitory concentration 50%, benötigte Konzentration für eine 50%ige Inhibition des Enzyms
<i>in vitro</i>	(lat.) im (Reagenz-)Glas, außerhalb des lebenden Organismus

Abkürzungsverzeichnis

<i>in vivo</i>	innerhalb des lebenden Organismus
i-PrOH	Isopropanol
IR	Infrarot
KHSO ₄	Kaliumhydrogensulfat
KI	Kaliumiodid
K_i	Inhibitionskonstante, Konzentration des Inhibitors, bei der die Maximalgeschwindigkeit der gehemmten Reaktion halb so groß ist wie die der nicht gehemmten Reaktion
KMnO ₄	Kaliumpermanganat
LM	Lösungsmittel
LMWH	Low Molecular-Weight Heparin, niedermolekulares Heparin
LMW-uPA	niedermolekularer uPA
M	molar
MBHA	4-Methylbenzhydrylamin
MeOH	Methanol
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
MMP	Matrix Metallo-Protease
MS	Massenspektrometrie
MTB	Methyl- <i>tert</i> -butyl
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Nle	Norleucin
nM	nanomolar, 10 ⁻⁹ , Milliardstel
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Magnetische Kernspinresonanz
NO	Stickstoffmonoxid
NOBF ₄	Nitrosonium Tetra-fluoroborat
OSu	Oxy-Succinimid-ester
p. a.	Pro Analyse
PAI	Plasminogen Aktivator-Inhibitor
PAI-1/2	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1/2

PCI	Protein C-Inhibitor
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglykol
pH	potentia hydrogenii, Stärke (Konzentration) des Wasserstoffs
pK _s	negativer dekadischer Logarithmus der Protolysekonstante
pM	picomolar, 10 ⁻¹² , Billionstel
PN-1	Proteinase Nexin-1
PT	Prothrombinzeit
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphat
R _f	Retentionsfaktor in der Dünnschichtchromatographie
RT	Raumtemperatur
S _{1β}	S _{1sub} , „Subgroove“, vorgelagerte Rille der S ₁ -Bindungstasche
SAR	Structure-Activity-Relationship, Struktur-Wirkungsbeziehung
scu-PA	single chain-uPA, einkettiger uPA
Serpin	Serine-Protease-Inhibitor
SOCl ₂	Thionylchlorid
suPAR	„soluble-uPAR“, nicht oberflächengebundener uPAR
TATI	Tumor-assoziierte Trypsin-Inhibitor
TBTU	2-(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium- tetrafluorborat
TCTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -6-Chlorbenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- uronium-tetrafluorborat
TEA	Triethylamin
TF	Tissue Factor, Gewebefaktor bzw. Faktor III
Tf ₂ O	Trifluormethylsulfonsäureanhydrid
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TG	Tentagel
THF	Tetrahydrofuran
TIMP	Tissue Inhibitor der Metallo-Protease

Abkürzungsverzeichnis

TMOF	Trimethylorthoformiat
TMS	Trimethylsilyl
Tos	<i>p</i> -Toluolsulfonyl
tPA	Tissue-Type Plasminogen Aktivator
t_R	Retentionszeit in der analytischen HPLC
Triton B	Benzyl-trimethyl-ammonium-hydroxid
TT	Thrombinzeit
UFH	Unfractionated Heparin, unfraktioniertes Heparin
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
uPAR	uPA-Rezeptor
uPAR	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator-Rezeptor
UV/VIS	Ultraviolett/Visible
Verb.	Verbindung
Z	Benzyloxycarbonyl
μM	micromolar, 10^{-6} , Millionstel

1 Einleitung

1.1 Klassifizierung der Proteasen

Proteasen, die auch Proteinasen, Peptidasen oder proteolytische Enzyme genannt werden, haben die Fähigkeit, mit mehr oder weniger Selektivität die Spaltung von Peptidbindungen zu katalysieren. Sie gehören damit zu einer sehr großen Gruppe von Proteinen, denen im Stoffwechselgeschehen von Organismen eine sehr kritische und essentielle Rolle zuteil wird. Einerseits werden sie in der EC-Liste (Enzyme Commission) zur Unterklasse 3.4 aller Enzyme mit 13 Unter-Unterklassen zusammengefasst, wobei jedoch molekulare Strukturen und evolutionäre Beziehungen untereinander nicht berücksichtigt werden. Andererseits können die Peptidasen, ausgehend von der Basis ihrer Primär- und Tertiärstruktur, in Familien unterteilt und aufgrund ihres unterschiedlichen Katalysemechanismus (Tabelle 1-1) weiter klassifiziert werden.^[1]

Klasse	Familie	Aktives Zentrum
Serin-Proteasen	S	Serin, Histidin und Aspartat
Threonin-Proteasen	T	Threonin
Cystein-Proteasen	C	Cystein
Aspartat-Proteasen	A	Aspartat-Reste
Metallo-Proteasen	M	Metallion
Nicht klassifizierte Proteasen	U	divers

Tabelle 1-1: *Klassifizierung der Peptidasen nach dem katalytischen Typus.*

Jede Familie ist demnach durch einen Buchstaben, der den katalytischen Mechanismus wiedergibt, und eine einzigartige Zahl gekennzeichnet (vgl. Trypsin S1). Dabei

werden die Serin- und Threoninfamilien oft zusammengefasst dargestellt. Eine weitere Unterteilung erfolgt dann in Unterklassen, auch sogenannte „Clans“, die sich aufgrund struktureller Verwandtschaft und/oder des Motivs in der Abfolge der katalytischen Reste unterscheiden. Demnach werden beispielsweise Serinproteasen wie Trypsin mit einem „double β -barrel“ und der Aminosäuresequenz Asp, His, Ser ihrer katalytischen Reste dem Clan „SA“ zugeordnet, wohingegen die extrazelluläre Serinprotease Thermitase aus *Thermoactinomyces vulgaris* in der Faltung ein „parallel β -sheet“ und das Motiv Asp, His, Ser aufweist und somit dem Clan „SB“ zugeordnet wird. Bei den bislang bekannten Serinproteasen unterscheidet man folgende Clans, „SA“ („double β -barrel“/His, Asp, Ser), „SB“ („parallel β -sheet“/Asp, His, Ser), „SC“ (α,β Hydrolase/Ser, Asp, His), „SE“ (Helices und „ $\alpha+\beta$ sandwich“/Ser-Xaa-Xbb-Lys), „SF“ („single β -barrel“/Ser, Lys, oder Ser, His), „SH“ („all β “/His, Ser, His) und „TA“ („ $\alpha,\beta,\beta,\alpha$ sandwich“/Threonin in den katalytischen Resten).

Darüber hinaus kann man die Peptidasen zusätzlich aufgrund der Proteinsequenzposition der Spaltung von Peptid- und Proteinsubstrat in Exopeptidasen, das sind Proteasen verantwortlich für Spaltungen am N- oder C-Terminus der Proteinsequenz (Tabelle 1-2), und Endopeptidasen, mit Spaltung von sequenzinterner Peptidamidbindung, einteilen.

Exopeptidase	Anzahl/Lage der Abspaltung
Aminopeptidasen	1 Aminosäure/ N-terminal
Dipeptidyl-Peptidasen	2 Aminosäuren/ N-terminal
Tripeptidyl-Peptidasen	3 Aminosäuren/ N-terminal
Carboxy-Peptidasen	1 Aminosäure/ C-terminal
Peptidyl-Dipeptidasen	2 Aminosäuren/ C-terminal

Tabelle 1-2: Beispiel: Klassifizierung der Exopeptidasen nach Anzahl und Lage der abgespaltenen Aminosäuren.

1.2 Spaltungsmechanismen

Die Serin-, Threonin- und Cysteinpeptidasen unterscheiden sich mechanistisch sehr stark von Aspartat- und Metallopeptidasen. Im ersten Falle ist das an der Spaltung der Peptidbindung beteiligte Nukleophil am Ort der Katalyse eine Aminosäure, im zweiten Falle handelt es sich meist um ein aktiviertes Wassermolekül.^[2]

Beim Spaltungsmechanismus der Serin-, Cystein- und Threoninpeptidasen (Abbildung 1-1) wird eine OH- bzw. SH-Gruppe durch ein Histidin deprotoniert und ein peptidisches Substrat, das dabei meist durch ein sogenanntes, von Aminosäuren des Enzyms ausgebildetes „oxy-anion-hole“ über Wasserstoffbrückenbindungen in Position gehalten wird, nukleophil an der zu spaltenden Peptidbindung angegriffen. Daraus erfolgt ein tetraedrischer Übergangszustand, von dem sich das Amid der Peptidbindung als N-terminales Amin, durch Deprotonierung des Histidins, lösen kann. Das daraus resultierende aktivierte Acyl-Enzym Intermediat kann nun durch ein Wassermolekül nukleophil attackiert werden, wobei eine C-terminale freie Säure entsteht und der ursprüngliche Ausgangszustand der beteiligten katalytischen Aminosäuren des Enzyms den Katalysezyklus schließt.

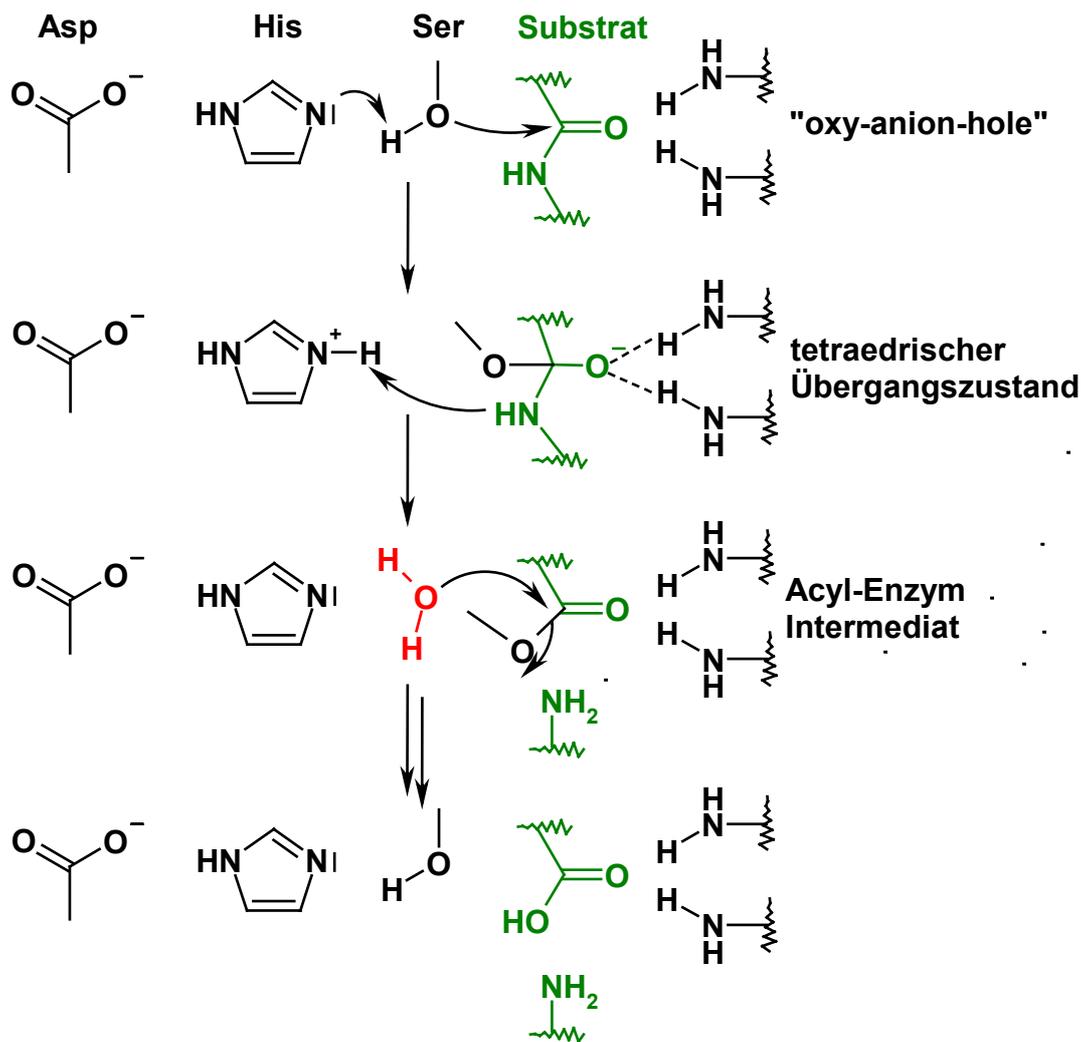


Abbildung 1-1: Spaltungsmechanismus der Serin-, Cystein- und Threoninprotease - hier am Beispiel einer Serinprotease. Das Peptidsubstrat ist in Grün und das am Mechanismus beteiligte Wasser in Rot dargestellt.

Aspartylpeptidasen bedienen sich zur katalytischen Spaltung von Peptidbindungen eines anderen Mechanismus (Abbildung 1-2). Dabei wird ein Wassermolekül im katalytischen Zentrum, zwischen einem Aspartat und einer Asparaginsäure, vom Aspartat zum Hydroxyanion deprotoniert, das dann unmittelbar das angelagerte peptidische Substrat nukleophil angreifen kann. Das entstandene Sauerstoffanion der Peptidbindung deprotoniert die Asparaginsäure wiederum zum Aspartat, wobei sich am Substrat selbst ein diolischer Übergangszustand ausbilden kann. Zum Abschluss des Katalysezyklus löst sich das Amid der Peptidbindung als N-terminales Amin durch

Deprotonierung der Asparaginsäure, und die C-terminale freie Säure kann, wiederum deprotoniert durch Aspartat, entstehen. Dies erzeugt schließlich den katalytischen Ausgangszustand.

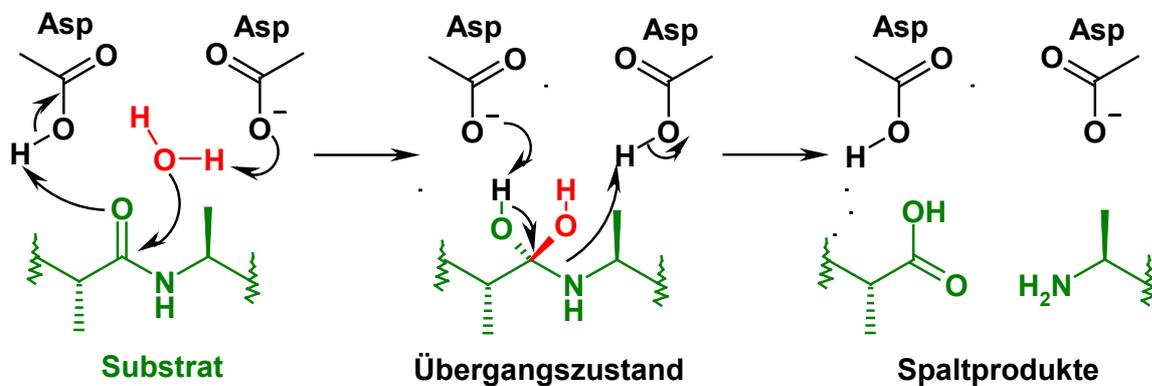


Abbildung 1-2: Spaltungsmechanismus der Aspartylproteasen. Das Peptidsubstrat ist in Grün und das am Mechanismus beteiligte Wasser in Rot dargestellt.

Der exakte katalytische Mechanismus von Metallopeptidasen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Essentiell für die Enzymaktivität sind dabei wohl die Metallionen, oft Zinkkationen, die von verschiedenen Aminosäuren im katalytischen Zentrum komplexiert werden. Zink liegt unter physiologischen Bedingungen meist als zweifach geladenes Kation vor, was zur Amidspaltung ausgenutzt werden kann. Am Beispiel der bakteriellen Metallopeptidase Thermolysin (Abbildung 1-3) kann ein grundlegender Mechanismus veranschaulicht werden. Die Carbonylgruppe des peptidischen Substrates wird im katalytischen Zentrum polarisiert und so ein nukleophiler Angriff durch ein Wassermolekül, das ebenfalls polarisiert wird, ermöglicht. Anschließend wird ein daraus resultierender, tetraedrischer Übergangszustand durch das Zinkkation stabilisiert. Dabei scheinen auch weitere Aminosäuren, wie eine Glutaminsäure und ein weiteres Histidin, im katalytischen Zentrum eine wichtige Rolle zu spielen. Diese wirken ebenfalls polarisierend und komplexierend am Katalysezyklus mit. Im abschließenden Spaltungsschritt wird das Amid der Peptidbindung als N-terminales Amin abgelöst und durch eine

Glutaminsäure stabilisiert. Die C-terminale freie Säure liegt nun weiterhin stabilisiert im katalytischen Zentrum vor und kann danach freigesetzt werden.^[2]

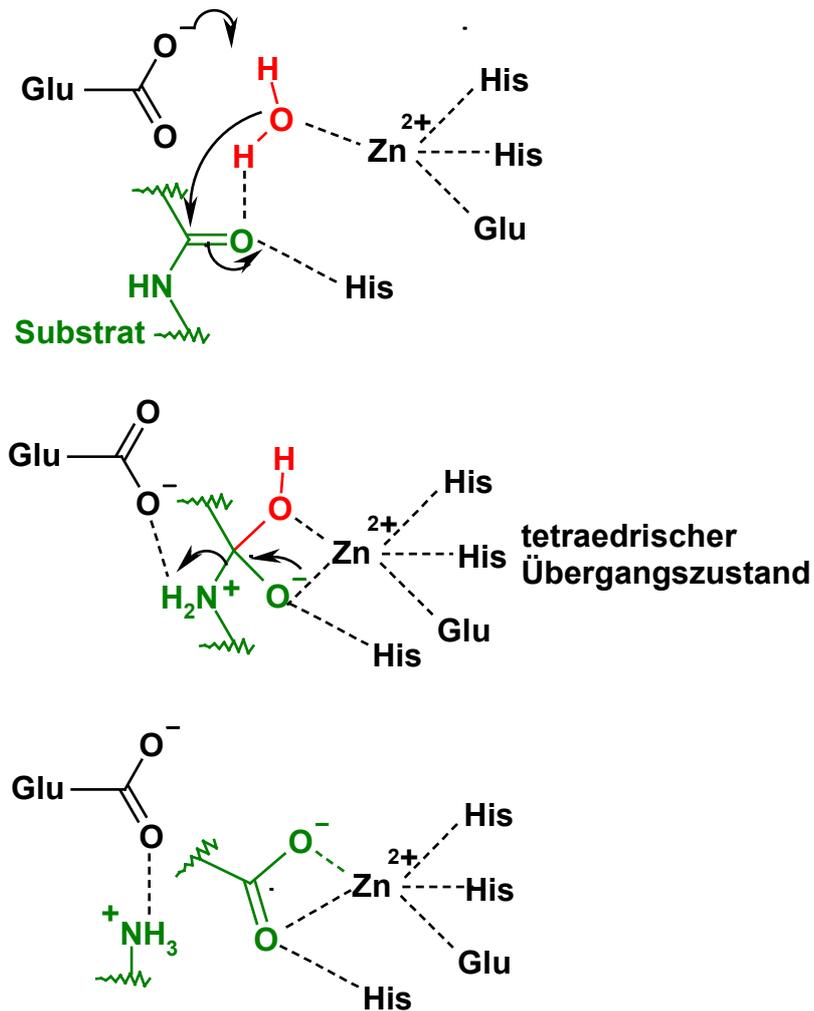


Abbildung 1-3: Spaltungsmechanismus von Metallopeptidasen am Beispiel des Thermolysins. Das Peptidsubstrat ist wiederum in Grün und das am Mechanismus beteiligte Wasser in Rot dargestellt.

1.3 Nomenklaturkonvention zur Beschreibung von Wechselwirkungen zwischen Substraten und Proteasen

Zur Beschreibung von Interaktionen zwischen Substraten bzw. Inhibitoren und Proteasen wird standardmäßig eine von Schechter und Berger (Abbildung 1-4) eingeführte Nomenklatur verwendet.^[3] Ein Peptidsubstrat wird hierbei an seinen Aminosäureresten, die mit den räumlichen Strukturen der Enzymoberfläche bei der Spaltung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip interagieren können, mit dem Buchstaben P bezeichnet. Bindungstaschen, die sich aufgrund der Oberflächenstruktur des Enzymes ergeben und an der Substratspaltung mechanistisch wie substratselektiv beteiligt sind, erhalten den Buchstaben S, der dabei für „Subsite“ steht. Ausgehend vom Ort der Spaltung, der auch als „active site“ bezeichnet wird und wo die Spaltung der Konvention nach zwischen der S_1 - und der S_1' -Tasche stattfindet, werden alle weiteren Bindungstaschen, die mit den N-terminalen Resten des Substrates interagieren, mit S_1 , S_2 , S_3 , usw. bzw., die mit den C-terminalen Resten des Substrates interagieren, mit S_1' , S_2' , S_3' , usw. benannt. Darausfolgend erhalten die zugeordneten Aminosäurereste des Substrates N-terminal P_1 , P_2 , P_3 , usw. und C-terminal P_1' , P_2' , P_3' , usw. als Bezeichnung. Für Elemente natürlicher und synthetischer Inhibitoren wird die Substratnomenklatur mit dem Buchstaben P übernommen.

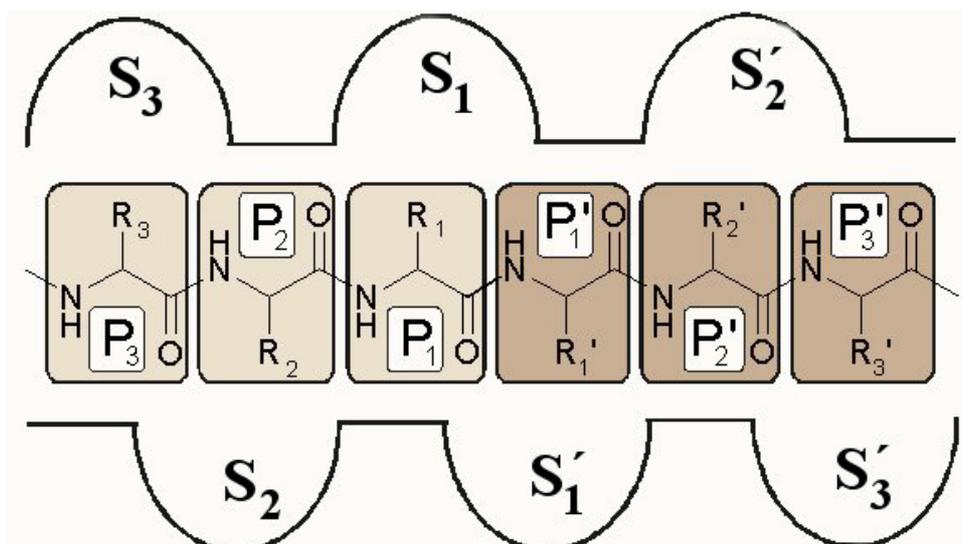


Abbildung 1-4: Konvention zur Nomenklatur von Substrat und Bindungstaschen.

1.4 Räumliche Struktur trypsin-ähnlicher Serinproteasen

Bereits 1974 wurde die dreidimensionale Struktur des Rinder-Trypsins mittels Röntgenstruktur-Analyse aufgeklärt.^[4] Seither entwickelte sich Trypsin zum Prototypen der Serinproteasen, die in der S₁-Bindungstasche eine Argininspezifität aufweisen. Diese Proteasen zeigen ein stark konserviertes Strukturmerkmal in ihren Tertiärstrukturen, wobei gleichzeitig die Primärstrukturen jedoch stark voneinander abweichen können. Ein allgemein eingeführtes Nummerierungssystem der Aminosäurereste wird aus der homologen Protease Chymotrypsin abgeleitet. Dieses Enzym weist eine beinahe identische Tertiärstruktur wie Trypsin auf, bei gleichzeitig weniger als 50% Identität in der Primärstruktur beider Proteasen. Zudem besitzt Chymotrypsin eine Substratspezifität für aromatische Reste. In trypsin-ähnlichen Proteasen ist die Positionen von sogenannten Schlüsselresten, wie die der katalytischen Triade (Asp102, His57 und Ser195) und des Asp189-Restes am Boden der S₁-Spezifitätstasche, identisch.

Ihre Tertiärstruktur ist vorwiegend aus β -Faltblättern aufgebaut und durch 2 Domänen charakterisiert, wobei jede Domäne ein „ β -barrel“ ausbildet. Die „active-site cleft“, die die katalytische Triade und die Substratbindungstasche beinhaltet, ist genau zwischen diesen beiden Domänen lokalisiert. Jede der „barrel“-ähnlichen Domänen ist aus 6 anti-parallel laufenden Strängen aufgebaut, wobei 4 der 5 verbindenden „loops“ sogenannte Haarnadel-Schleifen sind. Neben wenigen, kurzen Helices besitzen alle Enzyme eine lange C-terminale α -Helix (Abbildung 1-5, rot dargestellt).

Die Brookhaven Protein-Datenbank verzeichnete bis Ende Juli 2003 213 Röntgenkristallstrukturen von Trypsin, 147 von Thrombin, aber nur 25 von Faktor Xa und 16 vom Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA). Etliche dieser Strukturen stellen Komplexe mit synthetischen oder natürlichen Inhibitoren dar, die aufgelöst wurden, um den genauen Bindungsmodus und die Selektivität der Inhibitoren aufzuklären und diese so rational verbessern zu können. Dass es verhältnismäßig wenige Röntgenstrukturen von Faktor Xa und uPA gibt, weist auf die Schwierigkeiten hin, die bei der Kristallisation dieser beiden Proteasen häufig auftreten.

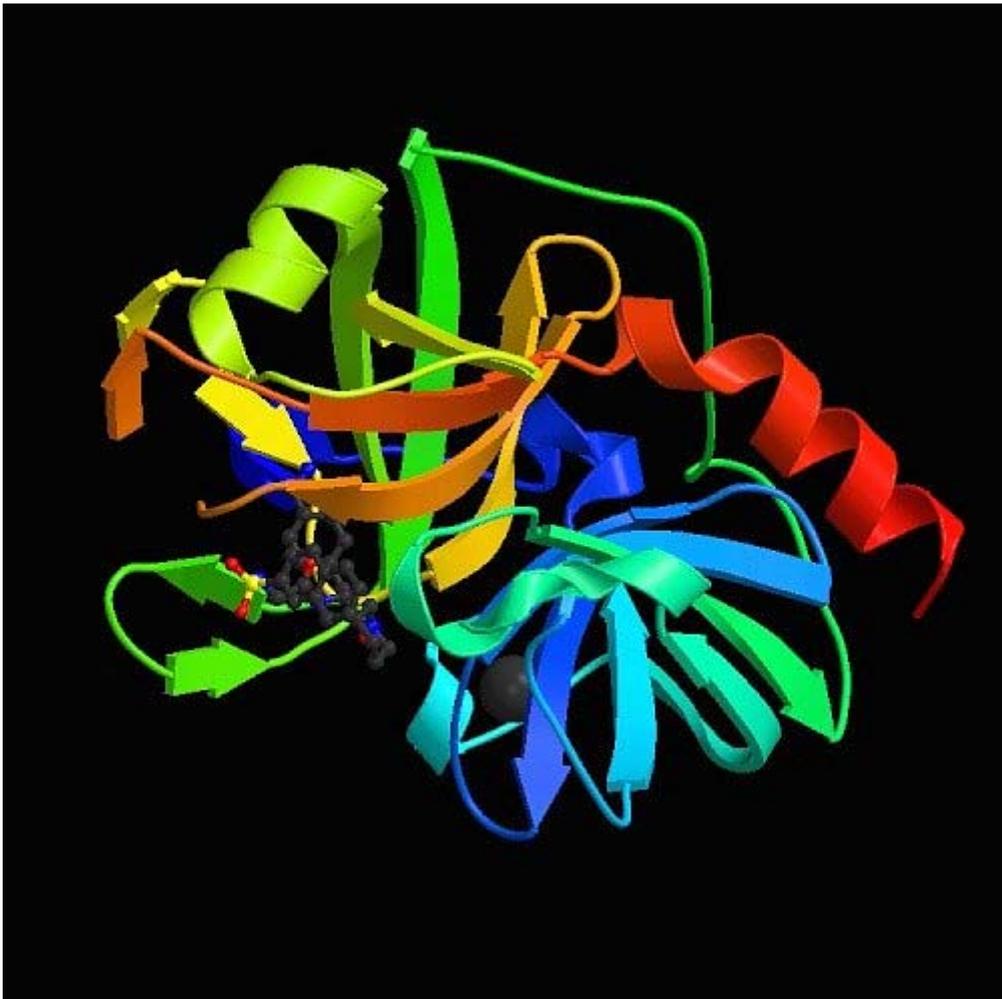


Abbildung 1-5: Die Tertiärstruktur von β -Trypsin im Komplex mit dem Thrombin-Inhibitor NAPAP (PDB-Code: **1PPC**), dargestellt im Richardson-Diagramm. Sekundärstrukturelemente wie α -Helix und β -Faltblatt werden als helikales Band bzw. verdrehte Pfeile wiedergegeben ^[5].

Da diese beiden Enzyme jedoch sehr interessante pharmazeutische Targets in der medizinischen Therapie schwerwiegender Erkrankungen darstellen, wurde und wird die hohe strukturelle Ähnlichkeit von trypsin-ähnlichen Serinproteasen genutzt, um stellvertretend Komplexstrukturen von Faktor Xa- oder uPA-Inhibitoren mit Trypsin anzufertigen, die sich oft leichter kristallisieren lassen. Anschließend ist es möglich mit Hilfe von Computermethoden die Trypsin/Inhibitor-Komplexstruktur mit einer bereits bekannten Struktur des Targetenzym zu überlagern („Superimposition“).

Daraus können unter Umständen Informationen über den annähernden, realen Bindungsmodus des Inhibitors erhalten werden.^[5-12]

1.5 Struktur der aktiven Zentren von Trypsin, Thrombin, Faktor Xa, und uPA

Bei fast identischer Tertiär- und Sekundärstruktur unterscheiden sich die trypsin-ähnlichen Serinproteasen jedoch signifikant in einigen Bereichen innerhalb ihrer Aminosäuresequenz. Durch diese Unterschiede, die für die Selektivität der einzelnen Proteasen eigentlich verantwortlich sind, entstehen unterschiedliche räumliche Strukturierungen an der Oberfläche und der „active site cleft“ der Enzyme, aus denen die Substratspezifitäten resultieren, die wiederum für die korrekte Steuerung zellulärer und extrazellulärer Prozesse auf molekularer Ebene eminent wichtig sind. Diese strukturellen Verschiedenheiten werden auch beim Design von synthetischen Inhibitoren gezielt adressiert, um möglichst selektiv eine Protease inhibieren zu können. Gerade bei der sehr großen Familie der trypsin-ähnlichen Serinproteasen, die eine zentrale Rolle in weiten Bereichen von wichtigen, biologischen Prozessen spielen - wobei viele, wenn dereguliert, zu pathologischen Zuständen führen können - ist eine möglichst selektive Intervention fundamental.

In Tabelle 1-3 sind die strukturellen Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Bindungstaschen S₁-S₃/S₄ von Trypsin, Faktor Xa, Thrombin und uPA schematisch dargestellt.^[11]

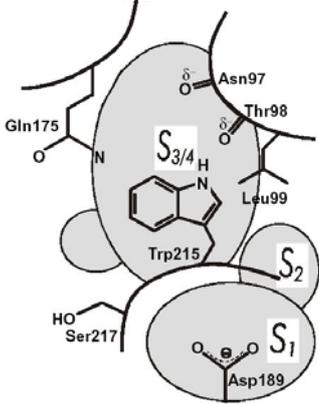
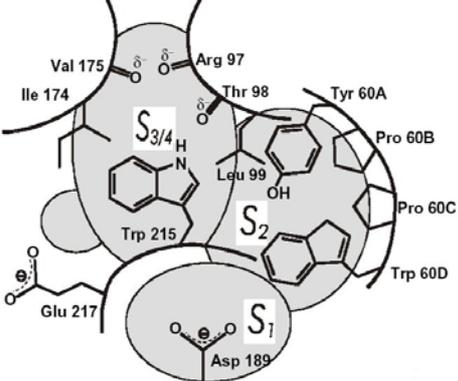
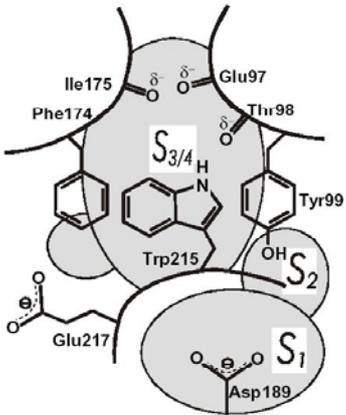
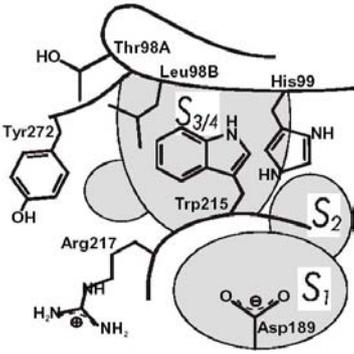
Protease	S ₁ -Tasche	S ₂ -Tasche	S ₃ /S ₄ -Tasche
 <p>Trypsin</p>	Asp 189	klein	groß
 <p>Thrombin</p>	Asp 189	groß, hydrophob, „60- insertion- loop“	groß, elektronegativer Hohlraum
 <p>Faktor Xa</p>	Asp 189	klein	groß, sehr hydrophob, elektronegativer Hohlraum
 <p>uPA</p>	Asp 189	klein, „99- insertion- loop“	klein, hydrophob, „99-insertion- loop“

Tabelle 1-3: Schematischer Vergleich der Bindungstaschen S₁-S₃/S₄.

Betrachtet man die S₁-Regionen, so ist allen trypsin-ähnlichen Serinproteasen die Ausbildung einer relativ tiefen, arginin- bzw. lysinspezifischen Bindungstasche gemeinsam, womit die selektive Erkennung des Strukturelements der basischen Arginin- bzw. Lysinseitenkette erfolgt. Hierbei bildet sich eine Salzbrücke zwischen der negativ geladenen Carboxylgruppe des Asp189, am Grund der S₁-Tasche, und der positiv geladenen Guanidino- bzw. Aminogruppe des Arginins bzw. Lysins in der erkannten Substratsequenz aus. Bei den hier verglichenen Proteasen ist bei Trypsin und uPA zusätzlich noch eine Wasserstoffbrücke zwischen der Seitenkette des Ser190-Restes und der ε-NH-Gruppe der Guanidinofunktion möglich. Diese Interaktion ist bei Thrombin und Faktor Xa nicht möglich, weil diese Enzyme statt eines Serins in dieser Position eine Alanin-Mutation besitzen.

Blickt man auf die S₂-Regionen, so existieren im Vergleich der genannten Enzyme bereits größere Unterschiede. Thrombin bildet eine große, hydrophobe Tasche aus, die beispielsweise Prolinreste in P₂-Position des Substrates sehr gut erkennen und damit interagieren können. Diese S₂-Tasche wird durch den sogenannten „60-insertion-loop“, bestehend aus Tyr60A, Pro60B, Pro60C und Trp60D, und den Aminosäuren His57, Ser214 und Leu99 geformt. Bei uPA tritt hingegen ein entgegengesetzter Effekt auf, da die S₂-Tasche durch den „99-insertion-loop“ aus Thr98A und Leu98B in Verbindung mit His99 stark verkleinert ist. In dieser Region werden folglich nur kleine Aminosäurereste wie Glycin erkannt und interagieren. Dieser „99-loop“ hat bei uPA sogar Auswirkungen bis in die S₃/S₄-Region hinein, die dadurch räumlich beschränkt und sehr hydrophob ist.

Im Vergleich der S₃/S₄-Regionen ist diese bei Faktor Xa sehr groß und sehr hydrophob im Gegensatz zu uPA. Am oberen Ende dieser Region befindet sich ein elektronegativer Hohlraum, der von der Aminosäure Glu97 und den Carbonyl-Resten von Ile75 und Thr98 ausgebildet wird. Dieser Bereich kann beim Design von synthetischen Inhibitoren durch die Verwendung einer zweiten basischen Gruppe (Bis-basische Inhibitoren) für eine weitere ionische Wechselwirkung adressiert werden.^[13] Allerdings besitzt auch beispielsweise Thrombin diesen elektronegativen Bereich, so dass bezogen auf Faktor Xa mit diesem Prinzip alleine keine selektiven Inhibitoren erzeugt werden können.

2 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten mit den Methoden des rationalen Wirkstoffdesigns („Rational Drug Design“) die Leitstrukturen niedermolekularer Inhibitoren der beiden trypsin-ähnlichen Serinproteasen Faktor Xa und Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) synthetisiert werden. Dabei sollten iterativ nicht nur die Hemmwirkung und die Selektivität der Verbindungen gegenüber den relevanten Serinproteasen, sondern auch deren biologische Aktivität verbessert werden. Darüber hinaus sollten Fragen über den vorliegenden Bindungsmodus der Leitstrukturen zum Zielenzym und zur biologischen Aktivität ausgewählter Derivate geklärt werden.

2.1 Hemmung von Faktor Xa durch niedermolekulare Inhibitoren

Die Untersuchung und Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren im Bereich der antithrombotischen Wirkstoffe stieß in den letzten Jahren auf ein zunehmendes Interesse. Dabei erkannte man, dass die direkte Hemmung von Thrombin zu nicht-tolerierbaren Nebenwirkungen wie Blutungskomplikationen führen kann. Die Entwicklung potenter und selektiver Faktor Xa-Inhibitoren als antithrombotische Wirkstoffe, bietet die Möglichkeit diese Problematik zu umgehen und somit den Raum für moderne Therapieansätze. Darüber hinaus verdichten sich die Hinweise, dass Faktor Xa zusätzlich in Prozessen der Tumorprogression und Metastasierung eine wichtige Rolle spielt.^[14]

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine bestehende Leitstruktur, die auf einer (*R*)-3-Amidinophenylalanin-Grundstruktur basierte^[15], durch geeignete Derivatisierungsschritte weiter zu optimieren. Als Bewertungskriterien sollten neben verbesserter inhibitorischer Potenz und Selektivität gegenüber relevanten Serinproteasen auch die chemische Stabilität der Leitstruktur selbst dienen. Darüber hinaus sollte der Bindungsmodus zu Faktor Xa aufgeklärt werden sowie Fragen zur biologischen Aktivität ausgewählter Derivate im Bereich Blutgerinnung und Metastasierung beantwortet werden. Für die in der Leitstruktur enthaltene Amidino-Ankergruppe

sollte im Rahmen der Arbeit zudem die Zugänglichkeit und Synthesebedingungen der Derivate mittels Schutzgruppenstrategie und Synthese an fester Phase untersucht und verbessert werden.

2.2 Hemmung von uPA durch niedermolekulare Inhibitoren

Die erwiesene, hohe klinische Relevanz des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) in der Tumorprogression und Metastasierung macht dieses Enzym zu einem interessanten pharmazeutischen Target für moderne Therapieansätze im Bereich von Krebserkrankungen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zwei bestehende Leitstrukturen, basierend auf einer 4-(Aminomethyl)-phenylguanidin-Grundstruktur, durch geeignete Derivatisierungsschritte zu optimieren.^[16] Dabei sollten in der Leitstruktur Strukturelemente der Malonsäure eingeführt werden, um zusätzliche Derivatisierungen über die Carboxylgruppen zu erlauben. Bei der zweiten Leitstruktur sollte das D-Serin-Strukturelement durch D-Diaminopropionsäure ersetzt werden, um über Derivatisierungen der Amino-Funktion die Bioverfügbarkeit zu verbessern. Als Bewertungskriterien der neuen Inhibitoren sollten verbesserte Inhibitionskonstanten und Selektivität gegenüber relevanten Serinproteasen dienen. Für die in der Leitstruktur enthaltene Guanidino-Ankergruppe sollten im Rahmen dieser Arbeit zudem Zugänglichkeit und Synthesebedingungen der Derivate durch Synthese an fester Phase untersucht und verbessert werden. Zentrale Fragestellung dabei war die Guandinylierung der relativ inerten aromatischen Aminogruppe der Anilinvorstufe bei gleichzeitiger Verknüpfung an die feste Phase.

3 Faktor Xa-Inhibitoren

3.1 Der Prozess der Blutgerinnung

Dem Blut kommt durch seine vielfältigen, essentiellen Funktionen eine zentrale Bedeutung in den höheren Lebewesen zu. Zu den Hauptaufgaben gehören dabei der Transport zahlreicher Stoffe wie der der Atemgase Sauerstoff und Kohlendioxid, von Nährstoffen oder verschiedenen Stoffwechselprodukten, zudem homöostatische Funktionen wie die Regulation der Wärmeabgabe und die Konstanthaltung des pH-Wertes. Ebenfalls dazu gehören die körperweite Signalübermittlung durch Hormone und nicht zuletzt die Abwehr körperfremder Stoffe durch phagozytierende und antikörperbildende Blutzellen (Leukozyten).

Das Blut besteht hauptsächlich aus Blutplasma und den darin suspendierten zellulären Bestandteilen, den roten und weißen Blutzellen (Erythrozyten und Leukozyten) und den Blutplättchen (Thrombozyten). Der Anteil der Blutzellen am Blutvolumen wird auch Hämatokrit genannt und beträgt bei Menschen zwischen 41 und 46 Volumenprozent.^[17]

Die Blutgerinnung ist der Hauptverteidigungsmechanismus des Körpers gegen Blutverlust durch Verletzungen an den Gefäßen. Um den Verlust der für die Lebensfunktionen so wichtigen Substanz sofort zu unterbinden, hat die Evolution einen sehr wirkungsvollen katalytischen Prozess entwickelt, der garantiert, dass kleinste Mengen eines auslösenden Faktors genügen, um über eine Vielzahl von Schritten eine größere Verstärkung zu erreichen und so eine schnelle Antwort auf eine Verletzung zu gewährleisten. Der Hauptvorgang der Gerinnung besteht eigentlich darin, dass lösliches Fibrinogen (Faktor I) in unlösliches Fibrin überführt wird, das zu einem festen Fibringerinsel vernetzt wird, um zusammen mit den Blutplättchen verletzungverschließende Blutgerinsel zu bilden. Da dieser Prozess kaskadenartig abläuft, bezeichnet man ihn auch als Blutgerinnungskaskade.^[18]

Blickt man auf eine schematische Darstellung dieser Kaskade, so zeigt diese einen Aufbau aus drei Hauptteilen (Abbildung 3-1).

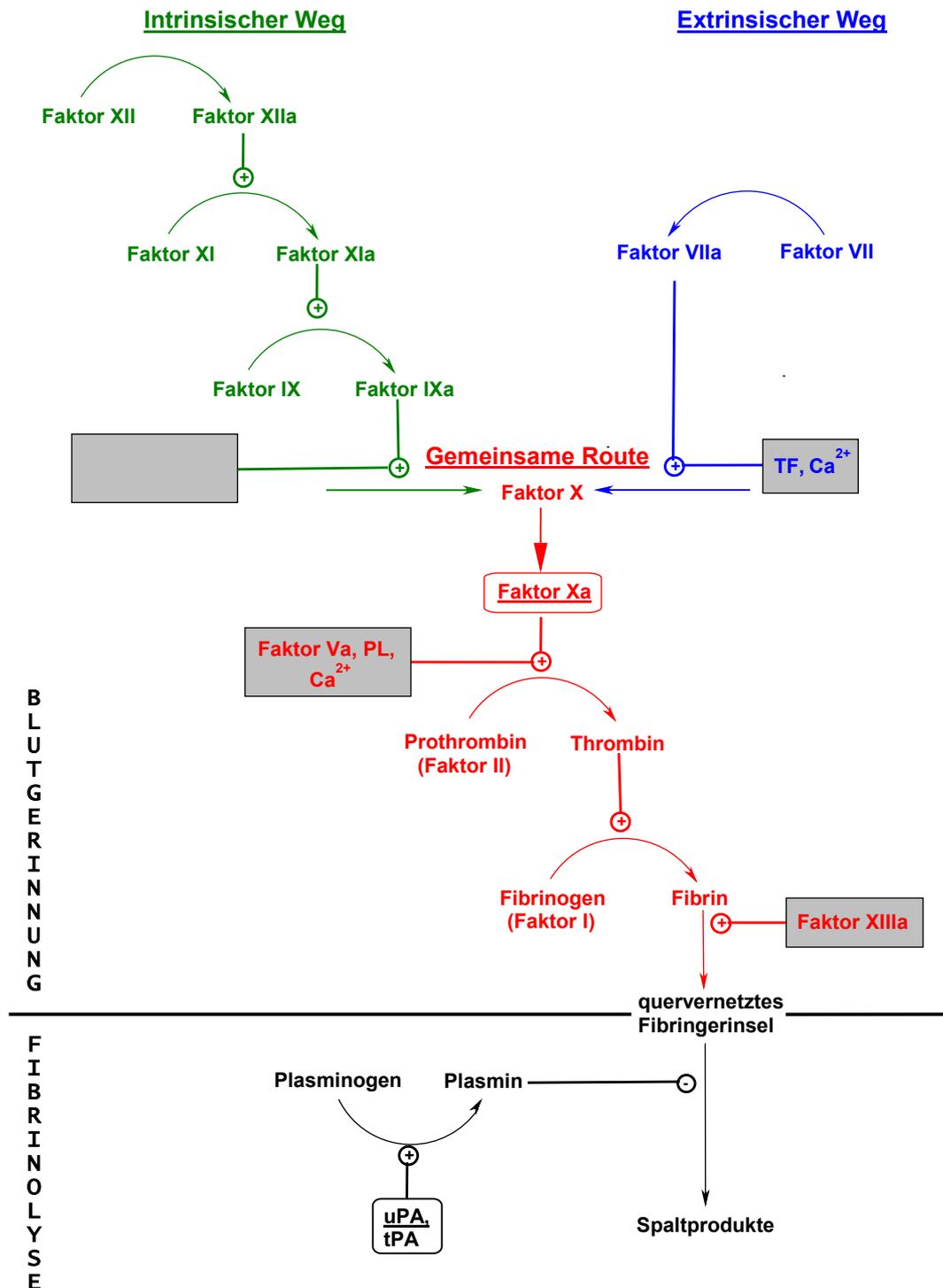


Abbildung 3-1: Vereinfachtes Schema der Blutgerinnungskaskade mit Fibrinolyse. Der intrinsische Weg ist in Grün, der extrinsische Weg ist in Blau und die gemeinsame Route ist in Rot dargestellt. Für die Aktivierung notwendige Cofaktoren sind grau eingerahmt, Aktivierungsschritte sind mit (+) und Abbauschritte sind mit (-) wiedergegeben. Phospholipid ist mit PL und „Tissue Factor“ (Faktor III) ist mit TF abgekürzt.

Abhängig von der Art der Verletzung eines Gefäßes können zwei Aktivierungskaskaden unterschieden werden, die in einem Punkt in eine gemeinsame Route münden. Im Falle einer Verletzung mit Kontakt zu unphysiologischen Oberflächen, also von außen, findet eine Kontaktaktivierung von Faktor XII an „Rauigkeiten“ der endothelialen Auskleidung der Gefäßwände statt und die Blutgerinnungskaskade wird über den intrinsischen Weg, auch intravaskuläres System genannt, aktiviert (Abbildung 3-1, grün dargestellt). Bei einer Verletzung ohne direkten Kontakt zu unphysiologischen Oberflächen, beispielsweise stumpfe Einwirkung auf Gefäße, wird „Tissue Factor“ (TF, Faktor III) aus dem endoplasmatischen Retikulum beschädigter oder zerstörter Gewebezellen freigesetzt und die Kaskade wird dann über den extrinsischen Weg, auch als extravaskuläres System bezeichnet, mittels der Aktivierung von Faktor VII initiiert (Abbildung 3-1, blau dargestellt).

Die beiden Aktivierungskaskaden münden schließlich in einer gemeinsamen Route, an deren Anfang Faktor X in seine aktivierte Form, Faktor Xa, überführt wird. Faktor Xa wird somit eine zentrale Rolle im Ablauf dieser Aktivierungskaskade zuteil, da er den Konvergenzpunkt aller kaskadischen Wege darstellt. Zusammen mit dem Cofaktor Va und in Gegenwart von zweifach geladenen Calciumkationen an Phospholipid-Membranen bildet freier Faktor Xa rasch den sogenannten Prothrombinase-Komplex, der im weiteren Verlauf Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin aktiviert, das wiederum Fibrinogen (Faktor I) in Fibrin umwandelt. Zusammen mit Faktor XIIIa, das als einziges Enzym der Kaskade als Transglutaminase keine Serinprotease ist, findet schließlich die Quervernetzung zum Fibringerinsel statt (Abbildung 3-1, rot dargestellt).

Bestehende Blutgerinnsel werden durch Plasmin (Fibrinolyse) im Rahmen der Gefäßrekonstruktion letztendlich wieder aufgelöst (Abbildung 3-1, unten).

3.2 Pharmazeutische Targets in der Blutgerinnungskaskade

Blutgerinnungsstörungen, wie arterielle und venöse Thrombose mit ihren schwerwiegenden Folgen wie beispielsweise Embolie, Herzinfarkt oder Schlaganfall, repräsentieren immer noch die Hauptursache für Invalidität und Todesfall sowohl in den westlichen Industriestaaten als auch in den Entwicklungsländern.^[19;20] Weltweite klinische und experimentelle Studien weisen klar darauf hin, dass Abweichungen im normalen Blutfluss, Aktivierung von Blutplättchen und der Blutgerinnungskaskade oder eine eingeschränkte Fibrinolyse die Ursachen für die Pathogenese intravaskulärer Thrombosen und darauf bezogener Embolien darstellen. Obwohl sich die Behandlungsstrategien für Thromboseerkrankungen mit neueren diagnostischen und operationsbezogenen Methoden über die letzten Jahre hin stark verbessert haben, stellt eine effektive antithrombotische Therapie mittels Medikamenten bei minimalen Nebeneffekten weiterhin eine Herausforderung für die medizinische Chemie dar. Deshalb wurden nicht nur im letzten Jahrzehnt große Anstrengungen unternommen, um den an der Thrombose beteiligten Mechanismus detailliert zu verstehen und daraus abgeleitet neuartige Substanzen für die Intervention zu entwickeln, die den Ansprüchen einer sicheren Prävention und Behandlung dieser Erkrankungen genügen.^[20]

Die derzeitige Therapie ist seit mehr als 50 Jahren im klinischen Einsatz und beinhaltet Medikation mit Heparinen oder Warfarin. Beide Therapien beinhalten jedoch Risiken und limitieren somit erheblich die medikamentöse Einsatzfähigkeit dieser Substanzen. Heparin wirkt antikoagulierend aufgrund der Aktivierung von Antithrombin, das die Serinproteasen Thrombin und Faktor Xa zu hemmen vermag. Man unterscheidet hierbei zwischen „Unfractionated“ Heparin (UFH) und „Low Molecular-Weight Heparin“ (LMHWs). UFH, das in seiner Größe sehr heterogen ist, besitzt aufgrund seiner variablen Dosis-Wirkung-Beziehung ein sehr enges therapeutisches Fenster und impliziert die Notwendigkeit einer ständigen Überwachung der Blutgerinnungswerte.^[21] LMWHs hingegen, die durch den chemischen oder enzymatischen Abbau aus UFH gewonnen werden können, besitzen eine verminderte Bindung zu Plasmaproteinen und Blutplättchen.^[22;23] Daraus folgt eine leichter abschätzbare Blutgerinnungshemmung, die meist eine sicherere Verabreichung ohne

Routinekontrollen ermöglicht. Weitere Nachteile der Heparine sind, dass sie nur unter Umgehung des Verdauungstraktes verabreicht werden können und ihnen bei Langzeitbehandlungen, insbesondere bei UHF, eine Beziehung zur Bildung von Osteoporose zugeordnet wird.

Warfarin hingegen kann oral verabreicht werden und wirkt als Vitamin K-Antagonist, wodurch es die Vitamin K abhängigen Gerinnungsfaktoren beeinflusst.^[24] Aufgrund einer nahrungsbezogenen Variabilität in der Vitamin K-Aufnahme, vielfältiger Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln und Störungen, die die Vitamin K-Aufnahme beeinträchtigen, was wiederum zu uneinschätzbaren Gerinnungseffekten führen kann, besitzt jedoch Warfarin nur ein sehr enges therapeutisches Fenster.^[25] Folglich besteht ebenfalls der Bedarf regelmäßiger Überwachung der Gerinnungswerte, was die Behandlungskosten und den Aufwand durch ständige Patientenbetreuung erhöhen. Da abhängig von der Dosierung ein gerinnungshemmender Effekt erst nach 4-7 Tagen auftritt, muss eine Warfarintherapie zudem anfangs mit einer Heparintherapie kombiniert werden.^[26]

Was sollte ein ideales gerinnungshemmendes Medikament also für Eigenschaften haben? Die derzeitigen Begrenzungen drehen sich hauptsächlich um erhöhte Blutungsrisiken und den hohen Aufwand für Patient und Arzt durch ständige Überwachung sowie nicht oraler Verabreichungsform. Ein idealer Gerinnungshemmer sollte folgende Kriterien erfüllen.^[27]

- minimale Wechselwirkungen mit Nahrung und anderen Medikamenten, bei geringer, nicht spezifischer Plasma-Protein-Bindung (ergibt einen abschätzbaren Gerinnungseffekt)
- ein großes therapeutisches Fenster (verhindert ständig notwendige Überwachung der Gerinnungswerte)
- ein schnelles Ansprechen der Behandlung („rapid onset of action“) (verhindert eine Kombinationstherapie mit anderen Medikamenten)
- ein schnelles Abklingen der Behandlung nach einer Absetzung („rapid offset of action“) (erlaubt ein einfacheres Management bei auftretenden Blutungen)

Aufgrund dieser genannten Vorbedingungen werden weitere pharmazeutisch relevante Ziele, auch Targets genannt, für Interventionsstrategien untersucht. Derzeit befinden sich NO-Aspirine, Aktivatoren der Guanylat-Cyclase und Antagonisten des Blutplättchen gpIIb/IIIa-Rezeptors, des Blutplättchen-Collagen-Rezeptors, des Thromboxan A₂-Synthetase-Rezeptors und des ADP-Rezeptors in verschiedenen wissenschaftlichen Untersuchungen. Darüber hinaus sind Inhibitoren des Gewebefaktors (TF), des Plasminogen Aktivator-Inhibitors-1 (PAI-1), der Thromboxan A₂-Synthetase, des von Willebrand-Faktors und des P-Selektins in der Forschung adressiert.

Dabei wurden natürlich auch die an der Kaskade direkt beteiligten Serinproteasen als mögliche Ziele erkannt: die Faktoren XIIa, XIa, IXa, und im Vordergrund auch Thrombin und Faktor Xa, dem wegen seiner zentralen Position eine wichtige Bedeutung zukommt. Übersichtsweise können die Blutgerinnungskaskade und antithrombotische Klassen wie in Abbildung 3-2 zusammengefasst dargestellt werden.^[20]

Über lange Jahre war Thrombin wegen seiner zentralen Rolle in thrombotischen Erkrankungen als Enzym eines der pharmazeutischen Hauptziele in der Inhibitorforschung für antithrombotische Therapieansätze. Aufgrund der Erkenntnis, dass die Hemmung von Thrombin nur mit geringer Effektivität verläuft, da es

physiologisch meist an Blutgerinsel gebunden vorliegt, und ausreichend hohe Dosen dabei zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Auftretens von untolerierbaren, schweren Blutungskomplikationen führt, wurde in den letzten Jahren verstärkt versucht, Inhibitoren für Faktor Xa mit entsprechenden Eigenschaften zu entwickeln.^[28;29] Faktor Xa bietet sich als Target an, da es aufgrund seiner zentralen Position am Konvergenzpunkt von intrinsischem und extrinsischem Weg innerhalb der Blutgerinnungskaskade und des Verstärkungscharakters der Kaskade - ein Faktor Xa-Molekül kann 138 Moleküle Thrombin produzieren - den meist logischen Hemmungsansatz darstellt und mit geringen Dosen sowie damit erhöhter Sicherheit inhibiert werden könnte.^[19;30;31] Die Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren spielt hierbei eine entscheidende Rolle.

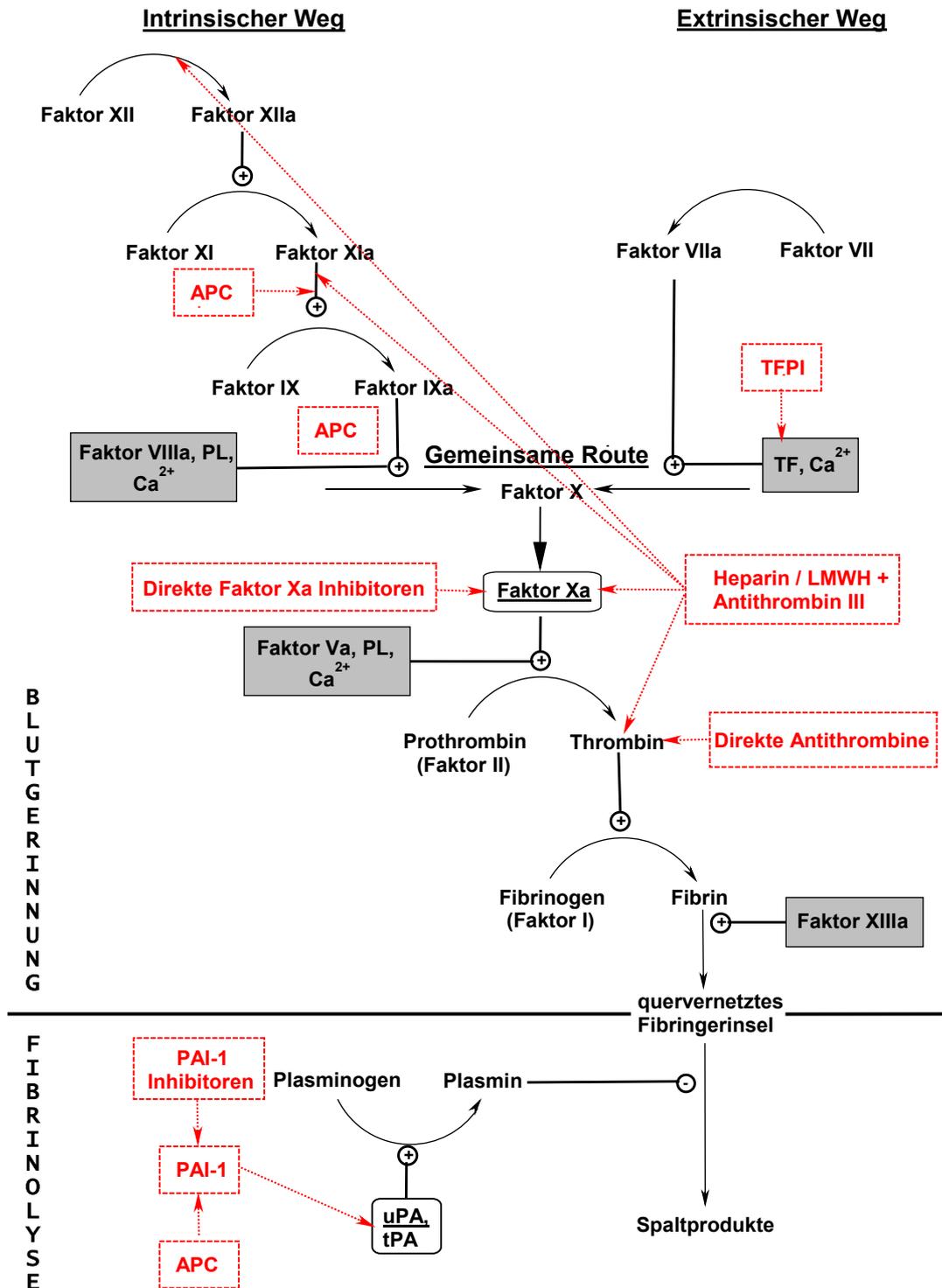


Abbildung 3-2: Blutgerinnungskaskade und antithrombotische Klassen. Inhibitionsklassen sind durch gestrichelte Kästchen in Rot und deren natürliche sowie pharmazeutische Targets sind durch hinweisende gestrichelte Pfeile, ebenfalls in Rot dargestellt. APC: Aktiviertes Protein C, LMWH: „Low Molecular Weight Heparin“, PAI-1: „Plasminogen Activator Inhibitor-1“, TFPI „Tissue Factor Pathway Inhibitor“.

3.3 Faktor Xa

Mitte der 50er Jahre wurde evident, dass die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin in die Blutgerinnungskaskade noch von einem weiteren Faktor als den Faktoren VII und IX abhängen musste. 1957 fand man heraus, dass *in vitro* Gerinnungsproben von bestimmten Patienten, bei denen man angenommen hatte, dass Faktor VII fehlt, wieder normalisiert werden konnten, indem man die Proben mixte.^[32;33] Der neue Faktor wurde anfangs aufgrund einer einzigartigen Blutungsstörungen nach den Namen der ersten beiden entdeckten Patienten als „Stuart’s Factor“ oder „Prower’s-Factor“ bezeichnet.^[34] Später wurde ihm analog zur römischen Zahlenbenennung der anderen bereits bekannten Faktoren die römische Zahl „X“ zugeordnet, was letztlich seinen Namen ergab. Faktor X wurde erstmals 1968 aus dem Rinderplasma in reiner Form isoliert und stellt das Proenzym einer Serinprotease mit trypsin-ähnlicher Spezifität dar.^[35] Die Faktor X-Struktur wurde 1986 durch cDNA-Sequenzierung bestimmt und eine Röntgenkristallstruktur konnte erstmals 1996 gelöst werden.^[36;37]

Die Aktivierung zu Faktor Xa geschieht wie in Kapitel 3.1 bereits beschrieben über den intrinsischen oder extrinsischen Weg und stellt zugleich deren Konvergenzpunkt dar. Zusammen mit zweifach geladenen Calciumkationen an Phospholipid-Membranen bildet freier Faktor Xa rasch den sogenannten Prothrombinase-Komplex, der im weiteren Verlauf Prothrombin zu Thrombin umwandelt.

Faktor X wird in der EC-Liste (Enzyme Commission) unter EC 3.4.21.6 geführt und gehört damit zu der Familie S1 der trypsin-ähnlichen Serinproteasen zum Clan SA.^[1]

3.4 Natürliche Faktor Xa-Inhibitoren

Die körpereigene Regulierung der Blutgerinnung stellt ein sehr komplexes System dar. Außer Faktor VIIa können die aktiven Gerinnungsenzyme durch das Antithrombin III (ATIII), einem Glykoprotein, inhibiert und somit reguliert werden. Bei einer Heparintherapie wird übrigens gerade die ansonsten langsam verlaufende Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes zwischen ATIII und Faktor Xa stark beschleunigt, womit folglich indirekt die Inhibition aller Gerinnungsenzyme gefördert wird. Bei LMWHs kommt es zu einer selektiven Inhibition von Faktor Xa, da nur die Bildung des ATIII-Faktor Xa-Komplexes beschleunigt wird, während es keine Auswirkung auf die Inhibition der anderen Gerinnungsenzyme gibt.

Als weitere wichtige körpereigene, gerinnungshemmende Enzyme sind das Protein C und das Protein S zu nennen. Protein C inaktiviert durch proteolytische Spaltung die Blutgerinnungsfaktoren Faktor V und Faktor VIII, so dass die Blutgerinnungskaskade und damit die folgende Thrombinproduktion unterbrochen wird. Protein S ist dabei ein sogenannter Co-Faktor des Protein C.^[38]

Darüber hinaus kann noch der „Tissue Factor Pathway Inhibitor“ (TFPI) genannt werden, der in rekombinanter Form im Tierversuch die Thromboseentwicklung unterbinden konnte.^[39]

Aufgrund der Notwendigkeit, einen steten Blutfluss zur Nahrungsaufnahme aufrechtzuerhalten, hat die biologische Evolution sehr potente, selektive Inhibitoren verschiedener Enzyme der Blutgerinnungskaskade hervorgebracht, die im Speichel hämatophager Tiere gefunden werden können. Darunter konnten bisher auch einige selektive Faktor Xa-Inhibitoren isoliert werden.^[40;41] Als interessante Beispiele sind hierbei zu nennen:

- **Antistasin (ATS):** wurde aus dem mexikanischen Blutegel *Haementeria officinalis* isoliert und ist ein cysteinreiches, einstrangiges Polypeptid, das aus 119 Aminosäuren besteht. Es ist auch eine rekombinante Form (rATS) bekannt mit $K_i = 43$ pM, das keinen Effekt auf Thrombin selbst besitzt.^[42;43]
- **Tick Anticoagulant Peptide (TAP):** wurde aus der Weichzecke *Ornithodoros moubata* isoliert und ist ein disulfidverbrücktes, monomeres Protein, das aus 60 Aminosäuren besteht. Hierbei ist auch eine rekombinante Form (rTAP) mit $K_i = 200$ pM bekannt, deren Selektivität gegenüber Thrombin (FXa/Thrombin) 90000 beträgt.^[44;45]
- **Yagin:** wurde aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis* isoliert und ist ein Polypeptid, das aus 133 Aminosäuren aufgebaut ist und 22 Cysteine enthält. Es wurde auch schon rekombinant hergestellt. Die Halbwertszeit in Pavianen beträgt mehr als 2 h und in einem Hasen-Thrombosemodell war Yagin als Zusatz zur tPA-Thrombolyse dem Einsatz von Hirudin oder Heparin überlegen.^[46;47]
- **Ancylostoma Caninum Anticoagulant Peptide (AcAP):** wurde aus dem Hakenwurm *Ancylostoma caninum* isoliert.^[48;49]
- **Faktor Xa-Hemmstoff der Gelbfiebermücke:** wurde aus den Weibchen der Gelbfiebermücke *Aedes aegypti* isoliert, da die männlichen Mücken kein Blut saugen.^[50]
- **Draculin:** wurde aus der Vampirfledermaus *Desmodus rotundus* isoliert.^[51]

3.5 Synthetische Faktor Xa-Inhibitoren

Die bereits in der Einleitung in Kapitel 1.5 beschriebene Beschaffenheit des aktiven Zentrums von Faktor Xa mit einer tiefen, elektronegativen S₁-Bindungstasche und einem elektronegativen Hohlraum im oberen Bereich der S₃/S₄-Region liefert die Basis für das sogenannte „Rational Drug Design“ synthetischer, niedermolekularer Inhibitoren. Aufgrund der symmetrischen Natur der S₁- und der S₃/S₄-Tasche, in welcher beide sowohl hydrophobe als auch positiv geladene Molekülelemente binden können, ergeben sich nach dem Adressierungsprinzip verschiedene Klassen von synthetischen Faktor Xa-Inhibitoren.^[52]

- Diamidino- und Bisbasische Faktor Xa-Inhibitoren
- Mono-Benzamidin Faktor Xa-Inhibitoren
- Nicht-Benzamidin Faktor Xa-Inhibitoren

Im folgenden sollen nun einige der neueren Entwicklungsbeispiele aus den drei oben gezeigten Gruppen exemplarisch vorgestellt werden. Etwas ältere oder klassische Vertreter von Inhibitoren, wie beispielsweise *Tenstop* oder *Daichi DX-9065a*, sind bereits in einschlägigen Veröffentlichungen beschrieben.^[53;54]

Diamidino- und Bisbasische Faktor Xa-Inhibitoren

Erste reine Diamidino-Verbindungen sind Ende der 70er, Anfang der 80er Jahre synthetisiert worden. Neuere Verbindungen haben fast immer eine zweite basische Gruppe, die keine Amidinfunktionalität darstellt. Zahlreiche bisbasische Verbindungen wurden in den letzten Jahren veröffentlicht, darunter auch *YM-60828* (**1**, Abbildung 3-3), welches einen $K_i = 1.3$ nM besitzt. Von dieser Leitstruktur sind in jüngerer Zeit auch weitere sehr aktive und interessante Derivate hergestellt worden.^[55] Ein weiteres Beispiel ist die Verbindung *ZK-807834* (**2**, Abbildung 3-3), die mit einem

$K_i = 0.11$ nM eine bereits subnanomolare Aktivität gegenüber Faktor Xa aufweist. Das Derivat ist damit hochpotent und bemerkenswert selektiv gegenüber Faktor Xa alleine und Faktor Xa im Prothrombinase-Komplex wie in tierischen Thrombosemodellen gezeigt werden konnte.^[55] Darüber hinaus wird berichtet, dass im allgemeinen eine Hydroxy-Gruppe in *para*-Position zur Amidinofunktion als P₁-Element, wie in der Struktur von **2** enthalten, eine verbesserte *in vitro* Wirksamkeit ergibt.^[52] Oft zeigen Diamidino- und bisbasische Faktor Xa-Inhibitoren vorteilhafterweise eine sehr lange Eliminierungszeit. Jedoch ist als entscheidender Nachteil ihre meist sehr schlechte orale Bioverfügbarkeit aufgrund der beiden basischen Gruppen am Molekül zu nennen. Bei den reinen Diamidino-Derivaten fällt letzteres noch stärker ins Gewicht.

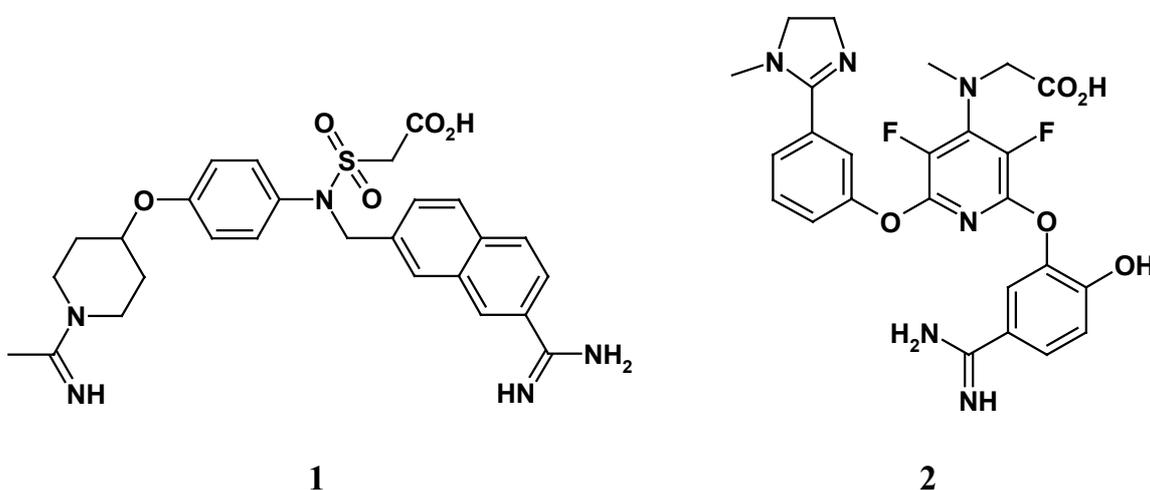


Abbildung 3-3: Strukturen von YM-60828 (**1**) und ZK-807834 (**2**).

Mono-Benzamidin Faktor Xa-Inhibitoren

Mit nur einer Amidino-Gruppe im Molekül sollte folglich eine bessere orale Bioverfügbarkeit erzielt werden. Deshalb wurde die Forschung verstärkt auf die Synthese solcher Derivate ausgeweitet. RPR-120844 (**3**, Abbildung 3-4) hat einen $K_i = 7$ nM und wurde bereits in einigen Thrombosemodellen eingesetzt. Zudem ist das Derivat mit einem $IC_{50} = 73$ nM ein potenter Inhibitor von Faktor Xa im Prothrombinase-Komplex.^[56;57] SN-429 (**4**, Abbildung 3-4) gehört zu den Biphenylbenzylsulfonamid-Derivaten und ist mit einem $K_i = 10$ pm bereits in den tiefen picomolaren *in vitro* Bereich vorgestoßen. Dennoch liegt seine in einem

Tiermodell am Hasen ermittelte *in vivo* Wirksamkeit ungefähr 2000-fach höher. Dies ist wahrscheinlich auf eine höhere Eliminierungsrate unter physiologischen Bedingungen zurückzuführen. Aus dieser Serie der Biphenylbenzylsulfonamide und auch Biphenylbenzylsulfone sind noch weitere potente Derivate synthetisiert und untersucht worden.^[58-60] Obwohl Mono-Benzamidin-Derivate eine starke *in vivo* Wirksamkeit, geringe Plasma-Protein-Bindungen und eine gute wässrige Löslichkeit zeigen, ist als entscheidender Nachteil ihre schlechte orale Bioverfügbarkeit anzuführen. Prodrug-Ansätze, bei denen beispielsweise das Amidin als Hydroxyamidin eingesetzt wird, können dieses Problem häufig auch nicht umgehen.

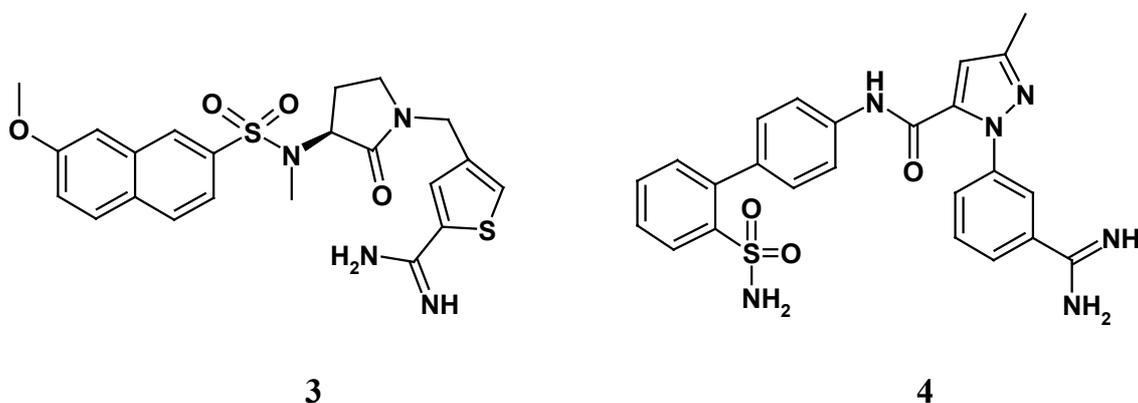


Abbildung 3-4: Strukturformeln von RPR-120844 (3) und SN-429 (4).

Nicht-Benzamidin Faktor Xa-Inhibitoren

Aufgrund der oben genannten Nachteile der Bisbasischen- und Monobenzamidin-Inhibitoren wurde die Entwicklung von P₁-Elementen, die auf Nicht-Benzamidin oder sogenannten Surrogaten von Benzamidinen beruhen, stetig voran getrieben. **5** (Abbildung 3-5) gehört zu einer entwickelten Serie von Piperazin-naphthylsulfonamiden und zeigt einen IC₅₀ = 3 nM.^[55] Es besitzt eine stark verbesserte orale Bioverfügbarkeit als Amidinverbindungen und „Modeling“-Experimente deuten darauf hin, dass der Arylsulfon-Rest als P₁-Element fungieren kann.^[61] Als ein Beispiel für Surrogate der *meta*-Benzamidine können die Derivate der Azaindole angeführt werden. Mit dem Stickstoff in der 6-Position des Indol-Ringes und einem

$K_i = 18$ nM stellt RPR-208707 (**6**, Abbildung 3-5) eine der wirksamsten Verbindungen dieser Serie dar. Der Indol-Rest bindet dabei als P_1 -Element direkt in die S_1 -Bindungstasche und ersetzt somit vollwertig das Benzamidin, wie durch eine Röntgenkristallstruktur aufgeklärt wurde.^[62] Leider sind bisher weder pharmakokinetische Profile noch *in vivo* Daten dieser interessanten Gruppe veröffentlicht worden. Generell zeigen Nicht-Benzamidin Faktor Xa-Inhibitoren aber eine hohe Wirksamkeit und eine bemerkenswerte Selektivität gegenüber Faktor Xa *in vitro*. Sie besitzen wegen ihrer erhöhten Lipophilie auch eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit als Benzamide. Andererseits führt diese Eigenschaft aber auch dazu, dass diese Verbindungen hohe Anteile an Plasmaproteinbindungen (oft > 99 %) eingehen und somit eine stark verminderte *in vivo* Aktivität aufweisen.

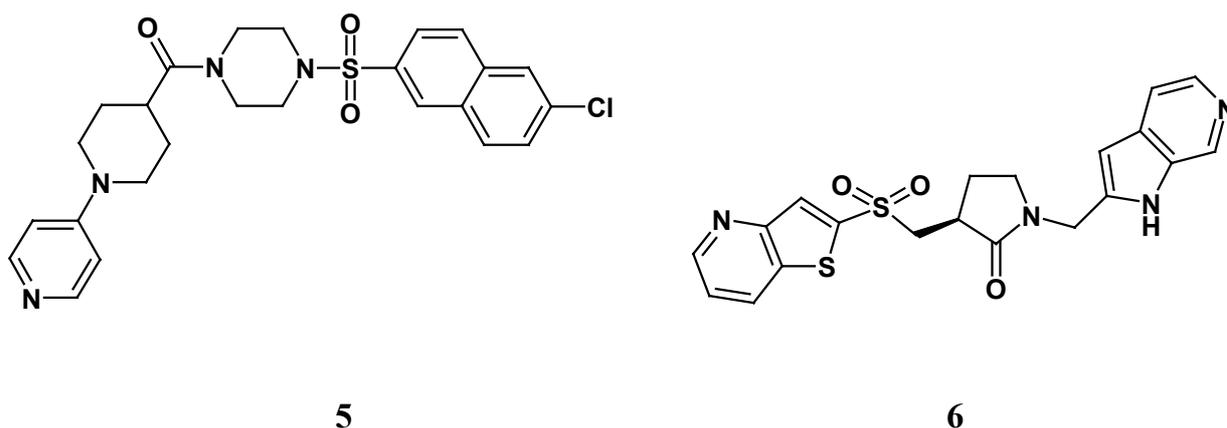


Abbildung 3-5: Strukturen des Piperazin-naphthylsulfonamids (**5**) und von RPR-208707 (**6**).

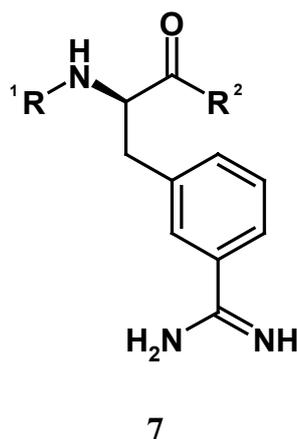
Zusammenfassend kann aus pharmakokinetischer Sicht gesagt werden, dass Verbindungen mit moderater Lipophilie und guter wässriger Löslichkeit (bevorzugt $\log D$ im Bereich von 1-4) erwünscht sind. Um einen klinisch brauchbaren, oralen Faktor Xa-Inhibitor zu entwickeln, müssen deshalb sehr überlegte und systematische Ansätze angewandt werden. Optimierung von *in vitro* Wirksamkeit (bevorzugt $K_i < 1$ nM), Selektivität und balancierte physiko-chemische Eigenschaften sind dabei notwendig, um gute pharmakokinetische Profile (bevorzugt z.B. hohe orale Bioverfügbarkeit und lange $t_{1/2}$) sowie antithrombotische Wirksamkeit zu erreichen.^[52]

3.6 Ergebnisse und Diskussion

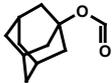
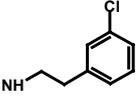
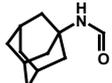
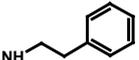
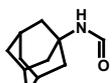
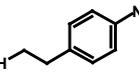
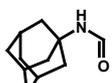
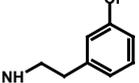
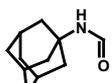
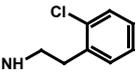
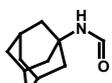
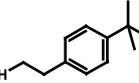
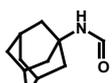
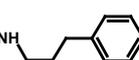
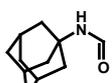
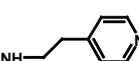
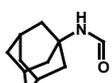
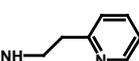
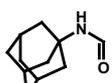
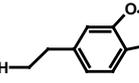
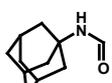
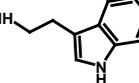
3.6.1 Inhibition von Faktor Xa und verwandten trypsin-ähnlichen Serinproteasen

Nach den Vorarbeiten von Sperl und Mitarbeitern sollten Derivate basierend auf der Leitstruktur von (*R*)-3-Amidinophenylalanin (**7**) in ihrer Inhibitionswirkung mit Methoden des „Rational Drug Design“ iterativ verbessert werden.^[15]

In Tabelle 3-1 sind die Inhibitionskonstanten der synthetisierten und untersuchten Verbindungen gegenüber den relevanten trypsin-ähnlichen Serinproteasen Faktor Xa, Thrombin, Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA) und Trypsin aufgelistet. Den Strukturen kann dabei über ihre unterschiedliche inhibitorische Wirkung eine Struktur-Wirkungsbeziehung („Structure-Activity-Relationship“, SAR) zugeordnet werden.



Verb.	R ¹	R ²	K _i -Wert [μM]			
			Faktor Xa	Thrombin	uPA	Trypsin
8			0.074	1.2	> 1000	2.7
9			0.056	2.8	> 1000	40

Verb.	R ¹	R ²	K _i -Wert [μM]			
			Faktor Xa	Thrombin	uPA	Trypsin
10			0.09	0.59	> 1000	3.6
11			0.074	1.3	> 1000	5.3
12			0.059	2.8	> 1000	40
13			0.074	0.6	> 1000	5
14			0.074	0.63	> 1000	3.6
15			2	22	> 1000	7.3
16			0.79	2.9	> 1000	82
17			0.41	1.4	> 1000	6.1
18			0.21	1.4	> 1000	7.8
19			0.048	1.9	> 1000	76
20			1.1	2	> 1000	42

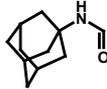
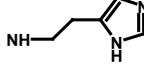
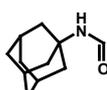
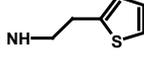
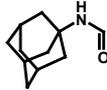
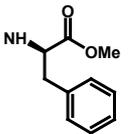
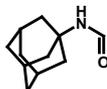
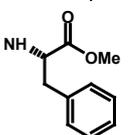
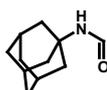
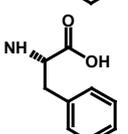
Verb.	R ¹	R ²	K _i -Wert [μM]			
			Faktor Xa	Thrombin	uPA	Trypsin
21			1.1	3.5	> 1000	24
22			0.06	1.1	> 1000	6.6
23			1.3	0.84	> 1000	6.6
24			0.078	1.2	> 1000	6.2
25			0.054	16	> 1000	13

Tabelle 3-1: Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR) der untersuchten (R)-3-Amidinophenylalanin-Leitstruktur (**7**) und deren Derivate (**8-25**).

Bei den N-terminalen Adamantylloxycarbonyl-Derivaten (**8-10**) handelt es sich um die ersten synthetisierten Derivate im Rahmen der Forschungsarbeit. Dabei stellt **8** den Ausgangspunkt dar und war durch die Vorarbeiten von Sperl *et al.* als aktivste Verbindung gegenüber Faktor Xa aufgezeigt worden. Unter Hinzunahme des von Sperl *et al.* angenommen Bindungsmodus (vgl. Kapitel 3.6.3), sollten in erster Linie C-terminale Amid-Derivate von **8** synthetisiert werden, um Hemmwirkung sowie Selektivität durch Interaktion in der S₃/S₄-Region zu erhöhen.^[15] Dabei zielte der erste Schritt darauf ab, durch verschiedene Substituenten am aromatischem Teil des Phenethyl-Gerüsts weitere Interaktionsmöglichkeiten im S₃/S₄-Bereich des Enzyms, mittels polarer oder hydrophober Reste, zu adressieren. Das Amino- (**9**) und das Chlorderivat (**10**) offenbarten mit den K_i-Werten 56 nM bzw. 90 nM jedoch keine

substanzielle Verbesserung der Hemmwirkung oder Selektivität gegenüber dem Zielenzym.

Die Säurelabilität der Adamantylloxycarbonyl-Gruppe gab den Anlass, weitere Veränderungen an der Leitstruktur vorzunehmen. Ein potentieller Wirkstoff hätte mit dieser Eigenschaft bei oraler Verabreichung keinerlei Möglichkeit den Magen mit seinem niedrigem pH-Wert von 1.5 intakt zu passieren und ist darüber hinaus sicherlich anfälliger gegenüber enzymatischem Abbau im Metabolismus. Deshalb wurde durch den Austausch des Sauerstoffes durch einen Stickstoff die Leitstruktur in die Reihe der Adamantyl-Harnstoffe überführt. Die Harnstoffgruppe ist dabei nicht säurelabil, was zu einer erhöhten chemischen und enzymatischen Stabilität führt. Mit *WX-FX4* (**11**) wurde zuerst das Harnstoff-Analogon von **8** synthetisiert und es zeigten alle weiteren hergestellten Derivate (**11-14**) erfreulicherweise K_i -Werte (59 – 74 nM), die sich in nahezu identischer Größe zur Adamantylloxycarbonyl-Reihe befanden. Auch die Position des Chloratomes in 2- bzw. 3-Stellung (vgl. **14** bzw. **13**) am C-terminalen Rest zeigte, mit gleichen K_i von 74 nM, keinen Unterschied in der Hemmung von Faktor Xa. Von diesen Verbindungen wurde das unsubstituierte Phenethylamid **11** (gestrichelt markiert in Tabelle 3-1), mit einem $K_i = 74$ nM gegenüber Faktor Xa und einer guten Selektivität gegenüber Thrombin (1.3 μ M) sowie Trypsin (5.3 μ M) und einer exzellenten Selektivität gegenüber uPA (> 1000 μ M) für eine Röntgenkristallstruktur-Analyse ausgewählt (vgl. Kapitel 3.6.3).

Nach Kenntnis des realen, neuartigen Bindungsmodus, der offenbarte, dass die Adamantyl-Harnstoffgruppe optimal passend im S_3/S_4 -Bereich der „active site cleft“ hydrophob und der Phenethylamid-Rest mit einer $S_{1\beta}$ -Bindungstasche (S_1 -vorgelagerte Untertasche) interagiert, wurde im nächsten Schritt versucht, durch weitere Derivatisierung diese „Subgroove“ (vorgelagerte Rille) gezielt zu adressieren. Dabei wurden außer **15** und **16** erstrangig heterozyklische Strukturelemente eingesetzt, um mit weiteren Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophoben Wechselwirkungen den Inhibitor in Potenz und Selektivität zu verbessern. Über die folgenden Derivate (**15-22**) lässt sich folgendes zusammenfassen. **15** mit seiner sterisch sehr anspruchsvollen *tert*-Butyl-Gruppe in *para*-Position zeigt wie erwartet eine große Einbuße bezüglich seiner Hemmwirkung mit einem K_i -Wert von 2 μ M, da der C-terminale Rest des

Inhibitors nicht mehr mit der S_{1β}-Bindungstasche zu interagieren vermag. Daneben konnte mit der Verbindung **16** belegt werden, dass es sich bei der in der Leitstruktur enthaltenen Ethyl-Gruppe um den idealen Spacer handelt. Von Sperl *et al.* war bereits die analoge Verbindung mit einem Methyl-Spacer hergestellt worden und wies einen K_i -Wert von 0.22 μM auf.^[15] Mit einem K_i von 0.79 μM zeigt **16** ebenfalls eine sogar weitere Verschlechterung der *in vitro* Wirkung.

Mit den Pyridin-Derivaten **17** mit dem Stickstoff in *para*-Position, und **18** mit dem Stickstoff in *ortho*-Position konnte keine verbesserte inhibitorische Wirkung erzielt werden. Daraus kann gefolgert werden, dass sich mit dem Stickstoff im Pyridin-Ring keine Verbesserung der Interaktion zur S_{1β}-Bindungstasche erreichen lässt, sondern eine stark gegenläufige Tendenz mit einem Ansteigen der K_i -Werte auf 0.41 bzw. 0.21 μM auftritt. Wahrscheinlich spielen hierbei sogar abstoßende Einflüsse eine Rolle. Mit einem $K_i = 48$ nM bei gleichbleibender Selektivitätsqualität gegenüber den anderen getesteten Serinproteasen, ist das Benzo[1,3]-dioxol-Derivat (**19**) die aktivste Substanz dieser Reihe. Eventuell spielt die Ausbildung einer neuen Wasserstoffbrückenbindung eine Rolle, da die Sauerstoffe im Dioxol-Ring dafür als Akzeptoren in Frage kommen könnten. Leider konnten auch „Modeling“-Experimente keinen schlüssigen Erklärungsansatz liefern. Den endgültigen Aufschluss würde wohl nur eine Röntgenkristallstruktur-Analyse geben, da eventuell Veränderungen an der Enzymoberfläche durch Bindung des Inhibitors eine Rolle spielen könnten. Mit einem identischen K_i -Wert von 1.1 μM liegen das Tryptamin- (**20**) und das Histamin-Derivat (**21**) in der Hemmwirksamkeit gleich auf. Es kann somit über die untersuchten Heterozyklen zusammenfassend gesagt werden, dass sich mit einem aromatischen Stickstoff, zumindest in den vorliegenden Derivaten, anscheinend keine günstige Interaktion mit der S_{1β}-Bindungstasche und somit Erhöhung der inhibitorischen Qualität erreichen lässt. Neben dem Dioxol (**19**) konnte auch mit der Thiophen-Verbindung (**22**) eine Verbesserung des $K_i = 60$ nM erzielt werden. Wahrscheinlich kann hierbei der Schwefel des Thiophen-Ringes mit der Disulfid-Brücke zwischen dem Cys191 und Cys220 in der „Subgroove“ wechselwirken.

Aufgrund der optimalen Wechselwirkung der N-terminalen Adamantyl-Harnstoffgruppe als P_{3/4}-Element im S₃/S₄-Bereich bei Faktor Xa, ist ein anderer

Ansatzpunkt zur Erschließung neuer Wechselwirkungsmöglichkeiten mit dem Enzym die Erweiterung des Phenethyl-Restes um eine Säure-Funktion, die das Einführen neuer Interaktionsmöglichkeiten erlaubt (**26**, Abbildung 3-6).

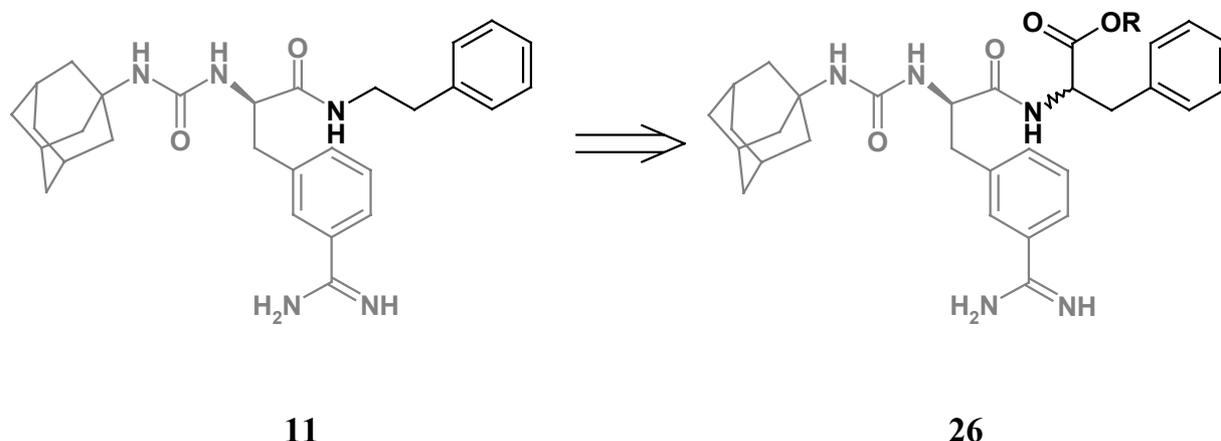


Abbildung 3-6: Einführung eines Phenylalanin-Restes in die Struktur von **11**, zur weiteren C-terminalen Derivatisierung zu **26** in Richtung der S'-Region von Faktor Xa.

Die in Tabelle 3-1 enthaltenen Phenylalanin-methylester-Derivate (**23** und **24**) ergeben dabei eine interessante Erkenntnis. Bei **23** mit einem K_i -Wert von 1.3 μM handelt es sich um die D-Aminosäure ((*R*)-Konfiguration) als Rest und bei **24** mit einem K_i -Wert von 78 nM entsprechend um die L-Aminosäure ((*S*)-Konfiguration). Während das Amidino-substituierte Phenylalanin der Ankergruppe eine (*R*)-Konfiguration haben muss, um optimal mit den Bindungstaschen von Faktor Xa interagieren zu können (vgl. auch Ergebnisse ^[15]), muss das zweite eingeführte C-terminale Phenylalanin in der (*S*)-Konfiguration vorliegen, also folglich die neue so derivatisierbare Leitstruktur an den stereogenen Zentren eine (*R*, *S*)-Konfiguration aufweisen.

Die tierexperimentellen Untersuchungen der Gerinnungshemmung und Eliminierung des Inhibitors **11** zeigten, dass vor allem der hydrophobe Charakter der Verbindung zu einem hohen Plasma-Protein-Bindungsverhalten (>99%) und so zu einer sehr raschen Eliminierung führt (vgl. Kapitel 3.6.4). Aufgrund dessen wurde versucht, den polaren Charakter von **11** mittels der Leitstruktur **26** zu erhöhen. Deshalb wurde die freie Säure (**25**) synthetisiert, die mit einem $K_i = 54$ nM und verbesserter Selektivität

gegenüber Thrombin (16 μM) sowie Trypsin (13 μM) und gleichbleibender Selektivität gegenüber uPA (> 1000 μM) eine kleine Verbesserung der inhibitorischen Wirkung auf Faktor Xa erreichen konnte. Eine Verringerung der Eliminierungsrate gelang mit **25** dabei allerdings nur marginal (vgl. Kapitel 3.6.4).

Darüber hinaus wurden noch zwei weitere interessante Derivate hergestellt (Tabelle 3-2). Zum einen handelt sich um **27**, mit dem als sehr einfache Modellverbindung am Anfang der Forschungsarbeiten zur Dissertation, die inhibitorische Wirkung der von Sperl *et al.* entwickelten grundlegenden Leitstruktur ohne den Einfluss der C-terminalen Reste untersucht werden sollte.^[15] Zentrale Frage war hierbei, welches Gewicht dabei der als Anker wirkenden Adamantyl-Gruppe zukommt. Wie aus Tabelle 3-2 hervorgeht, ist der vereinfachte Inhibitor **27** mit einem $K_i = 34 \mu\text{M}$ nicht in der Lage, auch nur die annähernde Wirkung zu erreichen. Dies unterstreicht anschaulich die Wichtigkeit des C-terminalen Restes für die Leitstruktur. Zum anderen sollte versucht werden, die sehr basische Benzamidin-Ankergruppe (pK_s ca. 9-11) durch eine weniger basische funktionelle Gruppe zu ersetzen, was später einen positiven Einfluss auf die orale Bioverfügbarkeit der Verbindungsreihe ausüben könnte. Obwohl eine Derivatisierung dieser Art eine drastische Änderung der Leitstruktur bedeutet, war Von He *et al.* eine SAR berichtet worden, bei der eine Benzamidin-Leitstruktur mit einer Amidinofunktion in 4-Position des Ringes erfolgreich durch einen Glycinspacer und verschiedene, weniger basische Heterozyklenstrukturen als Ankergruppe (auch „Head-Group“ genannt) ersetzt wurden. Für einen Derivatisierungstest ging man aus synthestrategischen Gründen und aus Kostengründen nur von dem in der (*S*)-Konfiguration vorliegenden Aspartat-Derivat aus (vgl. Syntheschema in Kapitel 3.6.2.1). Dabei wurde eine auf Imidazol (pK_s 7) basierende Ankergruppe, ein Histamin, ausgesucht, die in einer Veröffentlichung die höchste inhibitorische Wirksamkeit erbringen konnte.^[63] Die so erhaltene Verbindung **28** zeigte allerdings keine Hemmung mehr gegenüber den getesteten Proteasen (Tabelle 3-2).

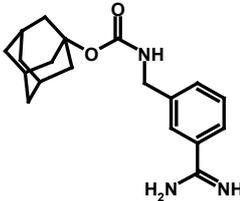
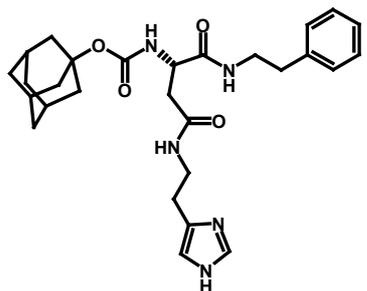
Verbindung	Strukturformel	K_i -Wert [μM]			
		Faktor Xa	Thrombin	uPA	Trypsin
27		34	28	> 1000	40
28		> 1000	> 1000	> 1000	> 1000

Tabelle 3-2: *Struktur und inhibitorische Wirkung der Verbindungen 27 und 28.*

Als grundlegende Erklärung hierfür kann - wie oben bereits angedeutet - angeführt werden, dass der Austausch einer Ankergruppe als P_1 -Element einen eminenten Einschnitt in eine bestehende Leitstruktur bedeutet. Die Ankergruppe ist ein Hauptinteraktionspunkt, gerade auch bei auf Benzamidin-basierenden Strukturen, und ein Inhibitor gewinnt durch die Salzbrückenbindung zum Asp189-Rest den energetischen Hauptanteil bei den Interaktionen zum Enzym. Obwohl eine auf Imidazol-basierende Ankergruppe dies wohl auch zu einem gewissen Teil zu erreichen vermag, so ist doch vor allem die sich daraus ergebende Geometrie des restlichen Inhibitors, die sich der Ankergruppe anschließt, wohl von entscheidender Bedeutung. Das bedeutet, dass sich ein an eine Benzamidin-Ankergruppe möglicherweise optimal anschließender Strukturverlauf für die Austrittsgeometrie aus der S_1 -Tasche einer anderen Ankergruppe, wie dem Imidazolderivat **28**, nicht unbedingt eignen kann und so keine weiteren Interaktionen mehr zulässt. Als theoretisches Beispiel kann der Vergleich durch „Superimposition“ zweier Ankergruppeneinschnitte aus zwei verschiedenen Röntgenkristallstrukturen von uPA mit zwei unterschiedlichen

Inhibitoren dienen (Abbildung 3-7). Grün gefärbt ist das am Boden der S_1 -Bindungstasche befindliche Asp189 zu erkennen, mit dem die Ankergruppen als P_1 -Element interagieren. Bei der Überlagerung der hier relativ ähnlichen Ankergruppen eines *para*-Benzamidins (rot) und eines *para*-Benzguanidins (magenta) ist bereits eine Differenz in der Austrittsgeometrie von ungefähr $15\text{-}25^\circ$ zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass bei einem gegenseitigen Austausch dieser Gruppen die jeweilige Leitstruktur in ihren Interaktionsmöglichkeiten sehr wahrscheinlich stark beeinträchtigt würde. Dieses Beispiel unterstreicht nochmals, wie kritisch der Austausch einer Ankergruppe sein kann und gibt somit neben der unterschiedlichen Länge einen Erklärungsansatz für das inhibitorische Ergebnis der Verbindung **28**.

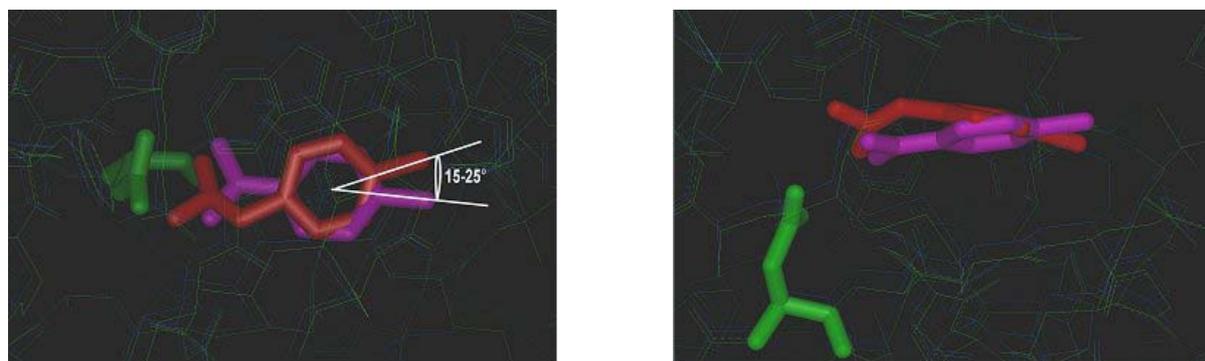


Abbildung 3-7: „Superimposition“ zweier Röntgenkristallstrukturen mit Inhibitoren des uPA. In den zwei unterschiedlichen Ansichten ist der Asp189-Rest in Grün, die Ankergruppe eines *p*-Benzamidins in Magenta und die eines *p*-Benzguanidins in Rot dargestellt. Die Differenz des Austrittswinkels aus der S_1 -Tasche beträgt dabei ca. $15\text{-}25^\circ$.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass es gelungen ist, mit dem Amino-Derivat (**12**, $K_i = 59$ nM), der Dioxol-Verbindung (**19**, $K_i = 48$ nM), dem Thiophen-Derivat (**22**, $K_i = 60$ nM) und der polareren Säurenvariante (**25**, $K_i = 54$ nM) die inhibitorische Wirkung der vorgegebenen Leitstruktur (**7**) zu verbessern bei gleichbleibend guter Selektivität, bzw. verbesserter Selektivität im Falle von **25**, gegenüber den getesteten Serinproteasen.

3.6.2 Synthesestrategien

3.6.2.1 *Synthese in Lösung*

Die funktionelle Umwandlung einer Cyanogruppe in eine aus pharmazeutischer Sicht interessantere Amidin-Gruppe stellt einerseits eine chemisch wertvolle Operation dar, ist aber andererseits nicht ganz unproblematisch. Bekannt sind verschiedene Synthesestrategien, die zu mehr oder weniger gutem Reaktionsabschluss bezüglich der Reinheit und Ausbeute führen. Eine ältere Methode ist beispielsweise eine dreistufige Synthese, bei der zuerst durch eine nukleophile Addition von Schwefelwasserstoff an die Cyano-Gruppe ein Thiamid entsteht, das dann in zweiter Stufe mittels Iodmethan am Schwefel methyliert wird. In der dritten Stufe wird schließlich Ammoniak nukleophil addiert, wobei Methanthiol und das freigesetzte Amidin entstehen.^[64] Aus dieser Zeit stammt auch eine metallorganische Reaktion, die den Namen Garigipati-Reaktion trägt. Hierbei wird Trimethylaluminium mit Ammonium-Hydrochlorid oder auch mit dem Hydrochlorid substituierter Amine umgesetzt, wobei Methan und eine aktive metallorganische Spezies, das Chloraluminium-amid bzw. Alkylchloraluminium-amid entstehen. Dieses Reagenz kann dann anschließend nicht nur mit Cyano-Verbindungen sondern auch Methyl- oder Ethylesterverbindungen direkt zum Amidin umgesetzt werden. Der Vorteil liegt darüber hinaus in der Möglichkeit, alkylsubstituierte Amidine zu synthetisieren, der Nachteil in der Aufarbeitung und Reinheit der Verbindungen.^[65;66] Ein weitere Methode ist die Konversion der Cyano-Gruppe unter Verwendung von *N*-Acetylcystein. Dieses greift nukleophil am Nitril an, wobei ein Imino-thioether entsteht, der mit Ammoniak zum *N*-Acetylcystein-Salz des Amidins umgesetzt wird.^[67] In der vorliegenden Arbeit wurde die in Abbildung 3-8 schematisch dargestellte fünfstufige Synthesestrategie, hier aufgezeigt für die Harnstoff-Derivatserie, zur Darstellung der C-terminalen Derivate verfolgt. Das kommerziell erhältliche Boc-3-Cyano-D-phenylalanin (**29**) wird dabei zuerst mittels 95% aq. TFA entschützt und anschließend bei Raumtemperatur mit Triethylamin (TEA) und Adamantyl-isocyanat zu **30** umgesetzt. Für die Adamantylloxycarbonyl-Serie (Vorstufen sind im Experimentellen Teil mit **30b-32b** bezeichnet) wird statt des

Isocyanates einfach das Adamantylloxycarbonyl-Fluorid unter denselben Bedingungen eingesetzt. Um die Amidin-Funktion zu erzeugen, wurde eine leicht abgewandelte, zweistufige Sequenz nach Stüber und Mitarbeitern gewählt. Im ersten Schritt wird die Cyano-Verbindung **30** mit Hydroxylamin-Hydrochlorid und mit Diisopropylethylamin (DIEA) unter Rückfluss gekocht und so das Hydroxyamidin **31** als Zwischenstufe synthetisiert. Im zweiten Schritt erfolgt dann die Erzeugung des Amidins **32** durch Hydrogenolyse mittels 10% Palladium/Kohle als Katalysator bei 40 °C.^[68] Die C-terminalen Derivate **33** werden im letzten Schritt mit dem jeweiligen Amin und dem Kupplungsreagenz Benzotriazol-1-yloxy-tris-pyrrolidino-phosphonium Hexafluorophosphat (PyBop) unter entsprechenden Bedingungen dargestellt.

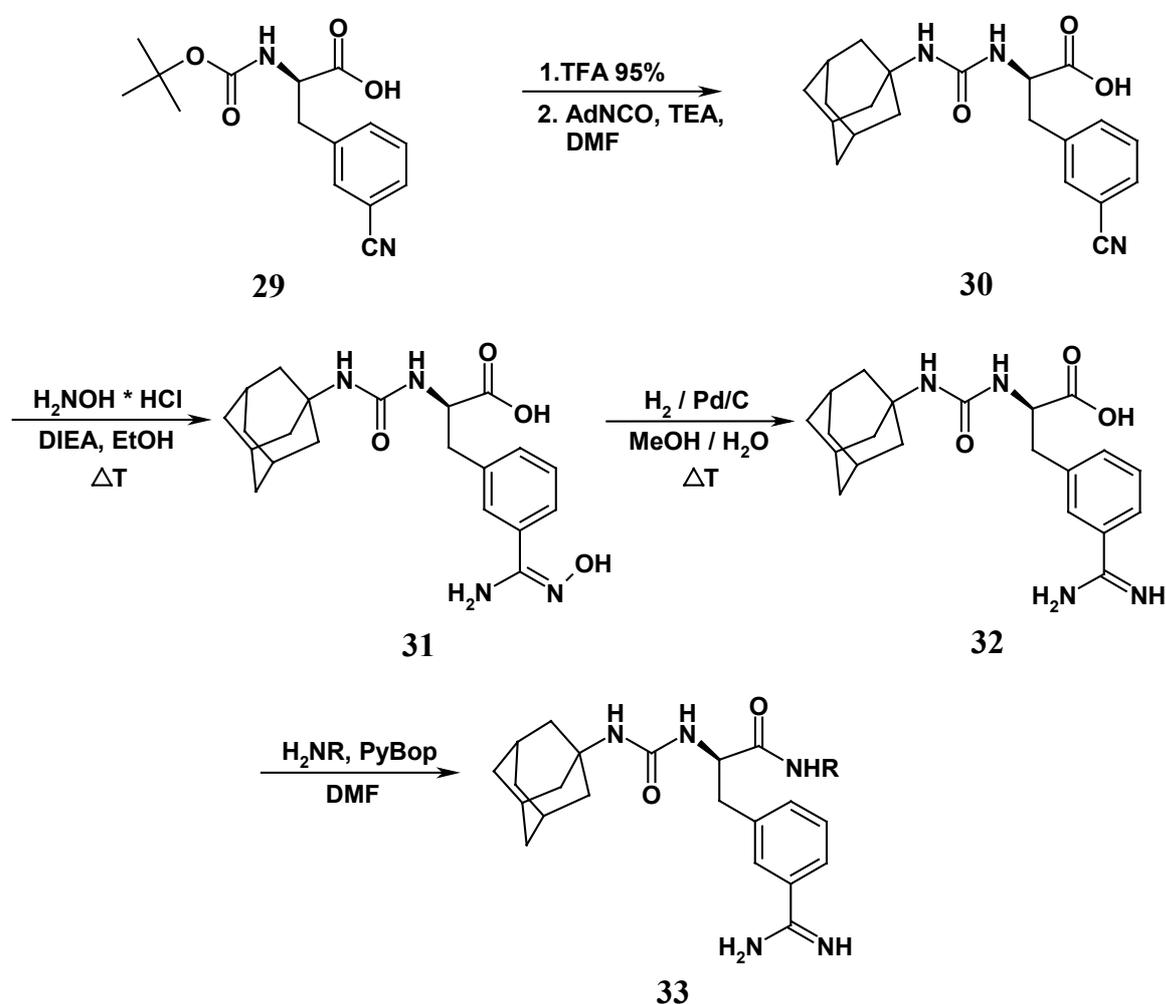


Abbildung 3-8: Synthesestrategie zur Darstellung der C-terminalen Derivate.

Schutzgruppenstrategien

Die oben beschriebene Strategie beinhaltet jedoch einen zentralen Schwachpunkt. Im letzten Schritt werden die C-terminalen Amide mittels Kupplungsreagenzien unter Anwesenheit des freien Amidins **32** gebildet. Dies hat zur Folge, dass aufgrund unerwünschter Kupplungen mit der freien Amidin-Funktion zahlreiche Nebenprodukte mitgeneriert werden. Entsprechend treten mitunter sehr hohe Einbußen bezüglich der Ausbeuten und daraus resultierende aufwendige Aufreinigungsschritte mittels präparativer HPLC auf.

Ausgehend von der Cyano-Vorstufe **30** ergeben sich in Anlehnung an die vorgestellte Route (Abbildung 3-8) verschiedene Möglichkeiten für die Integration einer Schutzgruppenstrategie (Abbildung 3-9). Über die Cyano-Vorstufe **30** sollte ein *tert*-Butyl-substituiertes Hydroxylamin direkt eingeführt werden, das nach C-terminaler Kupplung mittels Acidolyse abgespalten werden könnte. Im Verlauf der Untersuchungen gelang es jedoch nicht, diese Schutzgruppe durch Addition des Hydroxylamin-Derivates direkt an die Cyano-Funktion einzuführen.

Für die Hydroxyamidin-Stufe **31** ergibt sich eine nach Bolton und Mitarbeitern berichtete Schutzgruppenstrategie. Im Verlauf einer dreistufigen Sequenz wird die Hydroxyamidin-Gruppe in einen heterozyklischen Rest, ein 5-Benzyloxy-1,2,4-oxadiazol-Derivat **34**, umgewandelt, welches später durch Hydrogenolyse wieder gespalten werden kann. Neben dem Nachteil einer dreistufigen Synthese zur Einführung einer Schutzgruppe wird dieser Ansatz noch weiterhin dadurch limitiert, dass sich die vollständige Reaktionssequenz nur in einer Gesamtausbeute von 31 % abschließen lässt.^[69] Aus diesen Gründen wurde diese Möglichkeit im Rahmen der Untersuchungen verworfen. Eine weitere Möglichkeit bietet die Acetylierung der Stufe **31** mittels Acetanhydrid, wie sie von Judkins und Mitarbeitern berichtet wird. Das so Acetyl-geschützte Hydroxyamidin **35** ist ebenfalls durch abschließende Hydrogenolyse mittels Palladium/Kohle als Katalysator bei Raumtemperatur wieder in die entsprechende Amidin-Verbindung überführbar.^[70] Da anfangs nur die Adamantylloxycarbonyl-Derivate im Mittelpunkt des Interesses lagen und zudem säurelabil sind, musste die Variante von Judkins *et al.* auf basische

Reaktionsbedingungen abgewandelt werden. Der Einsatz von verschiedenen Basen wie NaHCO_3 , Pyridin, TEA oder DIEA mit Acetanhydrid führten unerwarteterweise jeweils zu einem Gemisch aus den *O*-acetylierten bzw. *N*- und *O*-acetylierten Verbindungen **35** bzw. **36**, wobei die *N*-acetylierte Position nicht mehr durch Hydrogenolyse spaltbar ist. Auch die bereits literaturbeschriebene Variante, die Reaktionstemperatur bis auf 0°C zu senken, erbrachte keine Favorisierung des *O*-acetylierten gegenüber des *N*-acetylierten Produktes.^[71] Als im späteren Verlauf der Forschungsarbeiten die säurestabilen Adamantylharnstoff-Derivate in den Fokus der Aufmerksamkeit gelangten, wurde die Schutzgruppenstrategie nach Judkins *et al.* wieder aufgegriffen. Kurioserweise trat sogar auch unter den nun sauren Reaktionsbedingungen die *N*-Acetylierung am Hydroxyamidin in einem erhöhten Maße auf (Abbildung 3-9). Infolge dieser negativen Ergebnisse wurde die Schutzgruppenstrategie für die Synthese in Lösung aufgegeben.

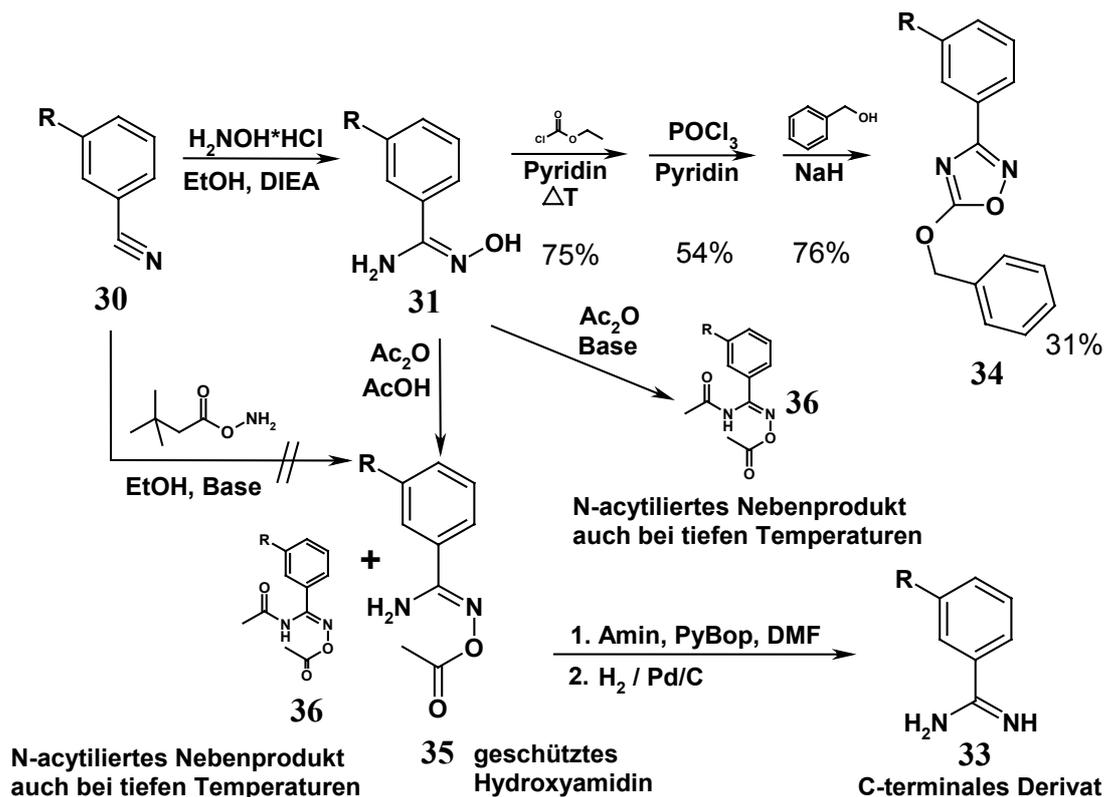


Abbildung 3-9: Schutzgruppenstrategien in Lösung. Die basische und saure Acetylierung führt jeweils zum *N*-acetylierten Nebenprodukt **36**. R entspricht dem Leitstrukturrest der auf 7 basierenden Derivate.

Synthese der Modellverbindung 27

Die stark vereinfachte Modellverbindung **27** kann über vier Stufen hergestellt werden (Abbildung 3-10). Die erste Stufe wird nach Wiley und Mitarbeitern beschrieben dargestellt.^[72] Zuerst wird dabei 3-Brom-methyl-benzonitril **37** mit Di-*tert*-butyliminodiacrylat nukleophil angegriffen. Aus der so entstandenen Bis-Boc-geschützten Aminoverbindung **38** kann dann mittels 95 % aq. TFA das freie Amin erzeugt werden, das dann weiter mit Adamantylloxycarbonyl-Fluorid und TEA umgesetzt wird. Aus der Adamantylloxycarbonyl-Verbindung **39** kann dann mit der bereits oben beschriebenen, leicht abgewandelten zweistufigen Methode von Stüber *et al.* über das Hydroxyamidin **40** das freie Amidin **27** dargestellt werden.^[68]

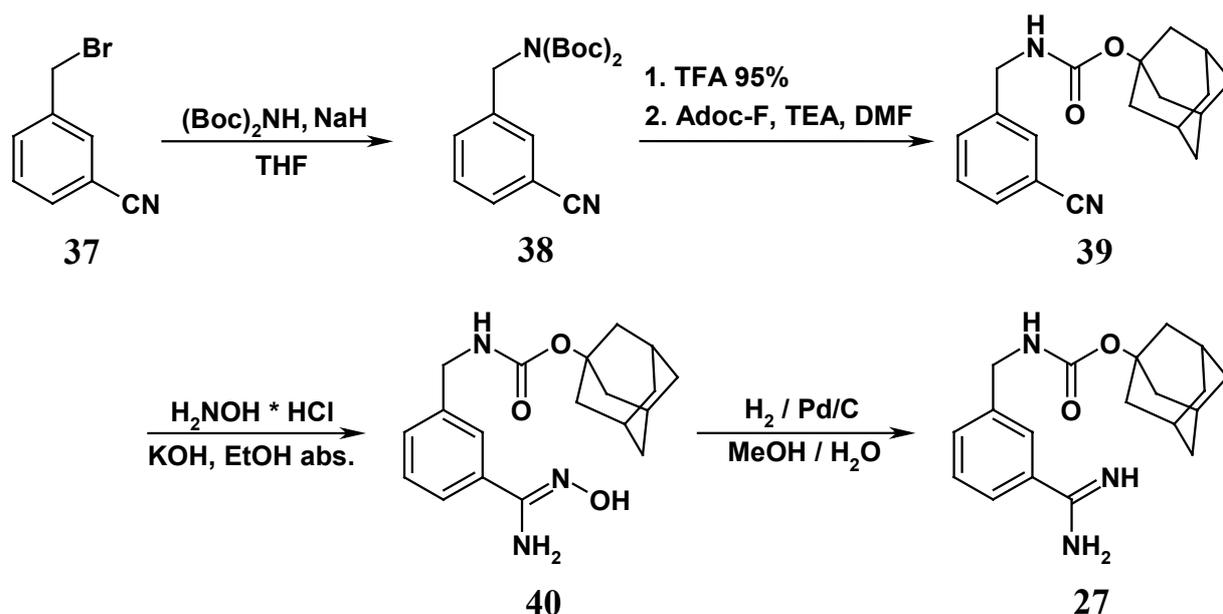


Abbildung 3-10: Syntheschema der Modellverbindung 27.

Synthese des Ankergruppen-Derivats 28

Das Imidazol-Derivat **28** kann, wie in Abbildung 3-11 schematisiert, über eine vierstufige Syntheseroute dargestellt werden. Hierfür wird als Ausgangsverbindung das Boc-Asp(OBz)-OSu **41** gewählt, welches zuerst mit Phenethylamin mittels PyBop zur Verbindung **42** gekuppelt wird. **42** wird anschließend mittels 95 % aq. TFA entschützt und dann weiter mit Adamantylloxycarbonyl-Fluorid und TEA zu **43** umgesetzt. Die Adamantylloxycarbonyl-Verbindung **43** wird dann mittels Hydrogenolyse mit 10% Palladium/Kohle als Katalysator bei Raumtemperatur von der Benzyl-Schutzgruppe zu **44** befreit und das resultierende Asp-Derivat in einer abschließender Stufe mit Histamin und PyBop zum Histamin-basierenden Ankergruppen-Derivat **28** gekuppelt.

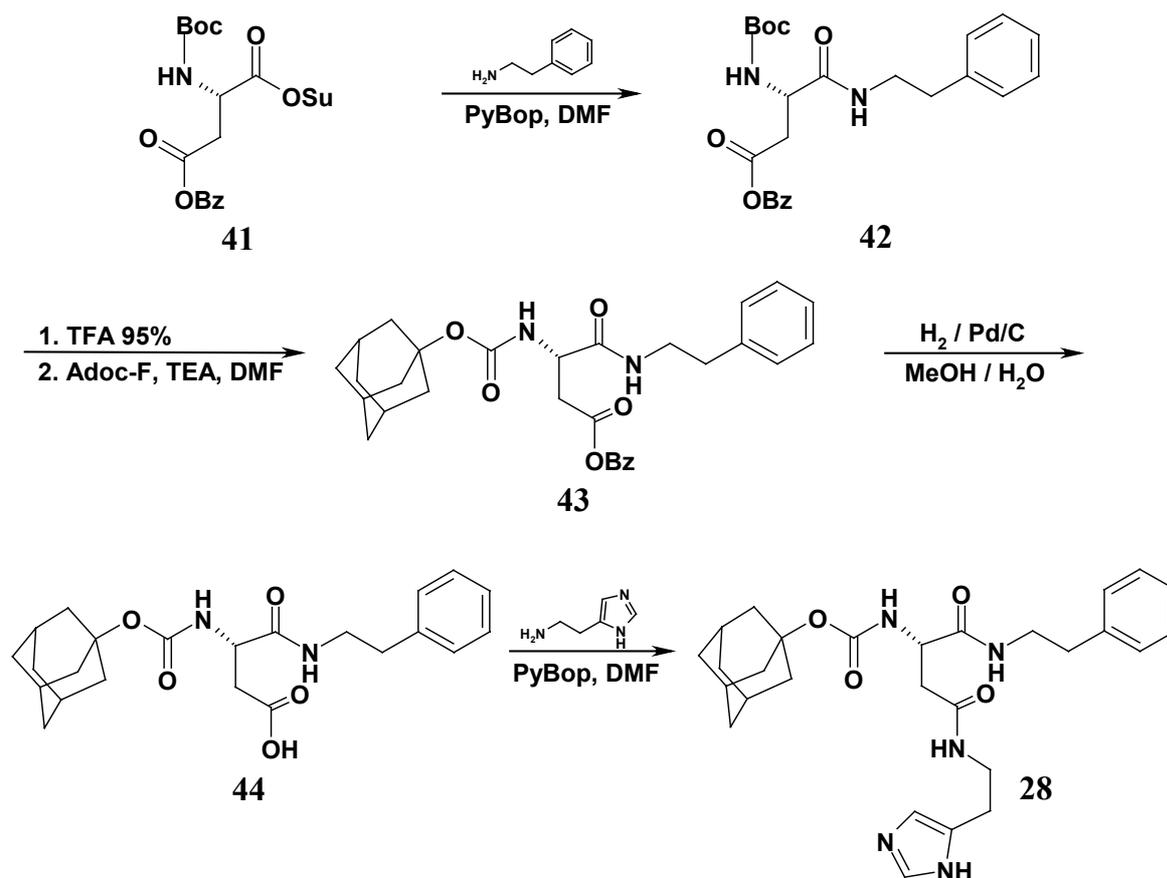


Abbildung 3-11: Syntheschema des auf Histamin basierenden Ankergruppen-Derivates **28**.

3.6.2.2 Festphasensynthese

Aufgrund der unter Kapitel 3.6.2.1 beschriebenen Problematik wurde versucht, die Synthese der Derivate in Lösung auf eine geeignete Festphasensynthesestrategie zu übertragen, bei der die Amidino-Funktion direkt an das Harz gekuppelt werden sollte und somit als geschützt betrachtet werden kann.

Vorstufen

Bekannt sind Beispiele, bei denen Amidin-basierende Verbindungen bereits erfolgreich am *p*-Nitrophenylcarbonat-Wang-Harz **45** (vgl. Abbildung 3-14) synthetisiert worden sind.^[73;74] Als erstes war hierfür jedoch eine passende N-terminale Schutzgruppenstrategie zu erarbeiten. Aufgrund der Tatsache, dass nur das freie Amidin selbst an das Harz gekuppelt werden kann, müssen geeignete Vorstufen synthetisiert werden, die für den Kupplungsschritt an ihrer zusätzlichen Amino-Funktion geschützt sind. Eine Boc-Strategie scheidet von vorne herein aus, da die Abspaltung im Falle des *p*-Nitrophenylcarbonat-Wang-Harzes **45** bereits mittels TFA/CH₂Cl₂ (1 : 1) geschieht und somit die Abspaltung einer Boc-Schutzgruppe mit 95 % aq. TFA nicht ermöglicht. Darüber hinaus ist noch zu beachten, dass die Synthese der Amidin-Funktion nach Stüber und Mitarbeitern ein Hydroxyamidin unter basischen Bedingungen beinhaltet, womit eine basenlabile Fmoc-Strategie ebenfalls nicht in Frage kommt.^[68]

In Abbildung 3-12 sind zwei weitere Schutzgruppen, die für Festphasensynthesen geeignet und daher von Interesse sind, gezeigt. Die Allyloxycarbonyl-Gruppe, hier am Beispiel der Verbindung **46**, die mittels 4 M NaOH bei 0 °C eingeführt werden kann, lässt sich wieder einfach mittels Palladium-Katalyse mit Tetrakis-(triphenylphosphin)-Palladium (0) ablösen.^[75] Aufgrund der Anfälligkeit des Allyl-Restes dieser Schutzgruppe bei der Hydrogenolyse kann diese jedoch nicht verwendet werden, da nach Stüber *et al.* eine Amidin-Vorstufe schließlich mittels Hydrogenolyse aus dem Hydroxyamidin erzeugt wird. Die Dde-Schutzgruppe (Bis-*N*-1-(4,4-Dimethyl-2,6-

dioxocyclohexyliden)-ethyl) hier am Beispiel der Verbindung **47**, wird mittels Acetyldimedon und Trimethylorthoformiat (TMOF) an der Amino-Gruppe eingeführt und lässt sich wieder mittels 2 % Hydrazin-Hydrat in DMF ablösen.^[74;76] Da diese Schutzgruppe allen Anforderungen entsprach, wurde sie ausgewählt und in die Synthese integriert.

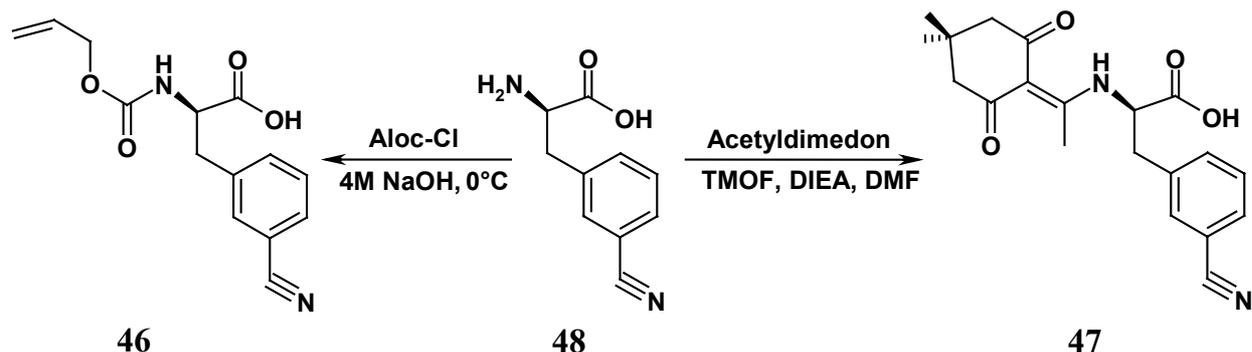


Abbildung 3-12: Mögliche Schutzgruppen für die Festphasensynthese aufgrund nicht möglicher Boc/Fmoc-Orthogonalität am Beispiel der Verbindung **48**.

Die in Lösung synthetisierten Vorstufen sind schematisch in Abbildung 3-13 dargestellt. Zuerst wird dabei das TFA-Salz **49** zum Derivat **50** Z-geschützt und anschließend in das Hydroxyamidin **51** überführt. Darauffolgend kann **51** mittels Hydrogenolyse mit 10% Palladium/Kohle als Katalysator bei 40 °C in das freie Amidin mit zusätzlich freier Amino-Gruppe **52** umgewandelt werden, das in Anlehnung an Lange und Mitarbeitern schließlich zur Dde-geschützten Verbindung **53** umgesetzt wird und an das Harz gekuppelt werden kann.^[74]

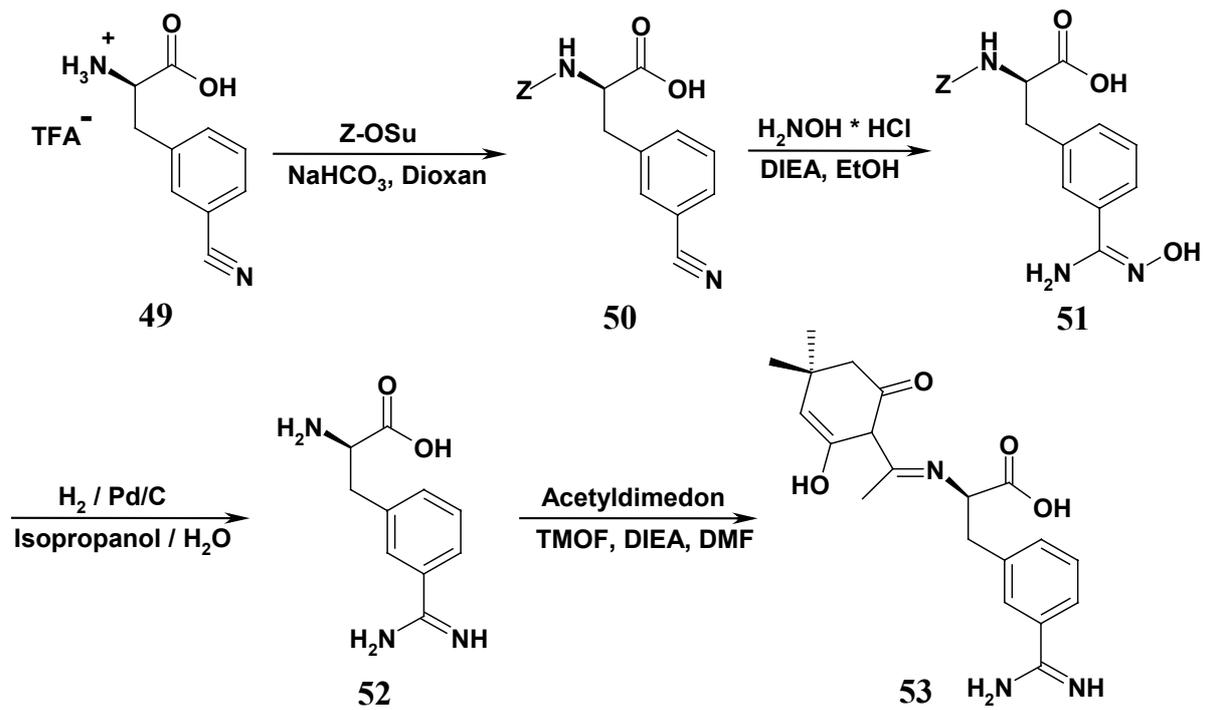


Abbildung 3-13: Vorstufen zur Festphasensynthese unter Einführung der Dde-Schutzgruppe.

Synthese am Harz

Die eigentliche Festphasensynthese verläuft wie in Abbildung 3-14 skizziert. Hierbei wird zuerst die Dde-geschützte Verbindung **53** an das *p*-Nitrophenylcarbonat-Wang-Harz **45** unter basischen Bedingungen gekuppelt. Das nun gekuppelte Molekül **54** besitzt eine geschützte Amidin-Funktion, die so bei den folgenden Kupplungsschritten nicht involviert werden kann. **54** wird nun mit 2 % Hydrazin-Hydrat in DMF von der Amino-Schutzgruppe befreit und kann dann mit Adamantyl-Isocyanat umgesetzt werden. Hierbei ist zu erwähnen, dass diese Umsetzung zum Adamantyl-Derivat anfangs nicht gelang. Weder Erwärmung noch unterschiedliche Reaktionsbedingungen konnten zum Erfolg führen. Von Ai-Ming-Yu und Mitarbeitern wurde von einer ähnlichen Problematik bei der Verwendung von Isocyanaten am Harz berichtet, die interessanterweise durch den Einsatz von Mikrowellenstrahlung mit drastisch herabgesetzten Reaktionszeiten und verbesserten Ausbeuten gelöst werden konnten.^[77] Da ein Einsatz von Mikrowellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich war, wurde das Problem unter Verwendung von katalytischen Mengen an DMAP in Verbindung mit DIEA als Base und durch Reaktionszeiten bis 48 Stunden gelöst. Das so synthetisierte Adamantyl-Derivat **55** kann nun mit verschiedenen Aminen und Kupplungsreagenzien wie PyBop umgesetzt werden. Abschließend werden die Amidin-Derivate **56** mittels TFA/CH₂Cl₂ (1 : 1) zu **33** abgespalten. Nach Abspaltung zeigen die Verbindung jedoch auch keine sehr hohe Reinheit, so dass eine Festphasensynthese noch optimiert werden muss, oder andererseits Aufreinigungsschritte verfolgt werden müssen, um beispielsweise testreife Substanzen zu erhalten.

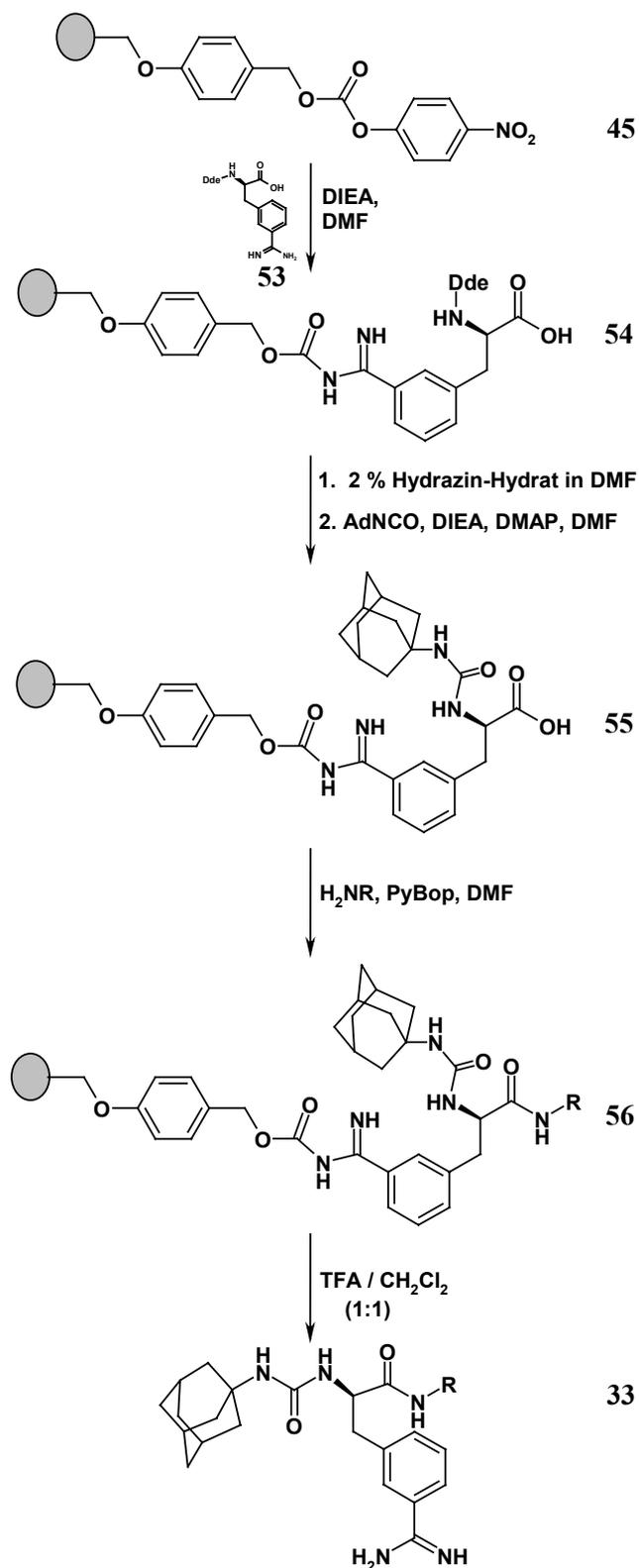


Abbildung 3-14: Festphasensynthese unter Verwendung der Dde-Schutzgruppe zur Erzeugung C-terminaler Derivate. Die Amidino-Funktion selbst ist dabei bis zur Abspaltung geschützt.

Amidinierung am Harz

In Analogie zu der in Kapitel 4.8.3.2 beschriebenen Guanidinylierung am Harz sollte kurz untersucht werden, ob eine direkte Amidinierung am Harz eventuell unter einfachen Umständen auch möglich ist, um dabei die Vorerzeugung der Amidin-Funktion durch notwendige Vorstufen zu umgehen. In Abbildung 3-15 zeigt ein vereinfachtes Schema den Gedankengang, wonach eine Cyano-Verbindung **57** dabei mittels eines geeigneten Amino-Harzes **58** direkt nukleophil angegriffen werden könnte. Nach abgeschlossener Synthese über die Verbindung **59** könnte dann eine entsprechende Abspaltung vom Harz erfolgen.

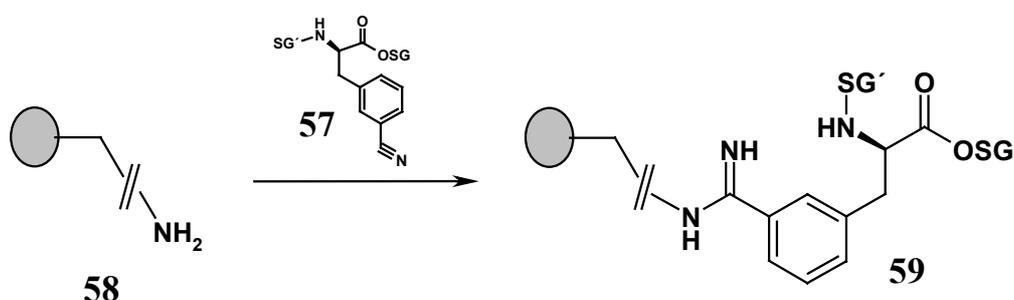


Abbildung 3-15: Theoretisches Schema der direkten Amidinierung einer Cyano-Vorstufe **57** am Harz mit Amino-Funktion (**58**). SG und SG' : geeignete Schutzgruppen.

Zum einen wurde das Sieber-Amid-Harz (9-Fmoc-amino-xanthen-3-yl-oxy-Merrifield-Harz) **60** getestet, das sehr säurelabil ist und bereits mit 1 % TFA in CH_2Cl_2 abgespalten werden kann.^[78] Zum anderen auch ein Rink-Amid-MBHA-Harz (4-[2', 4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl-phenoxy-acet-amido-norleucyl-MBHA-Harz) **61**, das einen modifizierten Linker beinhaltet, der über ein Norleucin an ein MBHA-Harz gebunden sowie säurelabil ist und mittels 95 % aq. TFA abgespalten werden kann.^[79] Die Abbildung 3-16 stellt schematisch das Ergebnis dar. Mit keinem der beiden Harze, **60** bzw. **61**, gelang ausgehend von einer Allyl-geschützten Cyano-Verbindung **46** nach Fmoc-Abspaltung ein nukleophiler Angriff auf die Cyano-

Funktion. Ursache hierfür ist möglicherweise eine anzunehmende sterische Hinderung für den Angriff der Amino-Funktion. Im Rahmen der Forschungsarbeit wurden keine weiteren Untersuchungen diesbezüglich unternommen.

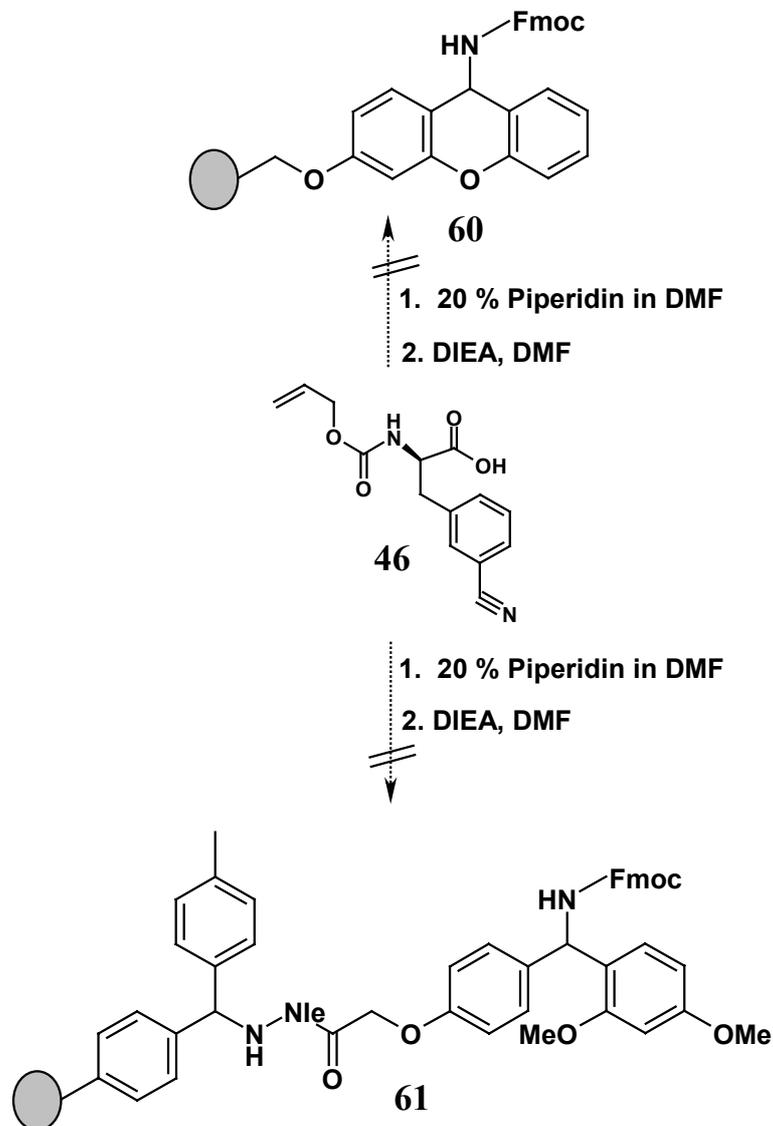


Abbildung 3-16: Testversuche zur direkten Amidinierung der Allyl-geschützten Cyano-Vorstufe **46**, an fester Phase. Weder beim Sieber-Amid-Harz **60** noch beim Rink-Amid-MBHA-Harz **61** gelang die Amidinierung unter den gewählten Bedingungen. Nle: Norleucin.

3.6.3 Röntgenkristallstruktur-Analyse des Faktor Xa/Inhibitor 11 Komplexes

Vorarbeiten

In den Vorarbeiten von Sperl und Mitarbeitern ist ein hypothetischer Bindungsmodus postuliert worden, der sich auf eine Röntgenkristallstruktur-Analyse und „Modeling“-Experimenten eines Trypsin/Inhibitor-Komplexes stützte.^[80] Dies war notwendig, da eine Kristallisation eines Faktor Xa/Inhibitor Komplexes nicht gelang. Deshalb wurde der Inhibitor **62** als Methylester anstelle des C-terminalen Phenethylamids stellvertretend mit Trypsin kristallisiert. Bei diesem Ansatz macht man sich die hohe strukturelle Konvergenz von trypsin-ähnlichen Serinproteasen zu nutzen (vgl. Kapitel 1.4). Die Analyse des Trypsin/Inhibitor **62**-Komplexes und anschließende „Superimposition“ auf die Oberfläche einer Faktor Xa-Röntgenkristallstruktur ergab jedoch eine starke Diskrepanz (Abbildung 3-17). Grund hierfür ist, dass Faktor Xa im Gegensatz zu Trypsin im entsprechendem Bereich der Oberfläche keine hydrophobe Depression aufweist. Die Adamantyl-Gruppe würde folglich mit den Seitenketten von Arg143, Lys148, Lys148 und Gln192 auf der Faktor Xa-Oberfläche kollidieren. Damit konnte ein ähnlicher Bindungsmodus wie von **62** in Trypsin bei Faktor Xa ausgeschlossen werden.^[80] Um weitere Informationen über einen möglichen Bindungsmodus zu erhalten, wurden mittels des Computerprogrammes FlexX „Docking“-Experimente durchgeführt.^[81] Hierbei wurde erst auf die Oberfläche der erhaltenen Trypsin-Kristallstruktur „gedockt“, um einen realen Vergleich und eine Einschätzung des Ergebnisses zu erhalten. Dabei konnte der reale Bindungsmodus in Trypsin vorhergesagt werden (Abbildung 3-18). Im nächsten Schritt wurde auf die Oberfläche einer Röntgenkristallstruktur von Faktor Xa „gedockt“ und als wichtigstes Ergebnis bleibt hierbei festzuhalten, dass die Lösung in Grün einen „non-substrate-like“-Bindungsmodus des Inhibitors **62** mit dem N-terminalen Adamantyl-Rest in der S₁-Tasche interagierend nahe legte (Abbildung 3-18 D).^[80]

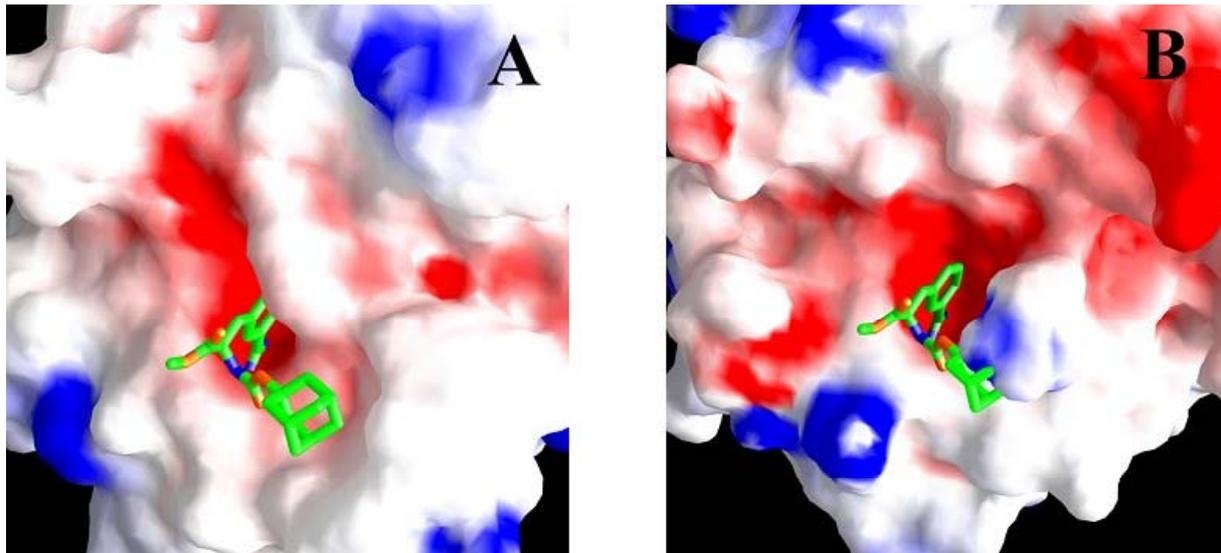


Abbildung 3-17: Experimenteller und modellierter Bindungsmodus des Methylester-Derivates **62** (grün) in Trypsin und Faktor Xa. **A:** Oberflächendarstellung des Trypsin/Inhibitor **62**-Komplexes. **B:** Überlagerung der Trypsin-Struktur auf die Oberfläche von Faktor Xa in gleicher Standardorientierung („active-site-cleft“ verläuft von rechts nach links). Negativ geladene Teile des Enzyms sind in Rot und positiv geladene in Blau wiedergegeben.

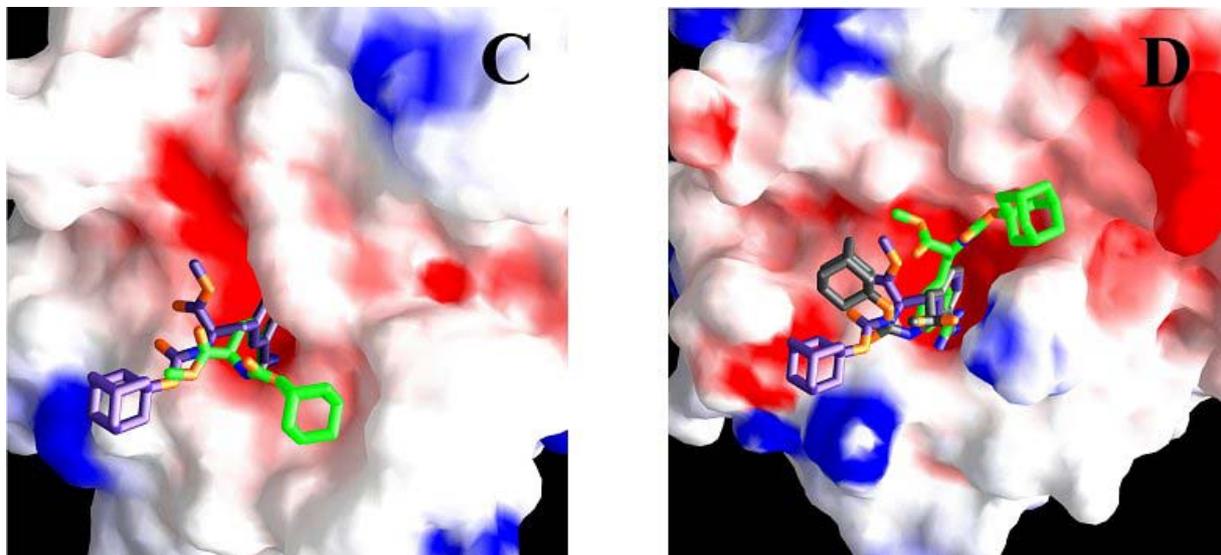


Abbildung 3-18: „Docking“-Experimente mit Trypsin und Faktor Xa. **C:** „Docking“ auf Trypsin, in Violett Lösung mit höchstem Score, in Grün 6. Score mit analogem Bindungsmodus zur Trypsin/Inhibitor **62**-Kristallstruktur. **D:** „Docking“ auf Faktor Xa, in Violett Lösung mit höchstem Score, in Grün mit „non-substrate-like“-Bindungsmodus, mit dem Adamantyl-Rest in der S_1 -Tasche. In Grau das (S)-Enantiomer.

Röntgenkristallstruktur-Analyse des Faktor Xa/Inhibitor 11-Komplexes

Die Röntgenkristallstruktur-Analyse des Faktor Xa/Inhibitor *WX-FX4* (**11**)-Komplexes wurde in Kooperation mit der Abteilung Prof. Huber (Arbeitsgruppe Prof. Bode, Abteilung für Strukturforschung, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) durchgeführt.

Interessanterweise enthüllte die Analyse der Röntgenkristallstruktur des erhaltenen Faktor Xa/Inhibitor **11**-Komplexes mit einer Auflösung von 2.2 Å einen völlig anderen und neuartigen Bindungsmodus, der die Hypothese der „no-substrate-like“-Bindung nicht bestätigen konnte (Abbildung 3-19).

Wie erwartet bindet die 3-Amidinophenyl-Gruppe als Arginin-mimetisches P₁-Strukturelement in die sehr tiefe und ausgeprägte S₁-Tasche von Faktor Xa. Die Ankergruppe bildet bei der Interaktion mit dem am Boden der Tasche befindlichen Asp189 eine Salzbrücke aus, welche darüber hinaus durch die Wasserstoffbrückenbindungen zu Gly219 und Ala190 sowie einer weiteren wasservermittelten Brücke zu Ala190 verstärkt wird (vgl. LIGPLOT Abbildung 3-21). Unerwarteterweise bindet die sehr sperrige Adamantyl-Gruppe perfekt passend als N-terminales P₃/P₄-Element in die S₃/S₄-Region. Hierbei ergeben sich hydrophobe Wechselwirkungen mit den aromatischen Seitenketten von Phe174, Trp215 und Tyr99. Zudem kann sich hier eine direkte Wasserstoffbrückenbindung zwischen einem Stickstoffatom der Adamantyl-Harnstoff-Gruppe mit dem Gly216 ausbilden (Abbildung 3-19 bis Abbildung 3-21).

Völlig überraschend und neuartig zeigt sich, dass der C-terminale Phenethylamid-Rest durch hydrophobe Interaktion eine vorgelagerte Rille der S₁-Tasche, die sogenannte „Subgroove“ bzw. S_{1β}-Bindungstasche, zu adressieren vermag. Diese kleine Bindungstasche ist bei Faktor Xa aus den Aminosäuren Gly219, Glu146, den Disulfid-verbundenen Cys191 und Cys220 sowie den Seitenketten von Arg143 und Gln192 aufgebaut (vgl. Abbildung 3-19, weiß nummeriert). Dabei bedeckt die Phenethyl-Gruppe vollständig die tiefe S₁-Tasche und stabilisiert so zusätzlich die Bindung der darin befindlichen Ankergruppe. Für die hydrophobe Wechselwirkung spielt die Disulfid-Brücke zwischen Cys191 und Cys220 vermutlich eine zentrale Rolle.

Interessanterweise wurde für die verwandte trypsin-ähnliche Serinprotease uPA eine sehr ähnliche S_{1β}-Bindungstasche beobachtet und zur Verbesserung der inhibitorischen Wirkung von niedermolekularen Verbindungen genutzt. Im Falle von uPA ist diese Bindungstasche mit kleinen Unterschieden aus den Aminosäuren Gly219, Ser146, den Disulfid-verbrückten Cys191 und Cys220 sowie den Seitenketten von Lys143 und Gln192 aufgebaut.^[82;83] Dieses Merkmal ermöglicht einen wichtigen Ansatzpunkt in der Verbesserung von Hemmwirkung und Selektivität.

Als zusätzliche Stabilisierung des Inhibitor/Enzym-Komplexes ist noch eine wasservermittelnde H-Brücken-Bindung zu erkennen (in Abbildung 3-19 durch eine rote Kugel als Wasser hervorgehoben), die sich zwischen Gly219 und dem Carbonyl-Sauerstoff der C-terminalen Amid-Funktion ausbildet.

Das Ergebnis der vorliegenden Kristallstruktur des Faktor Xa/Inhibitor **11**-Komplexes verdeutlicht und unterstreicht dabei den notwendigen kritischen Umgang mit computertechnisch kalkulierten Bindungsmodi und daraus gewonnenen Hypothesen.

Zudem muss kritisch erwähnt werden, dass auch Röntgenkristallstruktur-Analysen nicht unbedingt die allgemein gültige und endgültige Aufklärung des Bindungsmodus eines Inhibitors zum Targetenzym bedeuten müssen. Neueste Untersuchungen deuten klar darauf hin, dass aufgrund von Differenzen in räumlicher oder chemischer Mikroumgebung sowie durch unterschiedliche Packungsbetrachtungen bzw. Kristallisationsbedingungen oder sogar durch die Methodenwahl, d.h. Co-Kristallisation gegen „Soaking“, starke Einflüsse auf die erhaltene Kristallstruktur und Ergebnisse auftreten können.^[84]

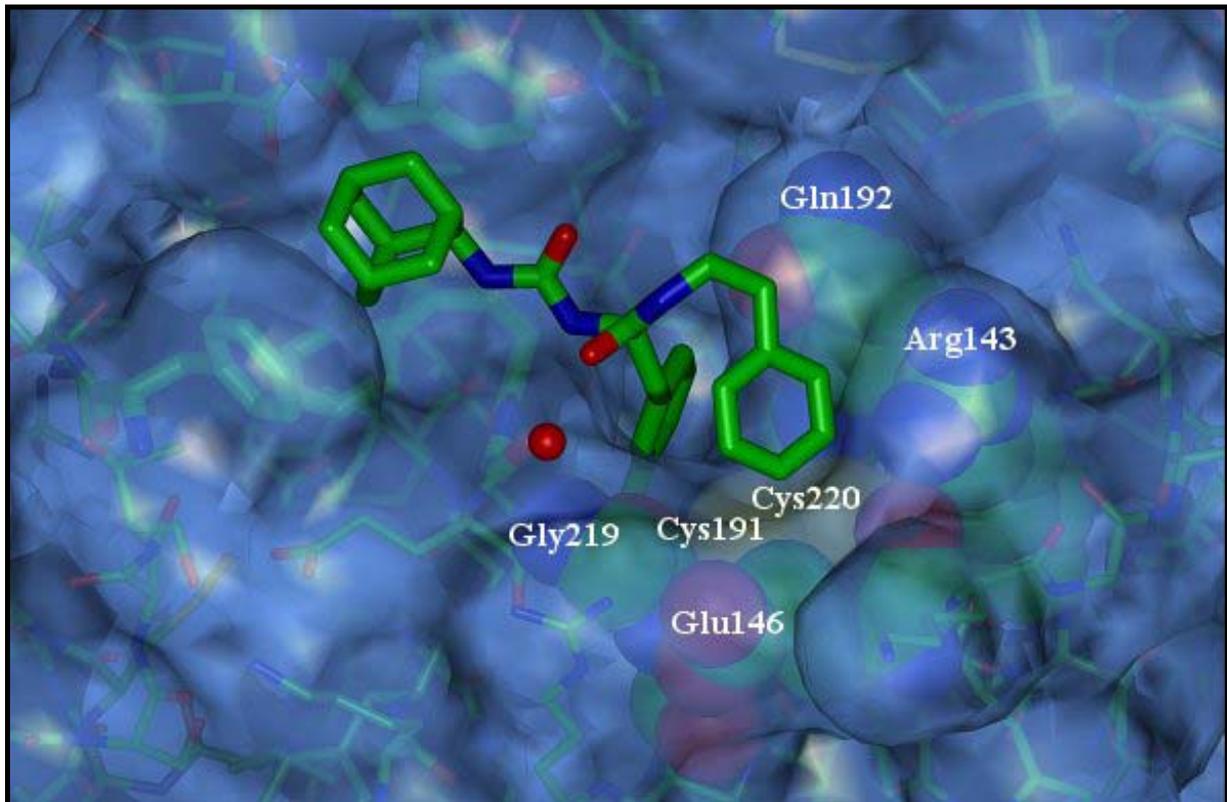


Abbildung 3-19: Halbtransparente Oberflächendarstellung des Faktor Xa/Inhibitor 11-Komplexes. Die am Aufbau der $S_{1\beta}$ -Bindungstasche beteiligten Aminosäuren von Faktor Xa sind in „CPK“-Darstellung nach Atomen eingefärbt und weiß beschriftet. Das sichtbare, am Bindungsmodus beteiligte Wasser ist als rote Kugel wiedergegeben.

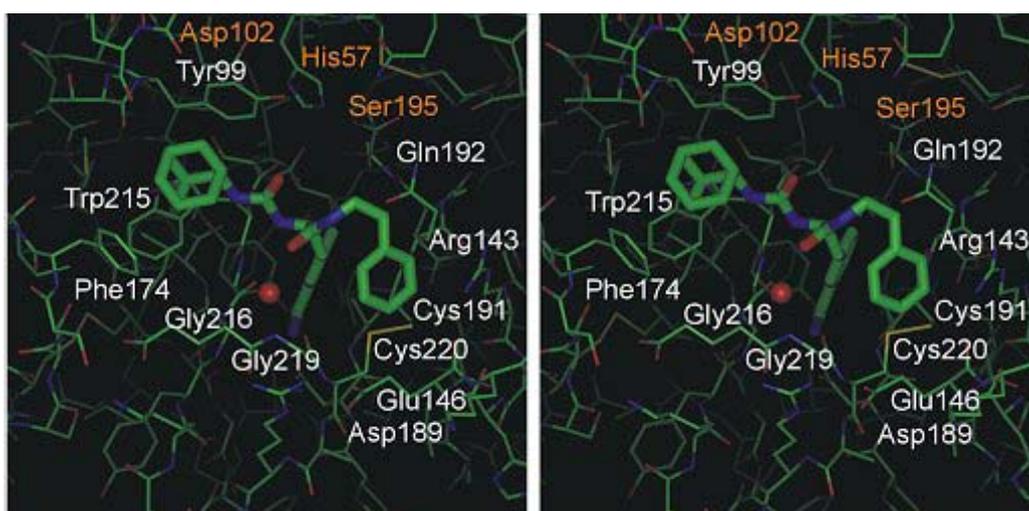


Abbildung 3-20: Stereobild der Bindungs-Interaktionen zwischen Faktor Xa und dem Inhibitor 11. Die beteiligten Aminosäuren sind in Weiß, die der katalytischen Triade sind in Orange dargestellt.

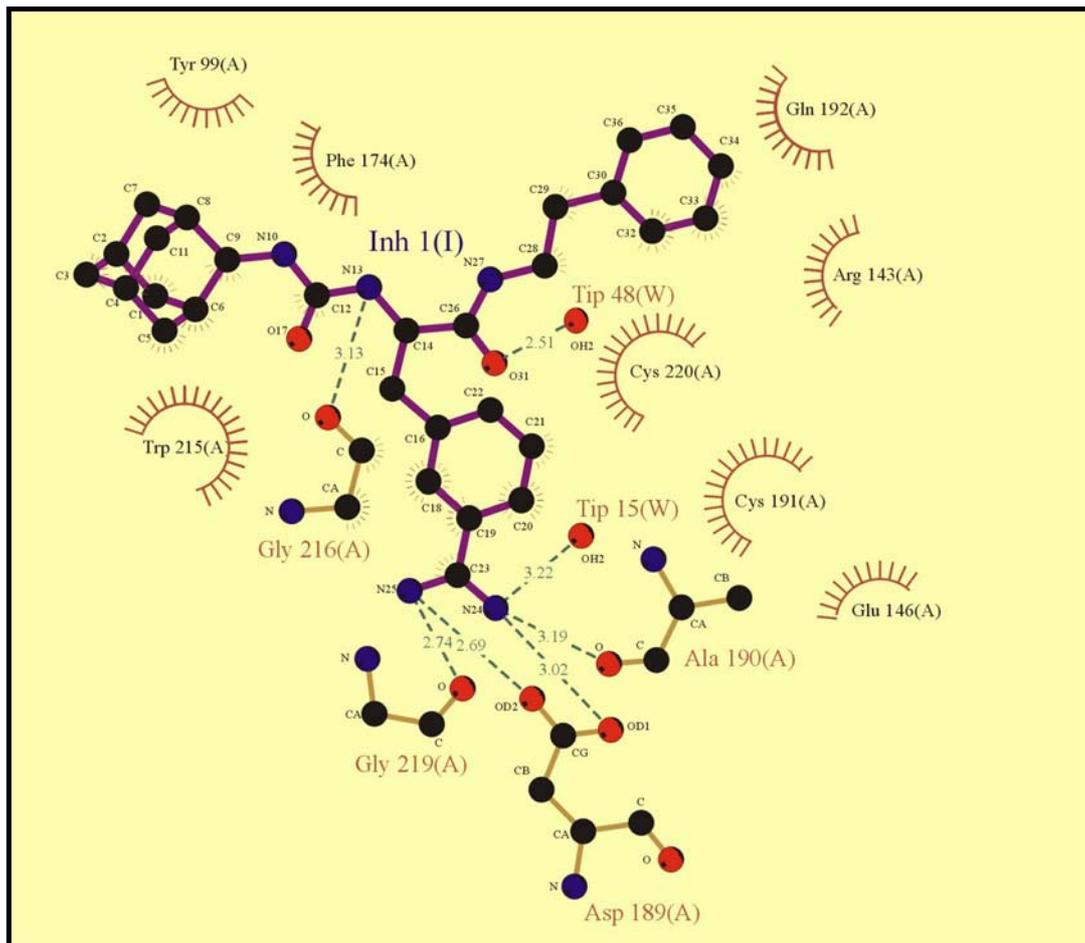


Abbildung 3-21: LIGPLOT des Inhibitors 11, der die Interaktionen und räumlichen Abstände des Bindungsmodus zweidimensional veranschaulicht.^[85] Kohlenstoff ist in Schwarz, Stickstoff in Blau und Sauerstoffatome sind in Rot gefärbt. Die kovalenten Bindungen des Inhibitors 11 („Inh 1“ bzw. I) selbst sind in Violett, die der Aminosäuren (A) des Enzyms in Braun dargestellt. Direkte Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien und ihre Abstände in [Å] angegeben. Beteiligte Wassermoleküle sind mit „Tip“ bzw. (W) gekennzeichnet. Hydrophobe Interaktionen sind unterschiedlich stark als in die jeweilige Richtung weisende Striche symbolisiert.

Strukturbasierte Vorschläge zur Verbesserung der Leitstruktur von **11**

Bezüglich einer Verbesserung der Leitstruktur kann man aus der Kenntnis des Faktor Xa/Inhibitor **11**-Komplexes nun die folgenden Schlussfolgerungen ziehen. Die Adamantyl-Harnstoffgruppe, als P_{3/4}-Element, interagiert wie oben beschrieben nahezu optimal mit der S_{3/4}-Bindungstasche, sodass kein Anlass besteht, dieses Strukturelement an der Leitstruktur zu verändern. Ausnahme dabei wäre die Einführung einer polaren funktionellen Gruppe, beispielsweise einer Amino-Funktion, in 4-Position am Adamantyl-Ring - also gegenüberliegend zum Harnstoff-Stickstoff der Gruppe - mit dem sich zwei interessante Ansätze untersuchen ließen. Zum einen könnte eventuell der am oberen Ende der S₃/S₄-Region befindliche elektronegative Hohlraum, der von der Aminosäure Glu97 und den Carbonyl-Resten von Ile75 und Thr98 ausgebildet wird, für weitere Interaktionen adressiert werden. Zum anderen ist die Einführung einer weiteren polaren Gruppe wiederum dienlich, um die Plasma-Protein-Bindungs-Tendenz und somit die Eliminierung der Verbindung zu verringern. Als Kontrapunkt hierbei sei allerdings anzuführen, dass ein derartiger Derivatisierungsschritt syntheses technisch an der Adamantyl-Gruppe nicht trivial ist. Wie in Kapitel 3.6.1 für die Verbindung **28** bereits ausführlich beschrieben, bedeutet zudem der Austausch der Benzamidin-Ankergruppe, als P₁-Element, einen äußerst kritischen Schritt für die vorliegende Leitstruktur. Möglicherweise ist hierbei die Neuentwicklung einer Leitstruktur von Grund auf notwendig, um einen Erfolg zu erzielen. Somit bleiben für weitere Schritte in der Verbesserung der inhibitorischen Qualität der auf **11** basierenden Verbindungen C-terminale Derivate übrig. Das Dioxol-Derivat **19** und die Thiophen-Verbindung **22** deuten an, dass sich das besondere Merkmal der S_{1β}-Bindungstasche von Faktor Xa (wie auch uPA) für weitere Bindungs-Interaktionen auch sicherlich noch weiter ausschöpfen lässt. Mit dem (*R*-, *S*)-Methylester **24** konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass hier eine weitere Verknüpfungsmöglichkeit besteht, um über weitere Ester- oder Amid-Varianten S'-Bereiche der „active-site-cleft“ zu adressieren. Trotzdem wäre es sicherlich interessant, eine Röntgenstruktur-Analyse der Dioxol-Verbindung **19**, des Thiophen-Derivates **22** oder der freien Säure **25** komplexiert mit Faktor Xa zu erhalten, da

„Modeling“-Experimente bisher keinen schlüssigen Anhaltspunkt auf den genauen Bindungsmodus ergaben. Leider sind heutzutage derartige Kristallstruktur-Analysen immer noch mit sehr viel Aufwand verbunden, kostenintensiv und daher nur auf sehr wenige, ausgewählte Verbindungen beschränkt.

3.6.4 Studien zur Gerinnungshemmung und *in vivo*-Eliminierung

Die Bestimmung der Inhibitionskonstanten *in vitro* ist nur einer der ersten Schritte auf dem langen Weg zu einem potentiellen Wirkstoff. Der K_i -Wert gibt prinzipiell nur die Qualität der reinen Interaktion zwischen Inhibitor und Enzym in einfachster Umgebung ohne „physiologische Störquellen“ wieder und ist daher also keinesfalls ausreichend geeignet, um die biologische Aktivität einer Verbindung zu charakterisieren. Im Falle eines potentiellen Gerinnungshemmers, wie eines Faktor Xa-Inhibitors, schließen sich als nächste Schritte *in vitro* Gerinnungstests (im humanen sowie tierischen Plasma entsprechend den Tiermodellen) und *in vivo* tierexperimentelle Untersuchungen an.

Hemmung des Prothrombinase-Komplexes

Eine wichtige Fragestellung bei der Entwicklung von Faktor Xa-Inhibitoren ist, ob eine Verbindung den Prothrombinase-Komplex zu hemmen vermag. Unter physiologischen Bedingungen liegt aktivierter Faktor X praktisch nicht in freier Form vor, sondern bildet mit Faktor Va und zweifach geladenen Calciumkationen an Phospholipid-Membranen den Prothrombinase-Komplex (vgl. Kapitel 3.1). Es ist allerdings bis heute noch nicht eindeutig geklärt, ob die Hemmung von Faktor Xa im Prothrombinase-Komplex anderen Struktur-Wirkungs-Beziehungen folgt als die Hemmung von freiem Faktor Xa, wie wir ihn im Enzymtest vorliegen haben. Folglich muss ein wirksamer Faktor Xa-Inhibitor auch in der Lage sein, den Komplex zu inhibieren, um überhaupt signifikant hemmend in den Gerinnungsprozess einzugreifen. Für *WX-FX4* (**11**) ergibt sich mit einer $IC_{50} = 1520$ nM (vgl. freier Faktor Xa $K_i = 74$ nM) eine sehr schlechte Hemmung des Komplexes. Im Vergleich liegt *DX-9065a* (vgl. Abbildung 3-22) bei einem $IC_{50} = 290$ nM (vgl. freier Faktor Xa $K_i = 24$ nM) und hemmt damit den Komplex ca. 5 mal besser. Ausschlaggebend für die geringe Hemmwirkung gegenüber dem Prothrombinase-Komplex könnte die Hydrophobizität von **11** sein, die eine starke Plasma-Eiweiß-Bindung bedingt.

Derartige unspezifische Bindungen könnten den Eintritt des Inhibitors in das aktive Zentrum des Faktors Xa im Prothrombinase-Komplex verhindern.

***In vitro* Gerinnungshemmung**

Durch die Gerinnungstests *in vitro* erfolgt eine erste Einschätzung der Hemmwirkung im Blut. Die Bestimmung der Gerinnungshemmung im Plasma der jeweiligen Spezies, in der z. B. später ein Thrombose-Modell durchgeführt werden soll (in diesem Fall ein Rattenmodell), erlaubt die Abschätzung, ob dieses überhaupt ein sinnvolles Ergebnis liefern kann. Oftmals ergeben sich nämlich Diskrepanzen zwischen der Gerinnungshemmung in humanem und tierischem Plasma aufgrund der evolutionsbedingt nicht deckungsgleichen Enzymtopologie und somit unterschiedlichen Struktur-Wirkungs-Beziehung für die Hemmung der Zielenzyme in den unterschiedlichen Spezies. Hierbei wird *in vitro* die Abhängigkeit der Gerinnungszeit von der Inhibitor-Konzentration, der IC_{200} ermittelt, welcher einer Verdopplung (Verlängerung auf 200 %) der Gerinnungszeit gleichbedeutend ist. Dazu werden die jeweiligen Werte IC_{200} der Thrombinzeit (TT), der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) und der Prothrombinzeit (PT) gemessen. Für die Verbindung **11** wurden im humanen Plasma die IC_{200} -Werte: 9.0 μM (TT), 3.6 μM (aPTT) und 3.1 μM (PT) ermittelt. *DX-9065a* hat als Faktor Xa-Inhibitor im Vergleich dazu, außer der TT, bessere Werte mit IC_{200} : > 1000 μM (TT), 1.67 μM (aPTT) und 0.53 μM (PT). Da selektive Faktor Xa-Inhibitoren Thrombin kaum hemmen, wird die TT kaum beeinflusst, während die aPTT- und PT-Werte vergleichsweise verlängert werden. Die Thrombin-Inhibitoren *NAPAP* und *Melagatran* (vgl. Abbildung 3-22) liegen bei IC_{200} : 0.045 μM (TT), 0.5 μM (aPTT) und 1 μM (PT) bzw. IC_{200} : 0.015 μM (TT), 0.24 μM (aPTT) und 0.37 μM (PT) und zeigen sich somit viel wirksamer in diesen Tests. Damit wird deutlich, dass **11** mit weitaus höheren Konzentrationen für die Hemmung der Gerinnung eingesetzt werden muss. Bei den meisten Faktor Xa-Inhibitoren sind für die Hemmung der Gerinnung in der Ratte höhere Konzentrationen notwendig. So ergibt sich für **11** im Rattenplasma im Vergleich zu den oben genannten

Werten im humanem Plasma ein IC_{200} : 12.5 μ M (TT), 1.96 μ M (aPTT) und 4.03 μ M (PT).^[86]

Pharmakokinetik

Im Versuchstier wird als Thrombose-Modell untersucht, ob sich eine biologische Wirksamkeit d. h. in unserem Falle eine antithrombotische Wirkung *in vivo* nachweisen lässt. Allerdings ist die antithrombotische Wirkung eines Hemmstoffes in einem Versuchstier nicht nur das Ergebnis der *in vitro* ermittelten enzym- bzw. der gerinnungshemmenden Aktivität, sondern sie wird auch durch die physiko-chemischen Eigenschaften und die aktuelle Konzentration des Inhibitors im Blut selbst beeinflusst. Im Hinblick auf die physiko-chemischen Eigenschaften wird im einfachsten Fall die Plasma-Protein-Bindung bestimmt, die ein verlässliches Maß für die Verfügbarkeit des Inhibitors im Blut darstellt. Zur Erfassung des pharmakokinetischen Verhaltens einer Substanz wird ihre Verteilung und die Eliminierung aus der Zirkulation nach i.v.-Gabe von 1 mg/kg an der Ratte bestimmt.^[87]

Für **11** (vgl. Tabelle 3-1, Kapitel 3.6.1) zeigt sich im Tiermodell an der Ratte ein sehr schneller Abfall des wirksamen Plasmaspiegels nach i.v.-Injektion (1 mg/kg Körpergewicht). Trägt man den ermittelten Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf von **11** mit dem von bekannten, ebenfalls untersuchten Faktor Xa- (Daichi DX-9065a) und Thrombin-Inhibitoren (*NAPAP*, *Melagatran*) auf, so wird sofort ersichtlich, dass der Plasmaspiegel des Inhibitors sehr schnell abfällt. Bereits nach 5 min beträgt die Konzentration nur noch 0.29 μ l/ml. Für DX-9065a wurden dagegen zum gleichen Zeitpunkt 3.8 μ l/ml, für *Melagatran* 2.9 μ l/ml und für *NAPAP* 0.78 μ l/ml bestimmt (Abbildung 3-22).^[86] Dies ist sehr wahrscheinlich auf den hydrophoben Charakter der Verbindung **11** zurückzuführen. Es wurde gezeigt, dass hydrophile Verbindungen, insbesondere wenn sie mehrere geladene Gruppen tragen wie DX-9065a (2 basische Gruppen) oder *Melagatran* (1 basische, 1 saure Gruppe) deutlich langsamer aus der Zirkulation eliminiert werden.^[87] Im Gegensatz dazu wird *NAPAP* – wie **11** – mit jeweils nur einer basischen Gruppe ebenfalls schnell ausgeschieden.

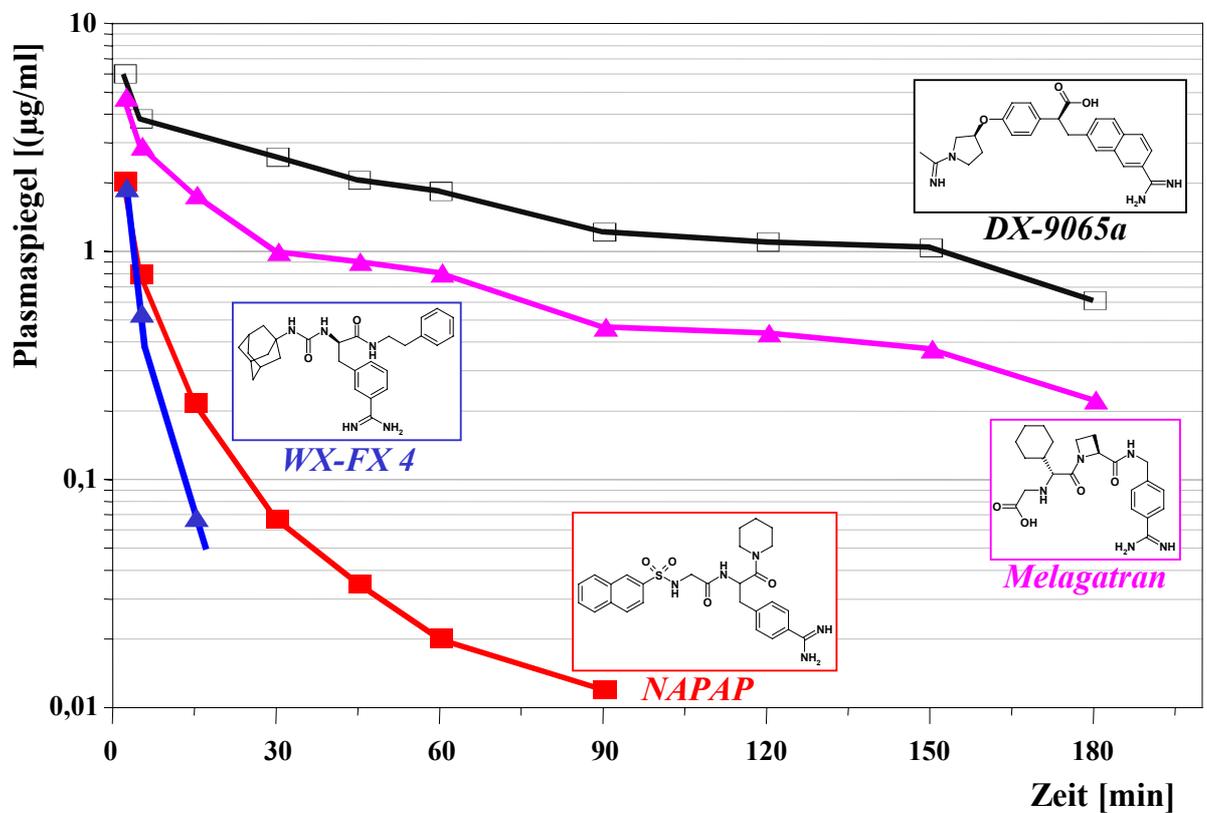


Abbildung 3-22: Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf der Thrombin-Inhibitoren NAPAP (rot) und Melagatran (magenta) sowie der Faktor Xa-Inhibitoren DX-9065a (schwarz) und WX-FX4 (11, blau) nach i.v.-Injektion von 1 mg / kg Körpergewicht an der Ratte.

Aufgrund der sehr raschen Eliminierung von **11** wurde versucht, seine Eigenschaften mittels Derivatisierung zu verbessern. Ansatzpunkt dabei war, dass durch die Einführung einer weiteren polaren Gruppe der hydrophobe Charakter der Verbindung reduziert werden könnte. Die Substitution des Phenethylamid-Restes durch ein weiteres Phenylalanin schien dabei effektiv (Abbildung 3-23). Wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben erwies sich die Methylester-Verbindung **24** mit (*S*)-Konfiguration, $K_i = 78$ nM, des C-terminalen Phenylalanins als wirksamer als das (*R*)-Enantiomer **23** und wurde somit als Basis ausgewählt.

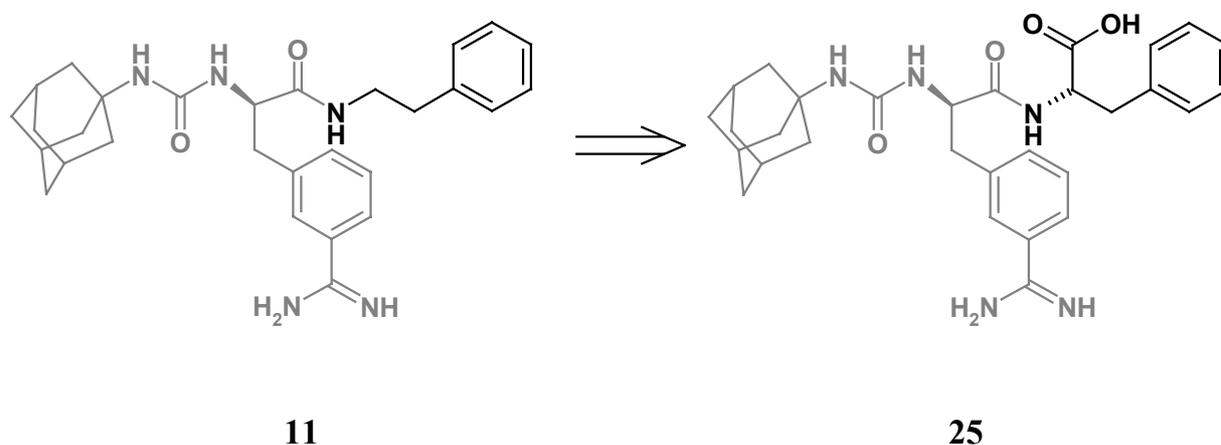


Abbildung 3-23: Derivatisierungsansatz: Einführung einer polaren Gruppe in die Struktur von **11**, synthetisiert wurde die freie Säure **25**.

Mit einem $K_i = 54$ nM erwies sich die Säure **25** zwar als immer noch sehr potent und auch selektiv (vgl. Tabelle 3-1, Kapitel 3.6.1), jedoch zeigte sie im Tiermodell im Vergleich mit den oben genannten Inhibitoren nur eine marginal verbesserte Eliminierungsrate (Abbildung 3-24). Damit kann gefolgert werden, dass mit der durchgeführten Derivatisierung zwar eine weitere geladene Gruppe eingeführt werden konnte, aber offenbar auch sterische Voraussetzungen notwendig sind, um die erwünschte Verbesserung zu erzielen.

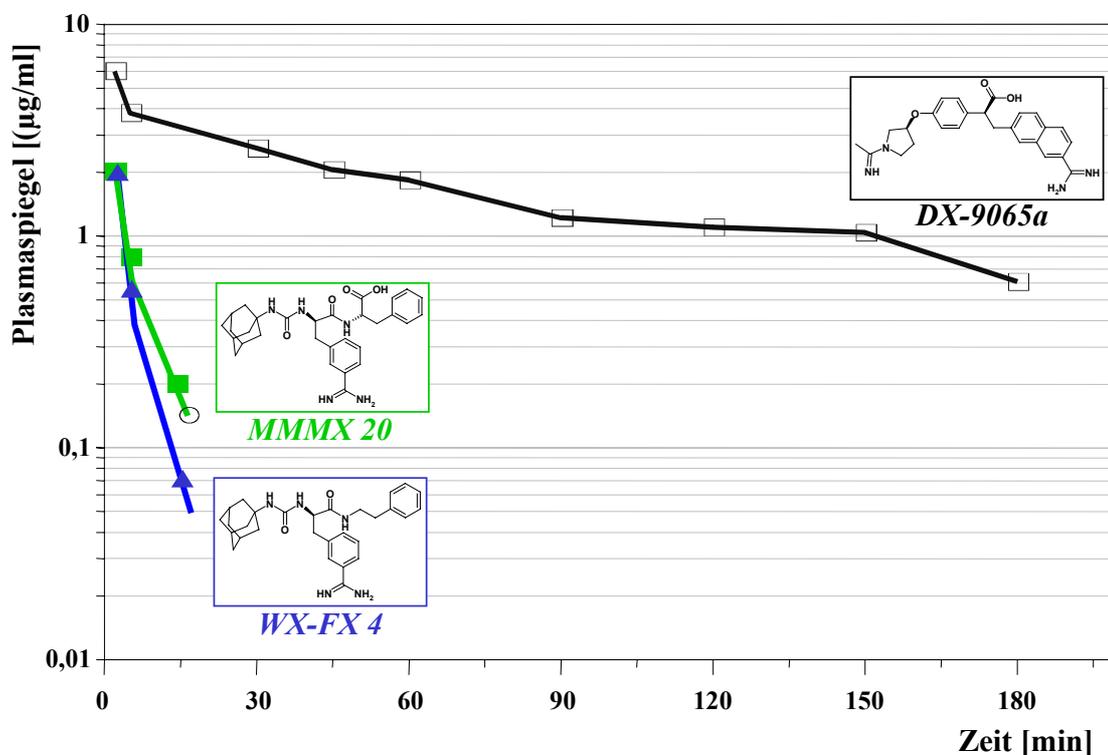


Abbildung 3-24: Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf der Faktor Xa-Inhibitoren DX-9065a (schwarz), WX-FX4 (11, blau) und der derivatisierten freien Säure MMMX 20 (25, grün) nach i.v.-Injektion von 1 mg / kg Körpergewicht an der Ratte.

Hemmung der Thrombusbildung

In einem Tiermodell, das an der Ratte durchgeführt wird, kann die antithrombotische Wirksamkeit einer Verbindung bestimmt werden.^[88] Die zu testende Substanz wird in verschiedenen Dosierungen injiziert. Nach 5 min wird glaskontaktaktiviertes Humanserum systemisch als Thrombosenauslöser appliziert und anschließend eine Vene des Tieres abgebunden. Nach 20 min wird diese Vene präpariert und die entstandenen Thromben makroskopisch beurteilt. Es wird ein sogenannter Thrombus-Score (0 – 3) vergeben, wobei 0 flüssiges Blut ohne Thromben, 1 ein oder mehrere

kleine Thromben, 2 mehrere große Thromben, die das Gefäß aber nicht vollständig ausfüllen und 3 einem großen Thrombus entspricht, der die Ader zu verschließen vermag. Bei den ungünstigen physiko-chemischen (Plasma-Eiweiß-Bindung) und pharmakokinetischen Voraussetzungen (schnelle Eliminierung) war es nicht überraschend, dass **11** im Tiermodell zur Erfassung der antithrombotischen Aktivität nach Wessler unwirksam war und einen Thrombus-Score von 3 bei Gabe von 1 mg/kg erzielte. Im Vergleich dazu erzielte der Faktor Xa-Inhibitor DX-9065a einen Score von 2.3 und die beiden Thrombin-Inhibitoren *NAPAP* und *Melagatran* 1.5 bzw. 0 im selben Modell bei der Dosis von 1 mg/kg.^[86]

Zusammenfassend kann zum Inhibitor **11** und seinem Derivat **25** gesagt werden, dass beide aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften (Hydrophobizität) bzw. Struktur (Position der geladenen Gruppen) keine Startstrukturen für eine Weiterentwicklung als Antikoagulans sind. Das betrifft insbesondere die schlechte gerinnungshemmende Aktivität, die mangelnde Hemmwirkung gegenüber dem Prothrombinase-Komplex und die rasche Eliminierung aus der Blutbahn. Trotz seiner hohen Selektivität und des exzellenten K_i -Wertes zeigen schon erste pharmakologische Bewertungskriterien, dass **11** nicht die notwendigen Anforderungen an einen Gerinnungshemmer erfüllt, um ihn zum Arzneimittel weiter zu entwickeln.

3.6.5 *In vivo*-Untersuchung zur anti-metastatischen Wirkung von **11**

Der niedermolekulare Faktor Xa Inhibitor *WX-FX4* (**11**) wurde in zwei unterschiedlichen Tumormodellen an der Maus zur Untersuchung seiner anti-metastatischen Wirkung eingesetzt. Diese wurden in Kooperation mit dem Arbeitskreis PD Achim Krüger am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Klinikum Rechts der Isar, Technische Universität München, von Ingo Banke durchgeführt.^[14]

Vorausgehende Forschungsarbeiten dieser Arbeitsgruppe deuteten im T-Zell-Lymphommodell darauf hin, dass Faktor Xa oder ein Faktor Xa-ähnliches Enzym im Metastasierungs-geschehen bei Krebs eine entscheidende Rolle spielen könnte.^[14]

Im ersten Tumormodell, einem experimentellen *syngen* T-Zell-Lymphommodell (Dauer 7 Tage^[89]) mit immunkompetenten Mäusen, welches modelltypisch in die Leber metastasiert, wurden die entstandenen Metastasen (> 0.2 mm) auf der Leberoberfläche nach X-gal Färbung ausgezählt. Die Daten sind in Abbildung 3-25 als Relativwerte mit Standardfehler im Vergleich zu der Kontrollgruppe dargestellt. Wie daraus zu ersehen ist, konnte in der Behandlungsgruppe mit **11** eine signifikante Reduktion der Lebermetastasen um 91 % im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht werden ($p < 0.0001$).

Im zweiten Modell, einem experimentellen *xenogen* Fibrosarkommodell (Dauer: 23 Tage) mit immundefizienten Nacktmäusen, welches modelltypisch in die Lunge metastasiert, wurden die entstandenen Metastasen (> 0.2 mm) auf der Lungenoberfläche nach X-gal Färbung ausgezählt. Die Daten sind in Abbildung 3-26 wiederum als Relativwerte mit Standardfehler im Vergleich zu der Kontrollgruppe dargestellt. Wie hierbei zu ersehen ist, konnte in der Behandlungsgruppe mit **11** eine signifikante Reduktion der Lebermetastasen um 63.9 % im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht werden ($p < 0.0001$).

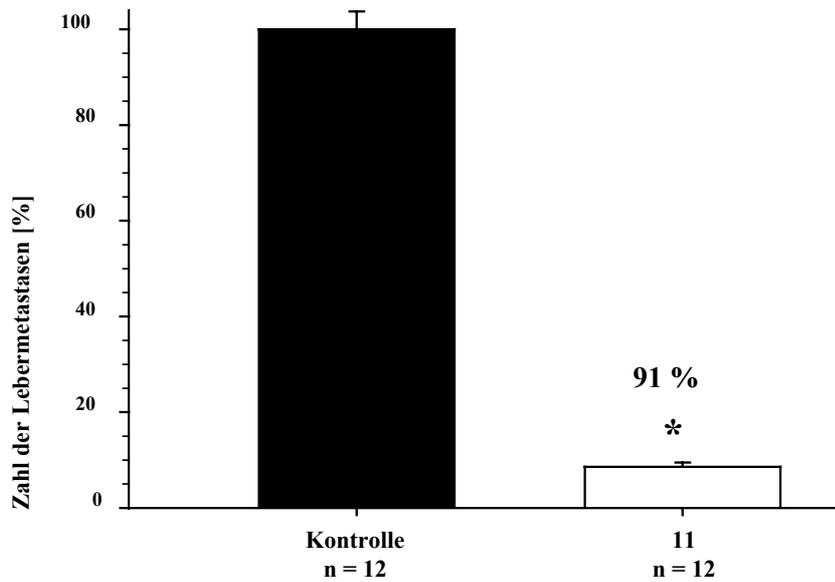


Abbildung 3-25: *Anti-metastatische Effizienz von 11 im experimentellen syngenem T-Zell-Lymphommodell mit Lebermetastasen. n = Anzahl der Versuchstiere in der jeweiligen Gruppe.*

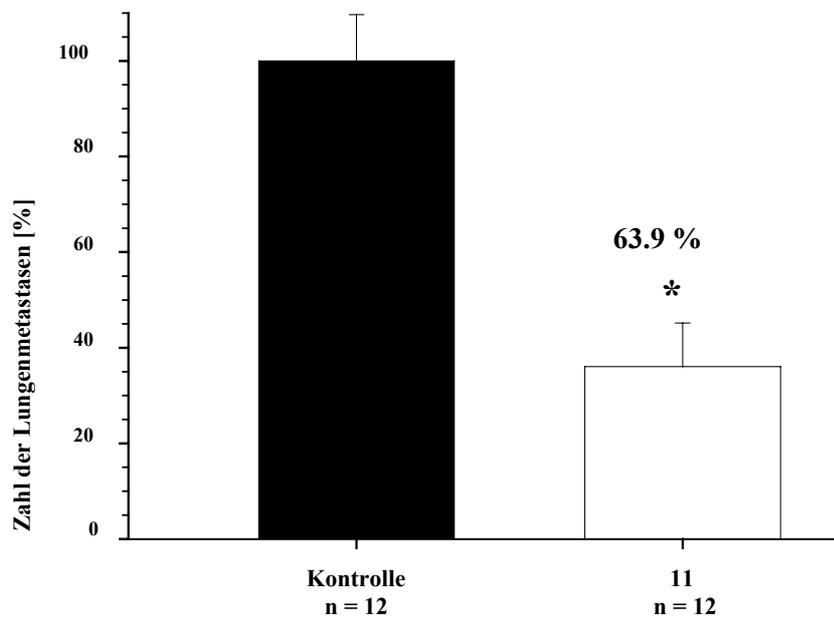


Abbildung 3-26: *Anti-metastatische Effizienz von 11 im experimentellen xenogenen Fibrosakrommodell mit Lungenmetastasen. n = Anzahl der Versuchstiere in der jeweiligen Gruppe.*

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass bei den behandelten Mäusen in beiden Modellen keine relevanten sichtbaren Blutungskomplikationen sowie Veränderungen des Gerinnungsstatus auftraten. Das könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass **11** den Prothrombinasekomplex nicht hemmt und sehr schnell aus dem Plasma selbst eliminiert wird (siehe Kapitel 3.6.4). Dies macht diesen Inhibitor einerseits zu einem ineffizienten Gerinnungshemmer, aber andererseits eventuell gerade geeignet für den Einsatz als anti-metastatisch wirksames Therapeutikum, da keine relevanten Blutungen als unerwünschte Nebenwirkung im Tier auftreten (vgl. Kapitel 3.6.4, nach 5 min beträgt die Plasmakonzentration nur noch 0.29 µl/ml). Die genauen Wirkmechanismen der Verbindung **11** bleiben hierbei noch aufzuklären. Zentrale Frage ist vor allem, ob im Mausmodell inhibierter Faktor-Xa die eigentliche Ursache für die signifikante Reduktion der Metastasierung ist oder ob die Inhibition eines Faktor-Xa ähnlichen Enzyms die entscheidende Rolle spielt.^[14] Dies kann vom derzeitigen Standpunkt aus noch nicht beantwortet werden. Hinweise mittels computertechnischer „Docking“-Experimente der Röntgenkristallstruktur des Inhibitors und Röntgenkristallstrukturen in Frage kommender Enzyme konnten nicht gefunden werden. Der Grund hierfür ist, dass nahezu keine Mausenzymstrukturen untersucht oder publiziert worden sind, da das Hauptaugenmerk bei Strukturaufklärungen in erster Linie auf humanen Strukturen liegt. Gerade zur Aufklärung von Nebeneffekten in den oft verwendeten und einfacheren Tiermodellen wie der Maus wäre dies unter Umständen hilfreich. Beide Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Inhibition von Faktor Xa oder einem Faktor-Xa ähnlichem Enzym eine signifikante Hemmung der Metastasierung bewirkt. Dies öffnet unter Umständen eine völlig neue Dimension im Bereich der Faktor Xa-Inhibitoren, die über den ursprünglichen Bereich, der Suche nach einem wirksamen und sicheren Antithrombotikum, weit hinausreicht und möglicherweise in der Entwicklung neuartiger und wirksamer anti-metastatisch wirksamer Medikamente münden kann. Weitere Untersuchungen an Tiermodellen an der Maus mit dem Inhibitor **11** sind in der Arbeitsgruppe von PD. Dr. Krüger bereits in Arbeit bzw. in Planung. Darunter sollen auch Kombinationsversuche mit anderen anti-metastatisch wirksamen Substanzen zeigen, ob sich eventuell verstärkende Effekte zeigen lassen, um die Effizienz noch weiter zu erhöhen.

4 uPA-Inhibitoren

4.1 Tumorprogression und Metastasierung

Nach Angaben der amtlichen Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes Deutschland in Wiesbaden gab es im Jahr 1999 119092 Sterbefälle, die auf sogenannten bösartigen Neubildungen basierten. Ausgenommen hierbei sind Unterarten des Hautkrebses, die nicht auf Melanomen basieren. Die Zahl der Neuerkrankungen wird pro Jahr auf etwa 344500 eingeschätzt. Unter dem Begriff „Krebs“ werden hierbei alle bösartigen Neubildungen einschließlich der primär systemischen Lymphome und Leukämien verstanden. Dabei umfassen die 5-Jahres-Überlebensraten mit Krebs einen breiten Bereich von sehr günstigen Raten zwischen 75 % und mehr als 90 % für Lippen-, Hodenkrebs sowie malignes Melanom der Haut bis hin zu sehr ungünstigen Überlebensraten von unter 10 % bei Speiseröhren-, Bauchspeicheldrüsen- und Lungenkrebs. Man geht davon aus, dass durch das Auftreten einer Krebserkrankung den Frauen und Männern statistisch gesehen im Mittel 8 Jahre ihrer Lebenserwartung verloren gehen. Die Entstehung von Krebs wird dabei nicht auf eine einzige Ursache zurückgeführt, sondern auf ein Geflecht verschiedenster Faktoren. Als vermeidbare Faktoren gelten schlechthin Rauchen, falsche Ernährung, erhöhter Alkoholgenuss und als weitere Risikofaktoren Expositionen am Arbeitsplatz, Einflüsse aus der Umwelt wie Sonneneinstrahlung und Radon in Innenräumen, desweiteren genetische Faktoren sowie Infektionen.^[90]

Größtenteils sind die Todesursachen jedoch nicht auf die Effekte des Primärtumors selbst, sondern auf die Verteilung und das Wachstum metastatischer Tumore zurückzuführen. So haben Patienten, deren Primärtumor rechtzeitig diagnostiziert wurde, bevor sich dort metastatische Zellen ablösen und an entfernten Orten Sekundärtumore bilden konnten, meist eine sehr gute Heilungsprognose. Eine Metastase ist dabei klinisch definiert durch den Endpunkt des Prozesses, der zur Entdeckung einer Tochtergeschwulst an einem Ort fern ab vom Primärtumor führt.^[91] Der Prozess der Metastasierung ist in Abbildung 4-1 verdeutlicht.^[92] Dabei gelingt es Tumorzellen, einen Primärtumor zu verlassen und über eine Tumorerkrankung an einem

anderen Ort einen Sekundärtumor auszubilden. Anfänglich führt eine transformierte Zelle durch klonale Expansion und Wachstum nur zur Ausbildung des ursprünglichen Primärtumors. Weiteres Wachstum und die Ausbildung sogenannter metastatischer Subklone führen zur Anhaftung sowie Invasion durch die abgrenzende Basalmembran und schließlich zur Invasion durch die extrazelluläre Matrix. Danach gelangen die Tumorzellen nach Durchbrechung der Basalmembran in ein Lymph- oder Blutgefäß und somit in die Zirkulation im Körper. Dort können sie in der Blutbahn mit Lymphozyten und Blutplättchen interagieren und bilden dabei Tumorzellhaufen, die wiederum an anderen Orten sich an die Basalmembran der Gefäße heften können. Von dort aus gelingt eine Extravasation in das umliegende Gewebe und ein Sekundärtumor kann letztendlich zu wachsen beginnen.

Bei der Krebsbehandlung selbst treten in diesem Zusammenhang zwei große Probleme auf. Erstens können die Patienten meist nicht rechtzeitig diagnostiziert und dabei gleichzeitig bestimmt werden, ob eine Metastasierung bereits zum Zeitpunkt der Diagnose begonnen hat. Zweitens ist die Frage zentral, wie man Patienten am besten behandelt, die bereits eine Metastasierung aufweisen oder wo dieser Prozess wahrscheinlich schon anzunehmen ist. In einigen Fällen sind offenkundig Metastasen zum Zeitpunkt des Auftretens des Primärtumors nachweisbar, bei anderen können sie zum selben Zeitpunkt nicht erfasst werden. Somit liegen meist nur Prognosen vor, die sich lediglich auf Wahrscheinlichkeiten und Präsenz verschiedenster diagnostischer Indikatoren bei unterschiedlichen Krebsarten gründen. Deshalb ergibt sich ein weiterer Forschungsbedarf, um den Bestimmungsprozess für die Metastasen-Entwicklung zu verfeinern und geeignete Behandlungsmethoden nach erfolgten chirurgischen Eingriffen oder bei anderen Behandlungen des Primärtumors, zu entwickeln.^[91]

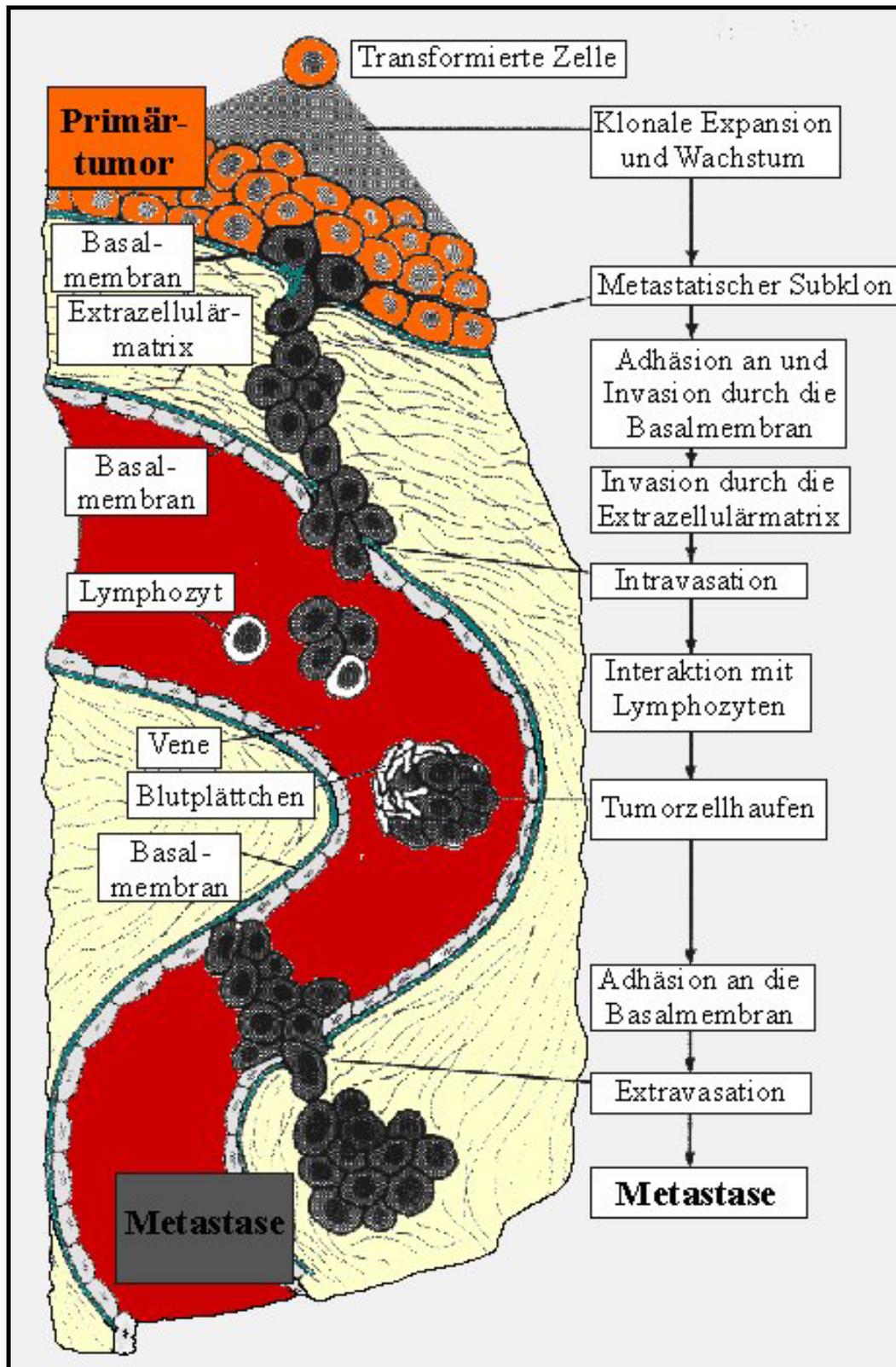


Abbildung 4-1: Prozess der Metastasierung: Krebszellen in Grau lösen sich vom Primärtumor in Orange ab und wandern hier über die Blutbahn zum Ort der Metastasenbildung. Die Basalmembran ist in Grün, die extrazelluläre Matrix in Gelb, und Lymphozyten sowie Blutplättchen sind in Weiß dargestellt.

4.2 Das uPA-uPAR-System

Um den Zellverband und somit den Ort eines Primärtumors verlassen zu können, ist für den Abbau der extrazellulären Matrix eine gerichtete proteolytische Aktivität der Tumorzellen notwendig. Hierbei spielen verschiedene Proteasen in unterschiedlichen proteolytischen Systemen eine maßgebliche Rolle, die untereinander agieren und sich gegenseitig beeinflussen können.^[93]

In Abbildung 4-2 sind die bisher bekannten Zusammenhänge schematisch dargestellt. In vorderster Linie stehen am Beginn der proteolytischen Aktivität die Serinproteasen, Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und Tissue-Type Plasminogen Aktivator (tPA). Der uPA-Rezeptor (uPAR, CD87) wird an den Zelloberflächen präsentiert. Das Zymogen pro-uPA wird als Einzelketten-Proenzym durch sogenannte Stromazellen sowie auch von Tumorzellen abgesondert und bindet anschließend an seinen Rezeptor. In dieser nun rezeptorgebundenen Form wird das Zymogen sehr effizient durch eine Amid-Bindungsspaltung zwischen Lys158 und Ile159 in seine aktive Form uPA umgewandelt. Dieser Schritt wird von den Serinproteasen Plasmin oder Kallekrein sowie durch die Cysteinproteasen Cathepsin B oder L durchgeführt. In dieser aktivierten Form beginnt nun uPA, das Zymogen der Serinprotease Plasmin - das Plasminogen - zu aktivieren. Die so steigende Anzahl an Plasmin erzeugt wiederum durch einen Feedback-Mechanismus noch höhere Raten an aktiviertem uPA. Als weitere Konsequenz aus der erhöhten Menge an aktiven Plasmin-Enzymen werden verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Fibrin, Fibronectin oder Lamelin abgebaut. Darüber hinaus werden durch Plasmin noch die Matrix Metallo-Proteasen (MMP) MMP-3, MMP-9 und MMP-12 aktiviert, die ihrerseits die spezifische Proteolyse des Collagen-Typs I, II und III der extrazellulären Matrix oder des Collagen-Typs IV der Basalmembran verursachen.^[94] Diese proteolytischen Prozesse sind eigentlich durch die Evolution hervorgerufene komplexe und essentielle Schritte, die bei der Wundheilung und Remodulation des Gewebes eine entscheidende Rolle spielen. Im Falle der Krebszellen jedoch wird so eine Tumorzellen-Invasion in benachbartes Gewebe ermöglicht, die in einer Metastasierung an anderen Orten im Körper enden kann.

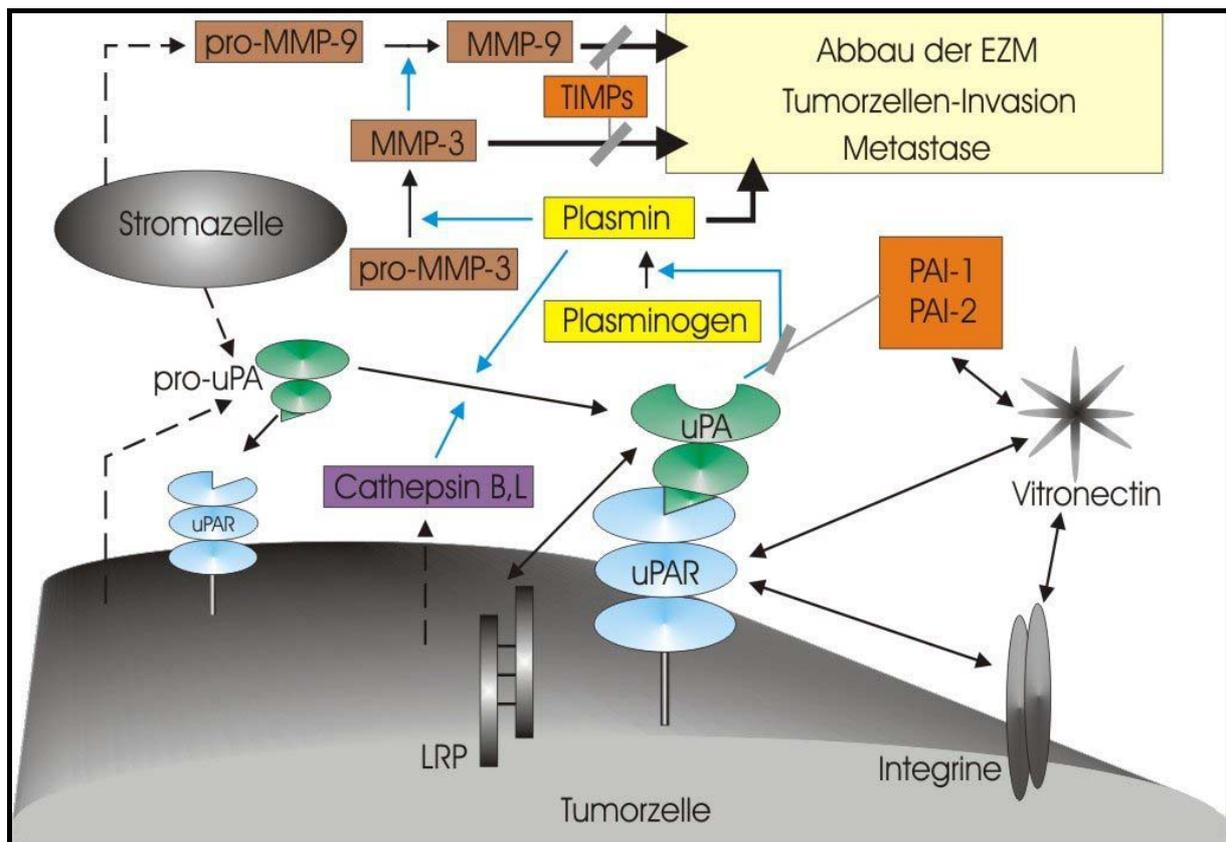


Abbildung 4-2: Modell der proteolytischen Aktivierungskaskade: Zusammenspiel des uPA-uPAR-Systems (blau der uPA-Rezeptor, grün uPA und gelb Plasmin) mit anderen extrazellulären Komponenten (braun MMP-3 und MMP-9, violett Cathepsin B und L, Vitronectin und Integrine), das auch zur Metastasierung führen kann. Die natürlichen Inhibitoren TIMP und PAI-1 und PAI-2 sind in Orange gezeigt. Gestrichelte Pfeile geben Expression, blaue Aktivierungsschritte und beidseitigweisende Pfeile Interaktionen wieder.

Das uPA-uPAR-System wird natürlicherweise von den Serine-Protease-Inhibitoren, abgekürzt auch „Serpine“ genannt, reguliert. Neben den beiden hauptaktiven Inhibitoren Plasminogen Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) und Plasminogen Aktivator-Inhibitor Typ 2 (PAI-2) spielen noch die Proteinase Nexin-1 (PN-1) und der Protein C-Inhibitor (PCI) eine untergeordnete Rolle. Diese natürlichen Inhibitoren werden später in Kapitel 4.6 noch näher erläutert.

Darüberhinaus ist die MMP-Aktivität unter der Kontrolle der Tissue-Inhibitoren der Matrix-Metallo-Proteasen, abgekürzt auch „TIMPs“ genannt, die die proteolytische Aktivität dieser Enzyme inhibieren und somit herunterregeln können.^[95]

Proteasen, die an der oben beschriebenen, proteolytischen Aktivierungskaskade direkt oder indirekt beteiligt sind, können im Überblick nach Familien nochmals wie folgt in Tabelle 4-1 dargestellt werden:

Klasse	Familie	Protease
Serin-Proteasen	S	uPA, tPA, Plasmin
Cystein-Proteasen	C	Cathepsin B, H, L
Aspartat-Proteasen	A	Cathepsin D
Metallo-Proteasen	M	MMP-3, -9, -12, -13

Tabelle 4-1: Die Proteasen der proteolytischen Aktivierungskaskade nach Familien geordnet.

4.3 Klinische Relevanz von uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2

In Kapitel 4.1 wurde bereits erläutert, dass meist mangels geeigneter Diagnostik nur Prognosen vorgenommen werden können, die sich lediglich auf Wahrscheinlichkeiten und Präsenz verschiedenster diagnostischer Indikatoren bei unterschiedlichen Krebsarten gründen, um eine Abschätzung für den einzelnen Patienten und die Therapie treffen zu können. Dabei konnten zahlreiche Untersuchungen bisher schon die klinische Relevanz im Falle von uPA, PAI-1 und des uPA-Rezeptors und deren angehobene Antigenwerte bei Brust-, Magen-, Lungen- sowie Gehirntumor demonstrieren.^[96-99]

So ist gezeigt worden, dass hohe uPA-Werte nach einem operativen Eingriff zur Entfernung unterschiedlicher Primärtumorarten eine schlechte Prognose für das Überleben des Patienten bedeuten.^[100] Zu einer noch genaueren Einschätzung der Prognose können die PAI-1-Werte als spezifische Marker dienen. Unerwarteterweise sind dabei ebenfalls hohe Werte des uPA-Inhibitors Wegweiser einer schlechten Prognose für den Patienten, obwohl dieser Inhibitor naturgemäß die proteolytische Aktivität von uPA hemmt.^[101] Man vermutet als mögliche Ursache dieser Beobachtung, dass nachdem der trimere Komplex aus PAI-1/uPA/uPAR bei der Hemmung von uPA an der Oberfläche in die Zelle internalisiert wird, der uPA-Rezeptor regeneriert und in einer Form von „Rezeptor-Recycling“ anschließend wieder präsentiert wird. Damit kann es nach einer erneuten Bindung von uPA an den Zelloberflächen der Invasionsfront der Tumorzellen wiederum zur gerichteten proteolytischen Aktivität kommen.

Des Weiteren haben Untersuchungen des uPA-Rezeptor-Gehaltes gezeigt, dass hierbei hohe Antigenwerte im Tumorgewebe und sogar auch im Blut genauso mit einer schlechten Prognose verbunden sind.

Interessanterweise korrelieren im Kontrast zu den vorher genannten Markern hohe PAI-2-Werte mit einer guten Prognose für das Überleben des Patienten, wonach ein erneutes Auftreten der Krankheit nach vollständiger Ausheilung ausbleibt.

Einerseits ergeben sich somit Ansätze, um nach einer chirurgischen Entfernung des soliden Primärtumors geeignete, experimentell bestimmbare Parameter zur Hand zu haben, durch die das Risiko einer Neuerkrankung abgeschätzt werden kann und mit denen die Art und Intensität einer notwendigen Begleit- und Nachbehandlung, beispielsweise Bestrahlungs- oder Chemotherapie, festgelegt werden können. Andererseits zeigen diese Untersuchungen auch, dass das uPA-uPAR-System aufgrund seiner zentralen Rolle im Metastasierungsprozess pharmazeutische Ziele bietet, die zur Intervention in diesem Krankheitsgeschehen erfolgreich genutzt werden könnten.

Blickt man genauer auf den uPA-uPAR-Komplex, so ergeben sich sogar weitere Ansatzpunkte, die im folgenden nun alle zusammengefasst werden sollen (Abbildung 4-4). Der Komplex besteht aus der Serinprotease uPA, die wiederum aus der eigentlichen Proteasen-Domäne und den beiden weiteren Domänen, „Kringel-Domain“ und „Growth-Factor-Domain“, aufgebaut ist (siehe hierbei Kapitel 4.5) sowie aus uPAR, welcher aus einem Rezeptorteil (Domänen I-III) und einem Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI) besteht.

Als erstes können die sogenannten „uPA-active-site“-Inhibitoren genannt werden, die die proteolytische Aktivität von uPA direkt verringern sollen. Solche Inhibitoren werden in Kapitel 4.7 beschrieben und müssen in diesem Zusammenhang hochspezifisch sein, da sonst möglicherweise verwandte Serinproteasen mitgehemmt werden, was unter Umständen zu schweren Nebenwirkungen führen kann. Beispielsweise wäre die nicht-selektive Inhibition von Faktor Xa in größerem Ausmaß fatal für die Blutgerinnung und könnte somit zu schweren Blutungskomplikationen führen. Die Blockade des uPAR als Ansatzpunkt würde zu einer langsameren Aktivierung von uPA und zudem zu einer Aufhebung der Zellflächenfokussierung der proteolytischen Aktivität führen. Für diesen Rezeptor wurden hierfür beispielsweise vom Amino-Terminalen-Fragment (ATF) von uPA, das für die Interaktion mit uPAR verantwortlich ist, erfolgreich zyklische Peptide abgeleitet und weiterentwickelt. Diese vermögen in nahezu vergleichbarer Affinität wie uPA an uPAR zu binden.^[102-104] Weitere peptidische Antagonisten des uPAR wurden zudem über die Methode des „Bakteriophage Peptide Display“ identifiziert.^[105] Das sogenannte Å6-Peptid, ein anderer entwickelter Antagonist, wurde sogar bereits erfolgreich in einem Tumortiermodell eingesetzt.^[106] In jüngerer Zeit sind zudem auch nichtpeptidische niedermolekulare Inhibitoren synthetisiert worden, die als Antagonisten des Rezeptors wirken.^[107-109] Demgemäß stellt selbstverständlich auch uPA mit seiner „Growth-Factor-Domain“, mit der es am Rezeptor binden kann, einen Ansatzpunkt für Antagonisten dar. Auch hiermit liesse sich eine Fokussierung der Proteolyse auf der Zelloberfläche einschränken und die Aktivierung von Plasminogen verlangsamen. Ein möglicher Ansatz hierbei ist eine Variante von „löslichem“ uPAR, auch suPAR („soluble-uPAR“) genannt, mit dem zelloberflächengebundenes uPAR um die Bindung zu uPA konkurrieren muss.^[110]

Als vierte Möglichkeit ist noch die sogenannte Antisense-Methode zu nennen. Dabei kann unter Verwendung von unterschiedlichen Antisense-Nukleotiden eine Reduktion von uPA- und/oder uPAR-Expression auf Zellebene erreicht und somit die proteolytische Aktivität vermindert werden.^[111]

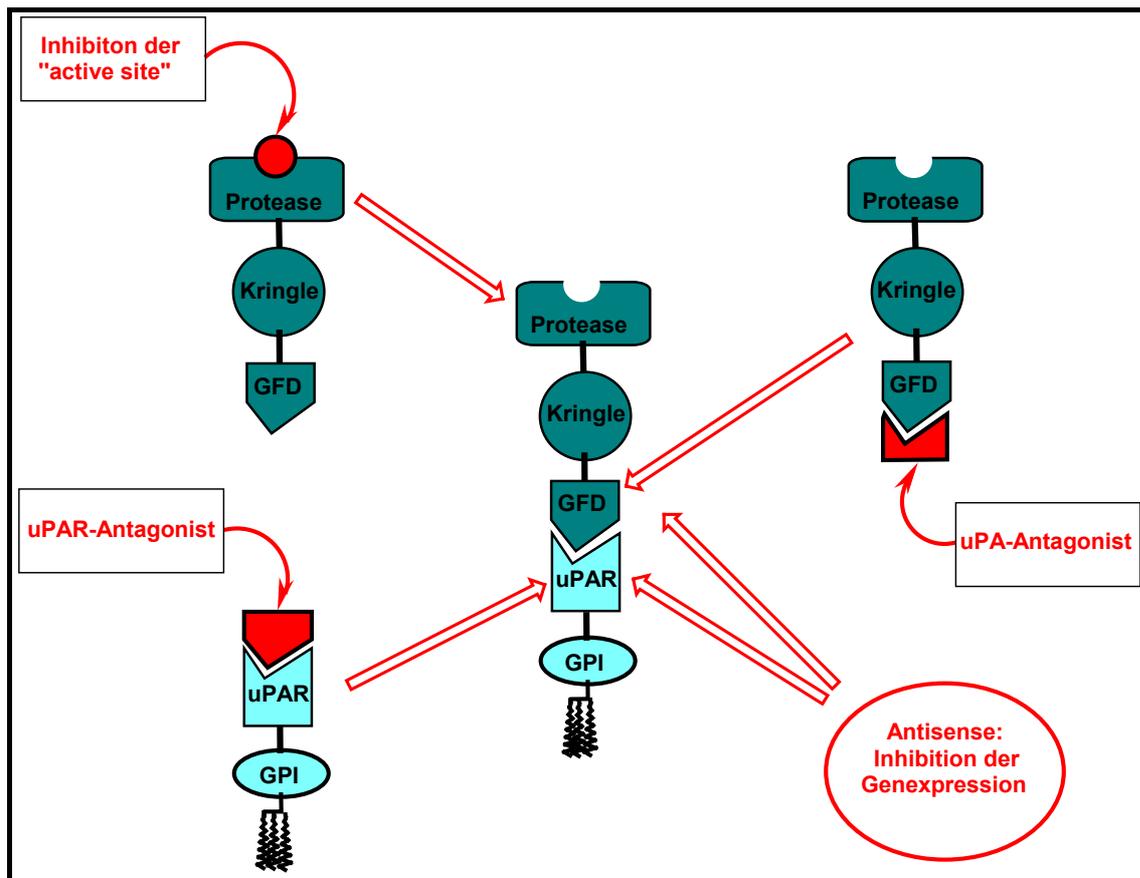


Abbildung 4-4: Inhibitionsansätze bei der näheren Betrachtung des uPA-uPAR-Komplexes. Die Hemmung der „active site“, uPAR-Antagonisten, uPA-Antagonisten und Antisense, die Hemmung der Genexpression, sind als rote Symbole gezeigt. Der Komplex aus uPA (bestehend aus Protease, Kringle-Domäne, Growth-Factor-Domäne) ist in Blaugrün und der Rezeptor von uPA (bestehend aus Rezeptorteil und GPI-Anker) ist in Hellblau dargestellt.

4.5 Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA)

Die fibrinolytische Aktivität des menschlichen Urins war schon seit dem Ende des 19. Jahrhunderts bekannt und wurde in den frühen 50er-Jahren des letzten Jahrhunderts der Anwesenheit eines Plasminogen Aktivators zugeordnet.^[112] Der Begriff Urokinase wurde 1952 durch Sobel *et al.* eingeführt.^[113] Obwohl das Enzym häufiger Urinary (Harn)- oder Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator genannt wird, ist durch die Enzyme Commission der Name u-Plasminogen Aktivator empfohlen worden. Das Enzym wurde aus Urin in einer 54 kDa-Form isoliert, wobei sich später herausstellte, dass die freie, enzymatisch aktive Form 31 kDa besitzt und mit LMW-uPA („Low Molecular Weight-uPA“) bezeichnet wurde.^[114] Die Entwicklung von Antikörpern führte dann zur Entdeckung von uPA im menschlichem Blut. Auch hieraus konnte uPA isoliert werden und von tPA (Tissue-Type Plasminogen Aktivator) unterschieden werden.^[115]

Der uPA wird in der EC-Liste (Enzyme Commission) unter EC 3.4.21.73 geführt und gehört damit in der Familie S1 der trypsin-ähnlichen Serinproteasen zum Clan SA. Das Enzym besitzt eine extrem begrenzte Substratspezifität und spaltet dabei innerhalb der Sequenz Cys-Pro-GlyArg560/Val561-Val-Gly-Gly-Cys, die Plasminogen als eine kleine Schleife mit Disulfid-Brücke besitzt.^[1]

Die Aktivierung von uPA geschieht, wie in Kapitel 4.2 bereits angesprochen, innerhalb der protelytischen Aktivierungskaskade aus dem Zymogen pro-uPA, das auch als pro-Urokinase oder scu-PA („single chain-uPA“, einkettiger uPA) bezeichnet wird, über die trypsin-ähnliche Serinprotease Plasmin. Dieser Schritt kann auch von den Cysteinproteasen Cathepsin B oder L und von Kallekrein durchgeführt werden. Dabei wird die Peptidbindung zwischen Lys158 und Ile159 gespalten und das inaktive, einkettige pro-uPA zum zweikettigen HMW-uPA („High Molecular Weight uPA“) aktiviert. Die A-Kette (uPA₁₋₁₅₈) ist nach der Spaltung mit der B-Kette (uPA₁₅₉₋₄₁₁) über eine Disulfidbrücke zwischen Cys148 und Cys279 verknüpft. Dadurch wird mittels einer durch die Spaltung einhergehenden Konformationsänderung das aktive Zentrum zum ersten Mal nach außen exponiert und ist somit aktiv. Zudem kann HMW-uPA durch weitere Proteolyse in das aminoternale Fragment (ATF, uPA₁₋₁₃₅) und LMW-uPA, (uPA₁₃₆₋₄₁₁) weiter gespalten werden. LMW-uPA besitzt danach

immer noch die volle proteolytische Aktivität, kann aber nicht mehr an den uPA-Rezeptor binden.^[116]

Der Aufbau von pro-uPA aus drei Domänen kann wie folgt beschrieben werden:

Das einkettige Zymogen wird aus 411 Aminosäuren aufgebaut und besitzt dabei 12 Disulfid-Brücken. Zudem stellt innerhalb der Sequenz die Position Asn302 die Glycosylierungsstelle dar. Die N-terminale „Growth-Factor-Like“-Domäne (GFD) umfasst die Aminosäuren 1-46 und bildet die Bindungsstelle zum uPA-Rezeptor, der an der Zelloberfläche situiert ist. Diese erste Domäne zeigt eine hohe Sequenzhomologie zum epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), woher auch der Name GFD stammt. Trotz dieser Homologie besteht keine Affinität zwischen EGF und uPAR selbst.^[114]

Die Aminosäuren 45-135 bilden als zweite Domäne die sogenannte „Kringel“-Domäne, welche eine Affinität zum extrazellulären Matrix-Proteoglykan Heparin besitzt.

In der dritten C-terminalen Domäne sitzen die Reste der katalytischen Triade His204, Asp255 und Ser356. Dieser Teil wird aus den Aminosäuren 136-411 aufgebaut und stellt den eigentlichen trypsin-ähnlichen Serinproteasenanteil dieses Enzyms dar, der für die proteolytische Aktivierung verantwortlich ist.

Die Röntgenkristallstruktur der uPA-B-Kette, die das katalytische Zentrum enthält, wurde 1995 durch Spraggon *et al.* berichtet. Die Auflösung dieser Struktur ist jedoch mit 2.5 Å vergleichsweise gering.^[117]

4.6 Natürliche uPA-Inhibitoren

Die proteolytische Aktivität des uPA/uPAR-Systems steht unter Kontrolle der beiden Plasminogen Aktivator-Inhibitoren Typ-1 (PAI-1) und Typ-2 (PAI-2). Diese beiden Inhibitoren gehören zur Ser-Protease-Inhibitor Superfamilie, welche abgekürzt „Serpine“ genannt werden. Vergleicht man Typ-1 mit Typ-2, so zeigen beide eine Sequenzhomologie von 55 % und 33 % Aminosäureidentität. Ihre strukturelle Ähnlichkeit konnte durch Vergleich der Röntgenkristallstrukturen zweier aktiven Mutanten von PAI-1 und PAI-2 gezeigt werden.^[118;119] Bei der Interaktion mit uPA und tPA (Tissue-Type Plasminogen Aktivator) bilden die beiden Inhibitoren 1 : 1 stöchiometrische Komplexe mit den Enzymen. Während PAI-1 alle aktiven Formen dieser Proteasen, die einkettige Form von uPA wie auch die ein- und die zweikettige Form von tPA zu inhibieren vermag, kann PAI-2 interessanterweise nur die zweikettige Form von uPA und tPA hemmen.^[120] Leider gibt es in diesem Zusammenhang bisher noch keine Röntgenkristallstrukturen von PAI-1 oder PAI-2 im Komplex mit einer der genannten Proteasen, die den genauen Bindungsmodus zeigen könnten.

Aktives PAI-1 ist metastabil und besitzt eine Halbwertszeit von etwa 2 h, wonach es spontan in eine latente, inaktive Form übergeht. Dabei konnte durch das Einführen von vier Punktmutationen gezeigt werden, dass die Halbwertszeit auf über 140 h verlängert werden kann.^[121] Allerdings ist anzumerken, dass unter physiologischen Bedingungen die Halbwertszeit durch die Bindung von PAI-1 an das extrazelluläre Matrix- und Plasma-Protein Vitronektin (vgl. Abbildung 4-2 in Kapitel 4.2) auf etwa 4 h verdoppelt wird.^[122] Im Gegensatz zu PAI-2 wird PAI-1 mit einem spaltbaren Signalpeptid, bestehend aus 21 Aminosäuren, synthetisiert und von den Zellen in glycosylierter Form abgegeben. PAI-2 fehlt also ein spaltbares Signalpeptid und es liegt dabei zu 80 % in nicht-glycosylierter Form intrazellulär und zu 20 % in glycosylierter Form extrazellulär vor.^[123]

Darüber hinaus sind noch zwei weitere Serpine zu nennen, die neben Thrombin, Trypsin, Plasmin und Protein C auch noch uPA sowie tPA zu hemmen vermögen. Die Proteinase Nexin-1 (PN-1) und der Protein C-Inhibitor (PCI) reagieren allerdings unter physiologischen Bedingungen wesentlich langsamer als PAI-1 und PAI-2.^[124;125]

Zudem sind Aprotinin und der Tumor-assoziierte Trypsin-Inhibitor (TATI) noch als Inhibitoren von uPA beschrieben worden, wobei jedoch anzumerken ist, dass die Inhibitionskonstanten dieser Verbindungen gegenüber uPA im micromolaren Bereich liegen und somit diesen Inhibitoren unter physiologischen Bedingungen keine große Bedeutung zukommt. Übersichtsweise kann somit dargestellt werden:

- **PAI-1:** Der Plasminogen Aktivator-Inhibitor Typ 1 wird aus 402 Aminosäuren mit N-terminalem Signalpeptid von der Zelle synthetisiert und in glycosylierter Form abgegeben. Mit einer Geschwindigkeit von $k_2 = 1-2 \times 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ vermag er die aktive Form des Inhibitors uPA zu hemmen.^[126]
- **PAI-2:** Der Plasminogen Aktivator-Inhibitor Typ 2 wird aus 415 Aminosäuren ohne N-terminales Signalpeptid von der Zelle synthetisiert und liegt danach zu 80 % in nicht-glycosylierter Form intrazellulär vor. Weitere 20 % werden als glycosylierte Form extrazellulär abgegeben. Mit einer Geschwindigkeit von $k_2 = 2.4 \times 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ vermag er die aktive Form des Inhibitors uPA zu hemmen.^[126]
- **TATI:** Der Tumor-assoziierte Trypsin-Inhibitor inhibiert uPA mit einer K_i von $0.3 \mu\text{M}$.^[127]
- **Aprotinin:** Hemmt uPA relativ schwach mit einer K_i von $27 \mu\text{M}$.^[128]

4.7 Synthetische uPA-Inhibitoren

Die bereits in der Einleitung in Kapitel 1.5 beschriebene Beschaffenheit der „active site cleft“ von uPA ist durch den sogenannten „99-loop“, der aus Thr98A und Leu98B in Verbindung mit His99 besteht, stark geprägt. Dieser hat Auswirkungen auf die S₂-Tasche und bis in die S₃/S₄-Region hinein. Dadurch ist der Bereich räumlich beschränkt und sehr hydrophob, weshalb das Enzym auch eine extrem begrenzte Substratspezifität aufweist. Das liefert die Basis für das sogenannte „Rational Drug Design“ synthetischer, niedermolekularer Inhibitoren. Hierbei kann bezogen auf die Arginin-mimetischen Ankergruppen der Inhibitoren, die mit Asp189 am Boden der S₁-Tasche interagieren, eine grundlegende Unterteilung in folgende Gruppen getroffen werden:

- Aryl-Guanidin uPA-Inhibitoren
- Aryl-Amidin uPA-Inhibitoren

Über die letzten Jahre konnte ein stetiger Fortschritt im Bereich dieser Inhibitoren erreicht werden und mit Mitteln des „Rational Drug Design“ wurden immer potentere und selektivere synthetische Inhibitoren entwickelt. Vor allem im Bereich der Aryl-Amidine ist dieser Entwicklungsprozess deutlich zu erkennen und deshalb kann analog dazu eine weitere Unterteilung der Aryl-Amidine nach Verbindungsklassen vorgenommen werden.^[129]

- Frühe Benzamide und Naphthamide
- Benzamide
- Benzo[b]thiophen-carboxamide
- 6,8-Disubstituierte Naphthamide
- Naphtamidin Surrogate: 2-Amino-chinolin und 2-Aminobenzimidazol
- Aminidino-Indole und Benzimidazole
- Thiophen-2-carboxamide

Im folgenden sollen nun einige der neueren Entwicklungsbeispiele aus den beiden oben vorgestellten Hauptgruppen exemplarisch gezeigt werden. Ältere Inhibitoren, wie zum Beispiel die Amidin-basierenden Verbindungen Naphthamidin und die Benzo[b]thiophen-carboxamide *B428* und *B623* oder das Guanidin-basierende *Amilorid* sind bereits in einschlägigen Veröffentlichungen beschrieben.^[130-132]

Aryl-Guanidin uPA-Inhibitoren

Zwei interessante Verbindungen dieser Klasse wurden unlängst von *Pfizer* veröffentlicht. Von dem Guanidino-isochinolin-Derivat **63** (Abbildung 4-5), welches einen $K_i = 61$ nM besitzt, gibt es bisher noch keine Röntgenstruktur-Analyse.^[133] Dennoch ergaben „Modeling“-Experimente, dass die Chlor-Gruppe in räumlicher Nähe zu Ser195 liegt und eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxy-Gruppe ermöglicht. Der 2-Methoxyphenyl-Rest in der 7-Position am Ringgerüst soll den Untersuchungen nach interessanterweise mit der $S_{1\beta}$ -Tasche interagieren, die der S_1 -Tasche vorgelagert ist. Das Guanidinopyridin-Derivat **64** (Abbildung 4-5) welches einen $K_i = 170$ nM besitzt, zeigt exzellente Selektivitäten. So wird uPA 300 mal besser gehemmt als tPA und 6000 mal besser als Plasmin. Mangels einer Röntgenkristallstruktur-Analyse wurden wiederum „Modeling“-Experimente durchgeführt, nach denen die Chlor-

Gruppe auch in räumlicher Nähe zu Ser195 liegt und eine Wasserstoffbrücke zur Hydroxy-Gruppe ermöglicht. Der 2-Phenylcarboxylat-Rest soll demnach auch hier mit der $S_{1\beta}$ -Tasche interagieren.^[134-136] Jedoch zeigen Aryl-Guanidine im allgemeinen eine schlechte orale Bioverfügbarkeit aufgrund des starken basischen Charakters des Guanidin-Restes.

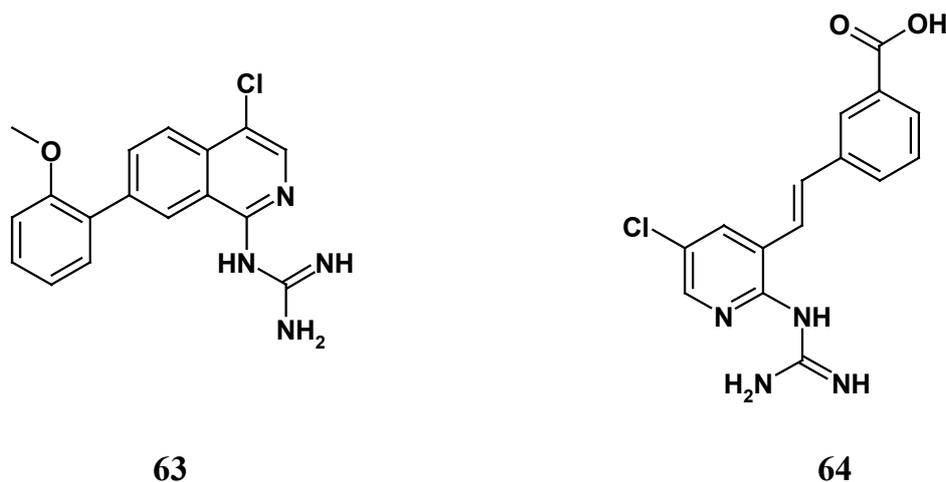


Abbildung 4-5: Strukturen des Isochinolin-Derivates **63** und der Pyridin-Verbindung **64**.

Aryl-Amidin uPA-Inhibitoren

Vor kurzem haben Mitarbeiter von *3-Dimensional Pharmaceuticals* mittels Screening von Amidin-„Libraries“ und „Modeling“-Methoden das Thiophen-2-carboxamidin **65** entwickelt (Abbildung 4-6). Das Biaryl-Ether-Derivat **65** besitzt einen $K_i = 60$ nM gegenüber uPA und bisher wurden dazu weder Daten zur Enzymselektivität noch Material zum möglichen Bindungsmodus veröffentlicht.^[137] In den Laboratorien von *Abbott* wurde über moderne kristallographische und NMR-Screening-Methoden nach Leitstrukturen gesucht, die einen weniger basischen Charakter als bisher bekannte Amidin-Derivate aufweisen. Daraus wurde das *N*-Pyrimidyl-2-amino-chinolin (**66**) entwickelt, das einen $K_i = 0.31$ nM gegenüber uPA bei pH = 6.5 aufweist und interessanterweise schon bei einem pH = 7.4 mit einem $K_i = 2.5$ μ M seine

Hemmwirkung extrem einbüßt (Abbildung 4-6). Allerdings zeigte dieses Surrogat **66** aufgrund seiner verringerten Basizität eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit gegenüber dem analogen Naphthamidin-Derivat.^[138;139]

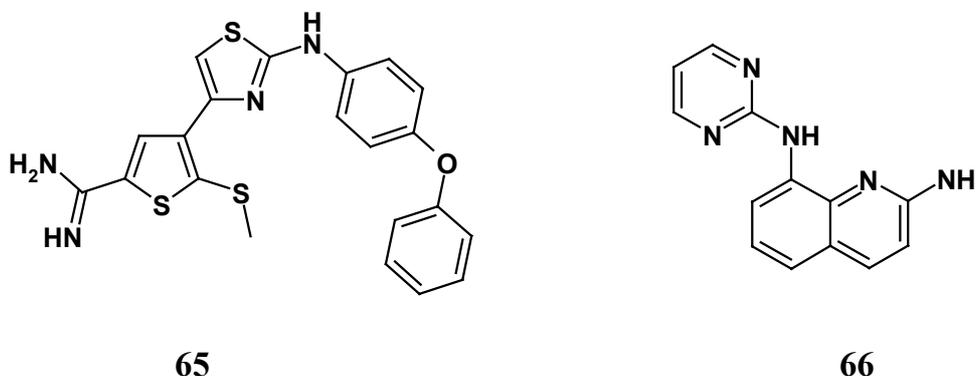


Abbildung 4-6: Strukturformeln des Biaryl-Ether-Derivates **65** und des N-Pyrimidin-2-amino-quinolins (**66**).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Entwicklung von potenten und selektiven niedermolekularen uPA-Inhibitoren unter dem Einsatz von zunehmend verfügbaren Strukturinformationen und Screening-Kapazitäten über die letzten Jahren hinweg ein äußerst schwieriger Prozess war, der dennoch große Fortschritte gemacht hat. Die Entwicklung der Aryl-Amidine genießt dabei gegenüber den der Aryl-Guanidinen ein Übergewicht. Aus pharmakokinetischer Sicht muss allerdings hierbei auch kritisch angemahnt werden, dass die meisten dieser Verbindungen nicht ausreichen, um klinische oder sogar präklinische Phasen zu rechtfertigen. Die Ursache hierfür ist typischerweise die basische Amidin- bzw. Guanidin-Funktionalität, die einerseits zwar eine sehr effektive Arginin-mimetische Ankergruppe für den uPA-Inhibitor darstellt, andererseits aber keine orale Bioverfügbarkeit sowie niedrige Eliminierungsraten gewährleisten kann. Im Bereich der uPA-Inhibitoren sind daher Ansätze, dieses Problem mittels weniger basischen Surrogaten dieser Gruppen – wie oben im letzten Abschnitt gezeigt - oder Pro-Drug-Strategien zu umgehen, in jüngster Zeit endlich in Untersuchungen verwirklicht worden. Diese sind bereits aus anderen Serinproteasen-Inhibitorbereichen wie z.B. Faktor Xa bekannt.^[129]

4.8 Ergebnisse und Diskussion

4.8.1 Leitstrukturen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Teilbereich der niedermolekularen uPA-Inhibitoren wurden zwei verschiedene Leitstrukturen bearbeitet. Da in beiden Fällen vorteilhafterweise bereits eine Röntgenkristallstruktur-Analyse der Bindungsmodi zur Verfügung stand, sollten nach deren Analyse gezielte Schritte für eine Verbesserung der jeweiligen Leitstruktur unternommen werden.

Malonsäure-Derivate

Zu Beginn der Forschungsarbeiten stand eine von Sperl und Mitarbeitern entwickelte Leitstruktur als Ansatzpunkt zur Verfügung, die auf einer 4-(Aminomethyl)-phenylguanidin-Grundstruktur basiert. Von dieser Grundstruktur waren zahlreiche Derivate hergestellt worden, von denen sich das Adamantyl-Harnstoff-Derivat **67** mit einem $K_i = 2.4 \mu\text{M}$ als die aktivste Substanz *in vitro* gegenüber uPA herausstellte. Die Verbindung **67** weist zudem exzellente Selektivitäten gegenüber den relevanten, trypsin-ähnlichen Serinproteasen Plasmin ($K_i > 1000 \mu\text{M}$), Faktor Xa ($K_i > 1000 \mu\text{M}$), tPA ($K_i > 1000 \mu\text{M}$) sowie Thrombin ($K_i = 600 \mu\text{M}$) auf. Der Bindungsmodus des uPA/Inhibitor **67**-Komplexes konnte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeiten durch eine Röntgenkristallstruktur-Analyse aufgeklärt werden und ist schematisch in Abbildung 4-7 dargestellt.^[15;16] Die Phenylguanidin-Gruppe ankert danach als Arginin-mimetisches P₁-Strukturelement in die S₁-Tasche von uPA. Hierbei bildet die Ankergruppe mit dem am Boden der Tasche befindlichen Asp189 eine Salzbrücke aus, welche darüber hinaus durch die Wasserstoffbrückenbindungen zu Gly219 und der Hydroxy-Funktion an der Seitenkette des Ser190 verstärkt wird. Die beiden Stickstoffatome des Harnstoffteils bilden jeweils eine durch ein Wassermolekül vermittelte Wasserstoffbrückenbindung zu Ser214 bzw. Gln192, während der Sauerstoff der Harnstoff-Funktion eine starke Wasserbrücke zum Amid-Stickstoff des

Gly193 formt. Damit kommt dieser Harnstoff-Gruppe ein starkes energetisches Gewicht zu, da sie alleine bereits drei Wasserstoffbrücken zu uPA auszubilden vermag. Der Adamantyl-Rest interagiert durch hydrophobe Wechselwirkungen mit His57 und der Disulfidbrücke zwischen Cys42 und Cys58.

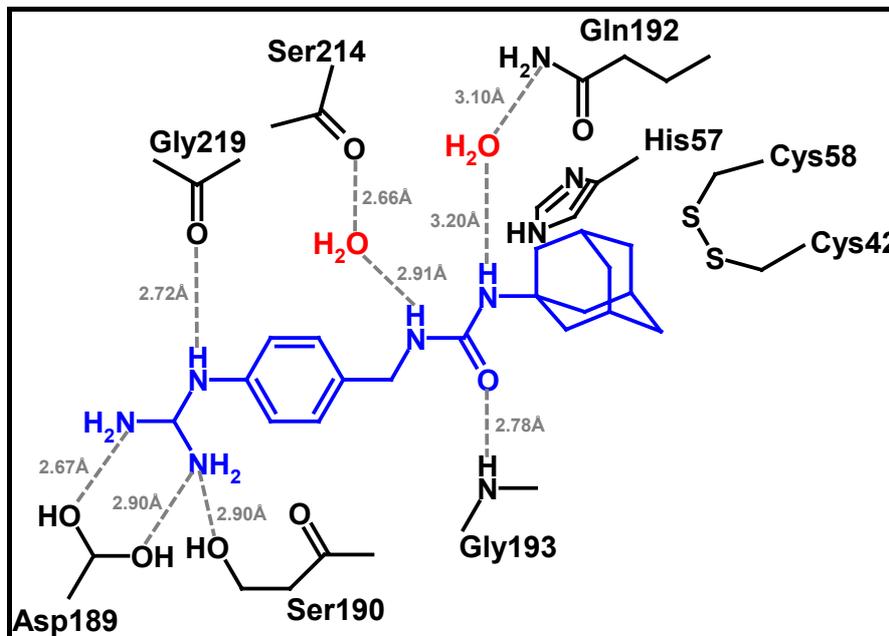


Abbildung 4-7: Röntgenkristallstruktur-Analyse des Bindungsmodus im uPA/Inhibitor WX-293 (67)-Komplex. Die Leitstruktur des Inhibitors 67 ist in Blau dargestellt, wechselwirkende Aminosäuren des Enzyms in Schwarz und beteiligte Wassermoleküle in Rot. Wasserstoffbrücken mit ihren Abständen [Å] sind als gestrichelte Linien in Grau wiedergegeben.

Ausgehend von diesen Informationen sollte versucht werden, die Wechselwirkung des Inhibitors 67 zu verbessern, um die Leitstruktur hinsichtlich Inhibitionspotenz und Selektivität gegenüber anderen relevanten Serinproteasen zu erhöhen. Als Startpunkt wurde erwogen, den in 67 verwendeten Harnstoff-Teil gegen einen Malonsäure-Baustein auszutauschen (Abbildung 4-8). Erstens ergibt sich damit eine neue Verknüpfungsposition, durch die mittels Ester- oder Amid-Derivaten (R^1) Interaktionen in Richtung der S_3/S_4 -Region erzielt werden können. Zudem besteht die Möglichkeit, mit einem Amid unter Umständen auch noch die durch Wasser

vermittelte Wasserstoffbrückenbindung zu Ser214, analog zum ursprünglichen Bindungsmodus von **67**, direkt zu adressieren. Zweitens besteht im nächsten Schritt über die andere Säure-Funktionalität des Malonsäure-Bausteines die Option, den Adamantyl-Rest durch verschiedene andere hydrophobe Gruppen (R^2), die mittels Ester- oder Amid-Bindungen eingeführt werden können, zu substituieren und somit die Diversität weiter zu erhöhen. Darüber hinaus stellt die vorgelagerte $S_{1\beta}$ -Tasche mit der Disulfid-Brücke zwischen Cys191 und Cys220 eine sehr attraktives Ziel für weitere Wechselwirkungen hydrophober Art dar. Als Nachteil dieser Strategie bleibt allerdings festzuhalten, dass bei einer direkten C-C-Verknüpfung zum Malonsäure-Baustein ein stereogenes Zentrum generiert wird, das ein Racemat der jeweiligen Derivate erzeugt.

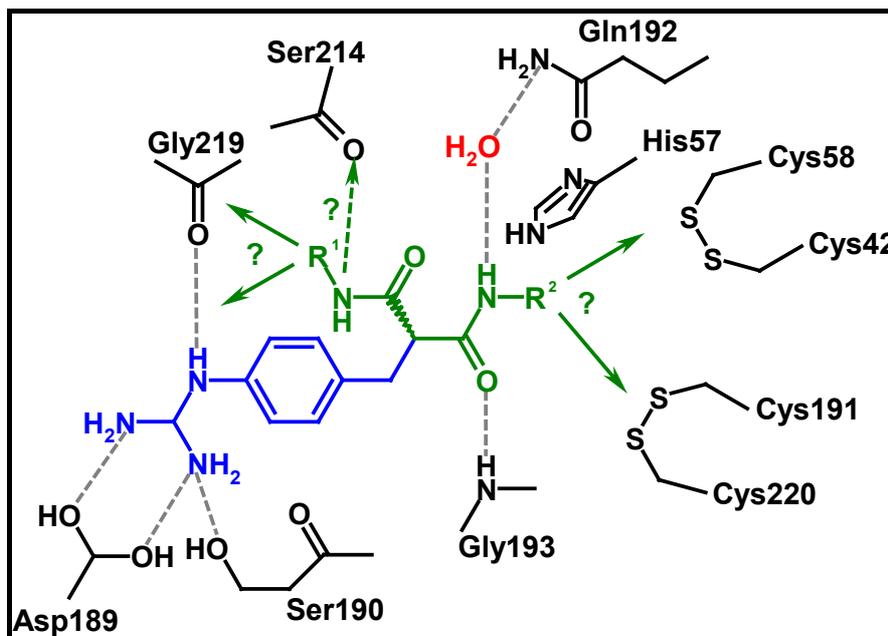


Abbildung 4-8: Schema der beabsichtigten Wechselwirkungen (als grüne Pfeile mit Fragezeichen dargestellt) durch die Einführung eines Malonsäure-Bausteins in Grün. Die ursprüngliche Ankergruppe von **67** ist in Blau dargestellt, wechselwirkende Aminosäuren des Enzyms in Schwarz und Wassermoleküle in Rot. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien in Grau bzw. Grün wiedergegeben.

D-Diaminopropionsäure (Dap)-Derivate

Von *Wilex AG* wurde im Rahmen der Weiterentwicklung von *WX-293* (**67**) eine Leitstruktur entwickelt, die ebenfalls auf der 4-(Aminomethyl)-phenylguanidin-Ankergruppe basiert und unter dem Namen *WX-508* (**68**) geführt wird. Die Verbindung **68** besitzt mit einem $K_i = 30$ nM eine stark verbesserte Hemmwirkung *in vitro* gegenüber uPA und zeigt darüber hinaus exzellente Selektivitäten gegenüber den verwandten trypsin-ähnlichen Serinproteasen Plasmin ($K_i = 294$ μ M), Faktor Xa ($K_i = 500$ μ M) und Thrombin ($K_i = 100$ μ M).^[140] Der Bindungsmodus des uPA/Inhibitor **68**-Komplexes konnte bereits im Rahmen der Arbeiten von *Wilex AG* durch eine Röntgenstruktur-Analyse aufgeklärt werden und ist schematisch in Abbildung 4-9 dargestellt (unveröffentlichte Ergebnisse, *Wilex AG*). Die Phenylguanidin-Gruppe ankert als Arginin-mimetisches P₁-Element in die S₁-Tasche von uPA. Hierbei bildet die Ankergruppe mit dem am Boden der Tasche befindlichen Asp189 eine Salzbrücke aus, welche darüber hinaus durch die Wasserstoffbrückenbindungen zu Gly219 und der Hydroxy-Funktion an der Seitenkette des Ser190 unterstützt wird. Zudem bildet sich noch eine wasservermittelte H-Brücke des Guanidins zum Stickstoff des Leu222 aus. Ein interessantes Detail ist die Tatsache, dass der relativ lineare Inhibitor bei der Bindung zu uPA eine Verdrehung von ca. 270° aufweist. Der Amid-Stickstoff, der die Ankergruppe und den Glycin-Teil verknüpft, bildet eine Wasserstoffbrücke zur Seitenkette des Ser195 und zum Carbonyl-Sauerstoff des Ser214, während der Carbonyl-Sauerstoff des Glycin-Teils eine wasservermittelte H-Brücke zum Amid-Stickstoff der Seitenkette von Gln192 ausbilden kann. Der D-Serin-Teil des Inhibitors vermag drei direkte Wasserstoffbrückenbindungen zum Enzym auszubilden. Erstens tritt eine Wasserstoffbrücke mit der Carbonyl-Funktion zum Stickstoff des Gly216 auf, zweitens eine mit der Amino-Gruppe, die zum Sulfonamid verknüpft ist, zur Carbonyl-Funktion des Gly216 und drittens ist eine H-Brücke zwischen der freien Hydroxy-Funktion und dem Stickstoff der heterozyklischen Seitenkette des His99 sichtbar. Ein Sauerstoff der Sulfon-Gruppe bildet zwei weitere Wasserstoffbrücken zu dem Stickstoff des Gly219 und dem Stickstoff der Seitenkette in der Guanidino-

Ausgehend von diesen Informationen sollte versucht werden, die Wechselwirkung von *WX-508* (**68**) zu verbessern, um die Leitstruktur eventuell hinsichtlich ihrer Inhibitionspotenz und Selektivität gegenüber anderen relevanten Serinproteasen zu erhöhen. Als Ansatzpunkt wurde entschieden, den in **68** verwendeten D-Serin-Baustein gegen einen D-Diaminopropionsäure-Baustein (abgekürzt Dap) auszutauschen (Abbildung 4-10). Damit wird die in der Serin-Seitenkette enthaltene Hydroxy-Gruppe durch eine Amino-Gruppe ersetzt, von der aus entsprechende Amid- sowie Harnstoff-Derivate synthetisiert werden können. Dabei sollten als weitere Ziele auch die Effekte dieser Derivate auf die Bioverfügbarkeit und die Eliminierungsraten im Kooperationsrahmen mit der *Willex AG* München untersucht werden.

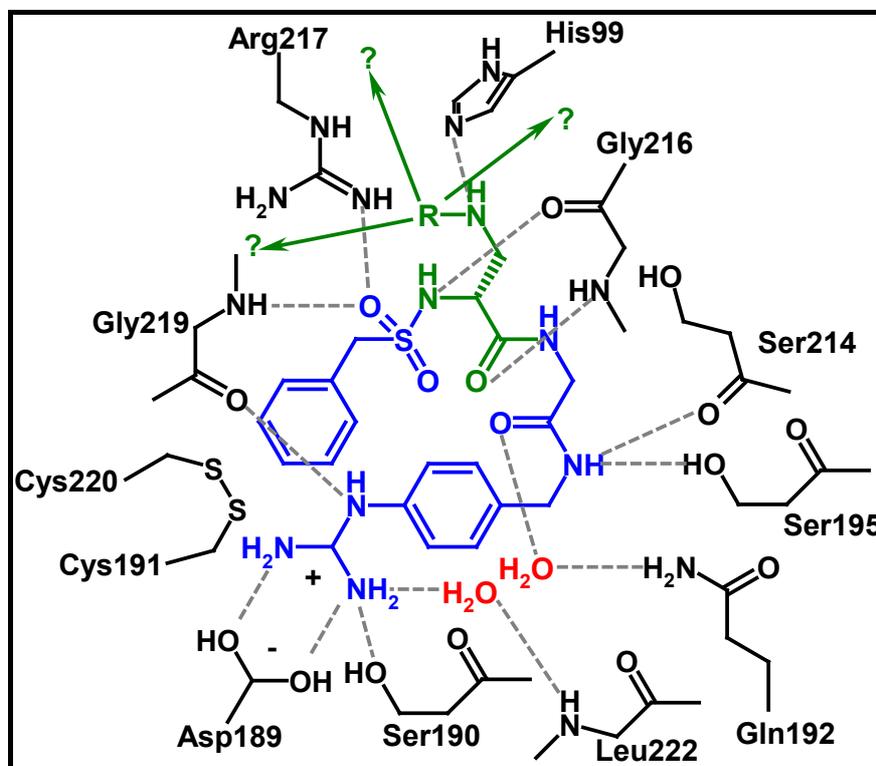
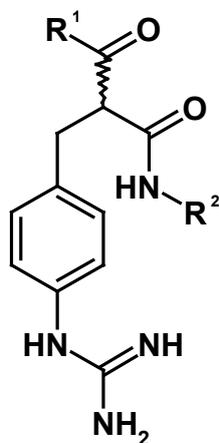


Abbildung 4-10: Schema der beabsichtigten Wechselwirkungen (als grüne Pfeile mit Fragezeichen dargestellt) durch die Einführung eines D-Diaminopropionsäure-Bausteines in Grün. Die ursprünglichen Teile der Leitstruktur von **68** sind in Blau dargestellt, wechselwirkende Aminosäuren des Enzyms in Schwarz und Wassermoleküle in Rot. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien in Grau wiedergegeben.

4.8.2 Inhibition von uPA und verwandten trypsin-ähnlichen Serinproteasen

In Tabelle 4-2 (Malonsäure-Derivate) und Tabelle 4-3 (D-Diaminopropionsäure-Derivate) sind die Inhibitionskonstanten der synthetisierten und untersuchten Verbindungen gegenüber den relevanten trypsin-ähnlichen Serinproteasen Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA), Plasmin, und Thrombin, sowie im Falle der Malonsäure-Derivate zusätzlich gegenüber Faktor Xa und Trypsin aufgelistet. Den Strukturen kann dabei über ihre unterschiedliche inhibitorische Wirkung eine Struktur-Wirkungsbeziehung („Structure-Activity-Relationship“, SAR) zugeordnet werden.

Malonsäure-Derivate

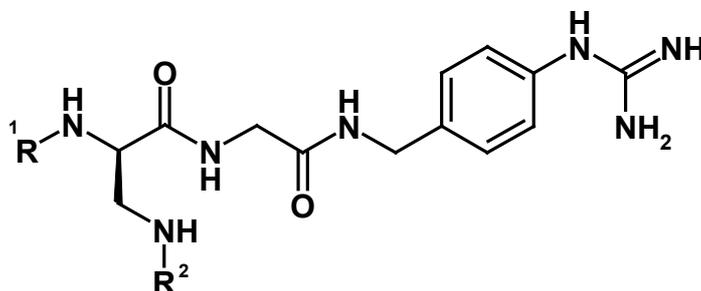


69

Verb.	R ¹	R ²	K _i -Wert [μM]				
			uPA	Plasmin	Thrombin	Faktor Xa	Trypsin
70	OH		170	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
71	NH ₂		100	200	100	> 1000	> 1000
72			> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
73			> 1000	> 1000	> 1000	250	> 1000

Tabelle 4-2: Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR) der in Lösung synthetisierten und untersuchten Malonsäure-Derivate der Leitstruktur (69) und deren Derivate (70 - 73).

Vergleicht man die vier synthetisierten und untersuchten Verbindungen (**70-73**) Tabelle 4-2, so wird sofort ersichtlich, dass die aus den Strukturdaten erschlossenen Annahmen nicht zum gewünschten Erfolg führen konnten. Mit stark verminderten Inhibitionskonstanten zwischen 170 und >1000 μM haben alle der hergestellten Derivate ihre Hemmwirkung gegenüber uPA im Vergleich zu der ursprünglichen Leitstruktur (**67**) mit einem $K_i = 2.4 \mu\text{M}$ extrem eingebüßt.^[15] Da die Säure **70** und das Amid **71** mit einem $K_i = 170$ bzw. $100 \mu\text{M}$ zwar eine schlechte Hemmung von uPA aufweisen - allerdings im Verhältnis besser gegenüber den Werten der Derivate **72** sowie **73** mit einem $K_i > 1000 \mu\text{M}$ und räumlich anspruchsvolleren Resten - kann angenommen werden, dass in Richtung der S_3/S_4 -Region sterische Hinderungen vorliegen. Wie in Kapitel 4.7 bereits dargestellt, schränkt der sogenannte „99-loop“ die S_2 -Tasche bis in die S_3/S_4 -Region hinein räumlich ein. Einerseits ist dies die strukturelle Basis für die extrem begrenzte Substratspezifität, die das Enzym aufweist, andererseits zeigt es sich damit auch als kritischer Punkt für die Derivatisierung von inhibitorischen Verbindungen, die diesen Bereich zu adressieren beabsichtigen. Zu beachten ist auch noch, dass die Amid-Verbindung **71** trotz der doch sehr unterschiedlichen Enzymtopologien von uPA, Plasmin und Thrombin diese Serinproteasen etwa im gleichen Bereich hemmt. Das Glycin-benzylester-Derivat **73** zeigt sich zudem noch gegenüber Faktor Xa am aktivsten während das Phenethyl-Derivat **72** seine Hemmwirkung gegenüber allen Testenzymen völlig verlor. Daraus kann auch gefolgert werden, dass die Selektivität, die die ursprüngliche Leitstruktur (**67**) aufwies, vollkommen verloren ging. Zusammenfassend ist festzustellen, dass es weder gelungen ist, die inhibitorische Wirkung der vorgegebenen Leitstruktur (**67**) zu verbessern, noch eine gleichbleibend gute Selektivität bzw. verbesserte Selektivität gegenüber den getesteten Serinproteasen zu erzielen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die auf dem Malonsäure-Baustein basierende Leitstruktur (**69**) im Rahmen der Arbeit nicht weiter untersucht.

D-Diaminopropionsäure (Dap)-Derivate

74

Verb.	R ¹	R ²	K _i -Wert [μM]		
			uPA	Plasmin	Thrombin
75		H	0.48	34.3	>100
76			0.13	>100	>100

Tabelle 4-3: Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR) der beiden aus Lösung synthetisierten und untersuchten D-Diaminopropionsäure-Derivate **75** und **76** der Leitstruktur (**74**).

Mit einem $K_i = 480$ nM zeigt das Amin-Derivat **75** eine um den Faktor 14 verminderte Hemmwirkung gegenüber uPA im Vergleich zu dem ursprünglichen Serin-Derivat *WX-508* (**68**), das einen $K_i = 30$ nM vorweist.^[140] Die sterisch anspruchsvollere Benzyloxycarbonyl-Verbindung **76** mit einem $K_i = 130$ nM liegt dabei nur um den Faktor 4 schlechter. Die K_i -Werte beider Verbindungen weisen zwar auf eine achtbare Aktivität gegenüber uPA hin, dennoch konnte mit dem Ansatz bis dato nur eine Verminderung des bereits exzellenten Ausgangshemmwertes erreicht werden. Im Gegensatz zu der Reihe der untersuchten Malonsäure-Derivate (**70-73**) scheint, wie durch **76** gezeigt werden konnte, durch die Änderung der Leitstruktur keine Sackgasse erreicht worden zu sein. Die submicromolaren K_i -Werte weisen darauf hin, dass mit weiteren Derivaten möglicherweise eine Verbesserung erzielt werden könnte, vor

allem, da durch **76** die Vermutung nahe liegt, dass auch sterische Reste eingeführt werden können. Leider konnten bisher durchgeführte „Modeling“-Experimente hierzu keinen schlüssigen Anhaltspunkt auf Wechselwirkungsmöglichkeiten zur „active site cleft“ von uPA mit möglichen R²-Resten geben. Zu den R¹-Derivaten bleibt zu sagen, dass aufgrund der zahlreichen Interaktionen des Benzyl-sulfonamid-Restes mit uPA eine fast optimale Substitution vorliegt und somit zunächst Strukturelementveränderungen nicht notwendig sind. Wegen dieser Ausgangslage wurden auch die als weitere Ziele definierten Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und der Eliminierungsraten dieser Verbindungsreihe in Kooperation mit der *Willex AG* München bisher nicht angestrebt. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass es mit den beiden Derivaten **75** und **76** nicht gelungen ist, die inhibitorische Wirkung der auf dem D-Diaminopropionsäure-Baustein basierenden Leitstruktur (**74**) bisher zu erhöhen. Eine gleichbleibend gute Selektivität gegenüber den relevanten Serinproteasen konnte jedoch erhalten bleiben. Trotz dieser ersten Ergebnisse bleibt die Leitstruktur (**74**) weiter im Mittelpunkt der Untersuchungen. Da die Synthese dieser Derivate in Lösung jedoch einige Probleme birgt und mit sehr viel Aufwand verbunden ist, wurde im weiteren Verlauf der Fokus der Arbeit folglich auf die Verbesserung der Synthesemöglichkeiten gelegt. Ein Aufbau an der festen Phase bietet sich hierfür an und wurde mit dem Ziel verbunden, eine schnellere sowie verbesserte Zugangsmöglichkeit zur Diversität der Derivate von **74** zu erreichen (vgl. Kapitel 4.8.3.2).

4.8.3 Synthesestrategien

4.8.3.1 *Synthese in Lösung*

Malonsäure-Derivate

Hierfür wurde zuerst die in Abbildung 4-11 schematisch dargestellte achtstufige Synthesestrategie - rechnet man die drei Schritte der Spaltung des Ethyl-Esters und der Boc-Schutzgruppen mit ein - ausgearbeitet. Malonsäure-diethylester (**77**) wird mittels Natriumhydrid bei 0 °C deprotoniert und mit 4-Nitro-benzyl-bromid (**78**) zum C-C-verknüpften Produkt **79** umgesetzt.^[144] Durch Hydrogenolyse mittels 10% Palladium/Kohle als Katalysator wird bei Raumtemperatur die Nitro-Gruppe in eine Amino-Gruppe und so in die Verbindung **80** überführt. Die funktionelle Umwandlung einer Amino-Gruppe in eine aus pharmazeutischer Sicht interessantere Guanidino-Gruppe stellt eine chemisch wertvolle Operation dar, ist aber dennoch nicht ganz unproblematisch. Hierzu sind einige Guandinylierungsreagenzien bekannt, die je nach der umzusetzenden Amino-Gruppe unterschiedlich ausgeprägte Reaktivität (primäres Amin > sekundäres Amin > aromatisches Amin) zeigen und somit zu mehr oder weniger gutem Reaktionsabschluss bezüglich der Reinheit und Ausbeute führen (vgl. Abbildung 4-22, Kapitel 4.8.3.2). Für die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der Synthese in Lösung das kommerziell erhältliche *N,N'*-Di-*tert*-Butyloxycarbonyl-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin **81** verwendet.^[145-147] Dabei kann **80** mit dem Reagenz **81** und der Base Triethylamin (TEA) bei Raumtemperatur zum Bis-Boc-geschützten Guanidin-Derivat **82** reagieren. Im nächsten Schritt sollte nun die Hydrolyse einer Ethyl-Schutzgruppe am Malonsäure-Rest mit 1 equiv Kaliumhydroxid erfolgen.^[148] Hierbei traten allerdings Probleme auf, die im Anschluss näher erläutert werden. In der nächsten Stufe sollte aus der entschützten Säure **83** und dem Adamantyl-Amin (**84**) zusammen mit dem Kupplungsreagenz Benzotriazol-1-yloxy-tris-pyrrolidino-phosphonium Hexafluoro-phosphat (PyBop) das Adamantyl-Amid **85** dargestellt werden. Gefolgt von der Abspaltung von der zweiten Ethyl-Schutzgruppe am

Malonsäure-Rest mit 1 equiv Kaliumhydroxid, sollte so **86** im entscheidenden Derivatisierungsschritt mit verschiedenen Aminen und PyBop zum derivatisierten Diamid **87** umgesetzt werden. So erhaltene Derivate können dann im letzten Schritt mittels 7 M HCl in Dioxan an der Guanidino-Gruppe von den beiden Boc-Schutzgruppen befreit werden und hatten die Inhibitor-Derivate **88** ergeben.

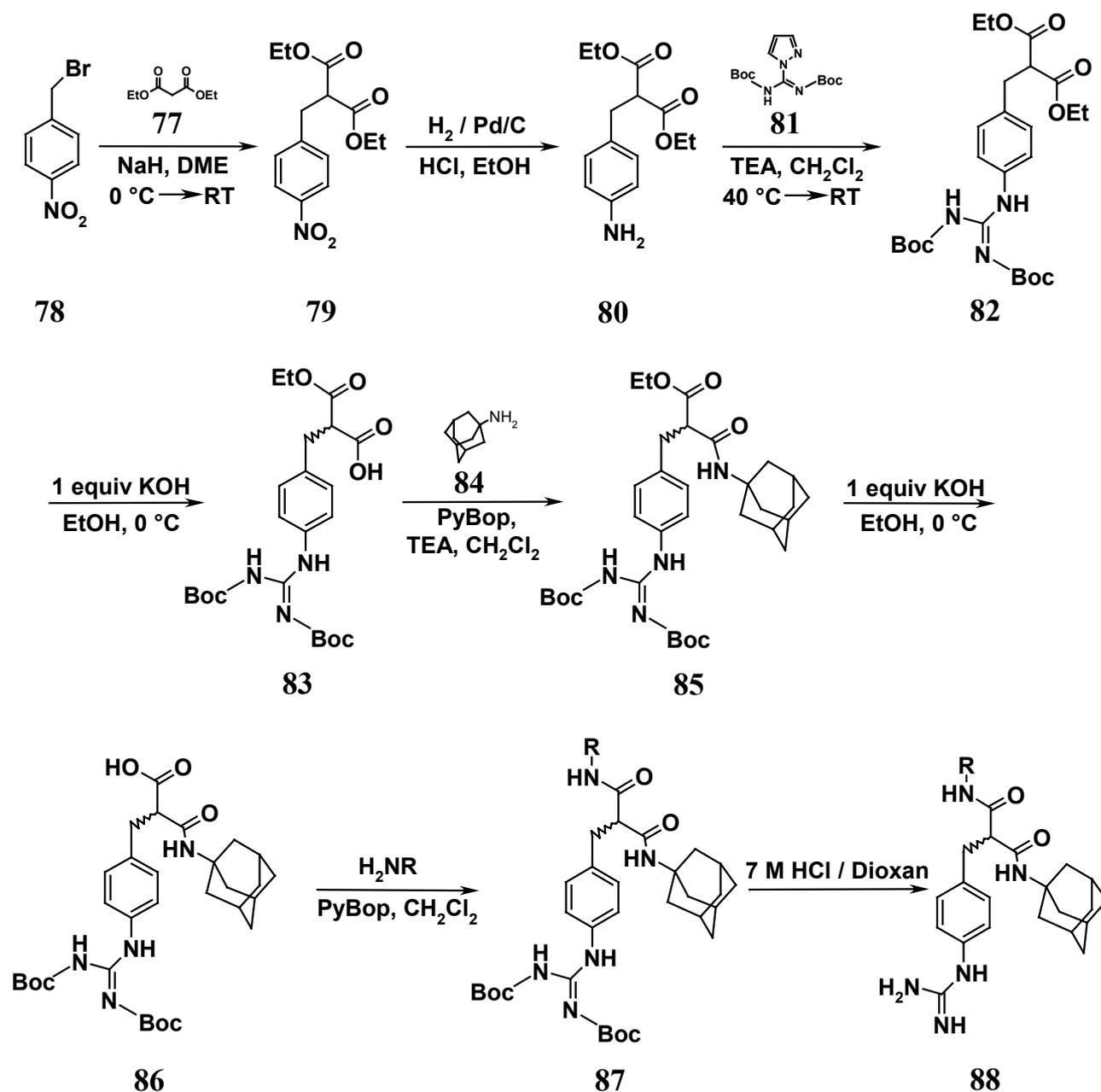


Abbildung 4-11: Ursprüngliche Synthesestrategie zur Darstellung der Malonsäure-Derivate **88**.

Wie bei der Beschreibung der Synthese in Abbildung 4-11 angesprochen, kommt es bei der Verseifung der Ethyl-Schutzgruppe am Malonsäure-Rest mit 1 equiv Kaliumhydroxid zu einer unerwarteten Nebenreaktion. Bei der Hydrolyse des Ethylesters **82** wird trotz basischer und milder Bedingungen unerwarteterweise eine eigentlich nur säurelabile Boc-Schutzgruppe von der Guanidino-Funktion abgelöst. Das so entschützte Guanidin würde im weiteren Verlauf der Synthese bei den notwendigen beiden Kupplungsschritten aufgrund unerwünschter Kupplungen mit den freien Guanidino-Funktionen zahlreiche Nebenprodukte erzeugen. Der Versuch, noch mildere Entschützungsbedingungen mit 1 equiv 0.25 N Natriumhydroxid in dem Lösemittelgemisch aus THF/Wasser (1:10) zu erzeugen, erbrachte keine Lösung des Problems.^[149] Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Ethyl-Ester-Schutzgruppen-Strategie für die Säuregruppen abgeändert, um das Problem zu umgehen.

Hierfür wurde erwogen, eine Säure-Gruppe mit einem *tert*-Butyl-Ester und die andere Gruppe mit einem Benzyl-Ester zu schützen. Die Abspaltung der Schutzgruppen geschieht im ersten Fall durch Acidolyse, während sie im zweiten Fall mittels Hydrogenolyse durchgeführt wird. Blickt man auf das Schema in Abbildung 4-11, so ergibt sich dabei zusätzlich der Vorteil, dass bei der hydrogenolytischen Umwandlung in der zweiten Stufe gleichzeitig eine Abspaltung des Benzyl-Esters unter Einsparung eines Schrittes geschieht. Die Synthese des neuen Malonsäure-Bausteins **91** kann dabei unter hohen Ausbeuten ausgehend von der *tert*-Butyl-Ester-Verbindung **89** mit Benzylchlorid (**90**) und TEA (Abbildung 4-12) gewonnen werden.

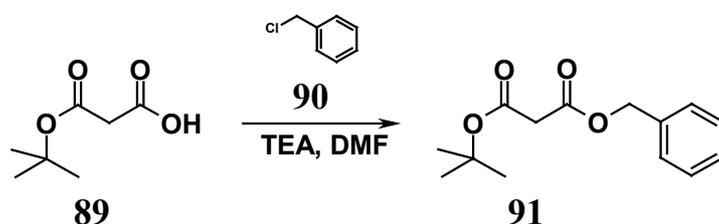


Abbildung 4-12: Abgeänderte Schutzgruppenstrategie zur Synthese der Malonsäure-Derivate **88**.

Die Verwendung des heterogenen Di-Esters **91** bringt allerdings bereits im ersten Reaktionsschritt nach der C-C-Verknüpfung mit **78** ein schwerwiegendes Aufreinigungsproblem mit sich. Unglücklicherweise ergibt sich nach Aufarbeitung der Reaktion ein hydrophobes Gemisch aus dem C-C-verknüpften Racemat und dem Malonsäure-Edukt **91**, das nicht befriedigend getrennt werden konnte. Aufgrund dieser Problematik wurde die Schutzgruppen-Strategie erneut geändert.

Anstelle des *tert*-Butyl-Esters sollte nun direkt ein Adamantyl-Amid vor der C-C-Verknüpfung mit 4-Nitro-benzyl-bromid (**78**) eingeführt werden, was die zweite Schutzgruppe unnötig werden lässt. Der Malonsäure-Baustein **99** zeigte allerdings einige Problemstellungen bei der Synthese. In Abbildung 4-13 wird diese Problematik verdeutlicht. In ersten Versuchen gelang es nicht, den Benzyl-Ester **92** und das Adamantyl-Amin (**84**) mit verschiedenen Kupplungsreagenzien und den Basen DIEA oder TEA umzusetzen. Hierbei wurden die reaktivsten Reagenzien wie PyBop, 1-Ethyl-3-(3'-dimethylamino-propyl)-carbodiimid (EDCI)/ 1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol (HOAT) sowie *O*-(1*H*-6-Chlorbenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-Tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TCTU) und *O*-(1*H*-6-Chlorbenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-Tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HCTU) ohne Erfolg eingesetzt. Im nächsten Schritt wurden aus **92** mittels Oxalylchlorid (**93**) und DIEA sowie Thionylchlorid (SOCl₂) und DIEA das aktivierte Säure-Chlorid **94** bzw. mit *N,N*-Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST) das aktivierte Säure-Fluorid **95** synthetisiert. Diese konnten ebenfalls nicht mit dem Amin **84** gekuppelt werden. Darüber hinaus wurde aus der Malonsäure **92** mittels Ammonium-Hydroxybenzotriazol (HOBt**NH*₃, **96**) das Amid **97** hergestellt, das im nächsten Schritt in TFA bei 90-95 °C mit dem Hydroxy-Adamantan (**98**) erhitzt wurde. Dadurch konnte das gewünschte Adamantan-Amid **99** auch nicht synthetisiert werden. Als Erklärung hierfür kann der hohe sterische Anspruch der Adamantyl-Gruppe bei der Reaktion mit der Carboxyl-Gruppe der Malonsäure herangezogen werden.

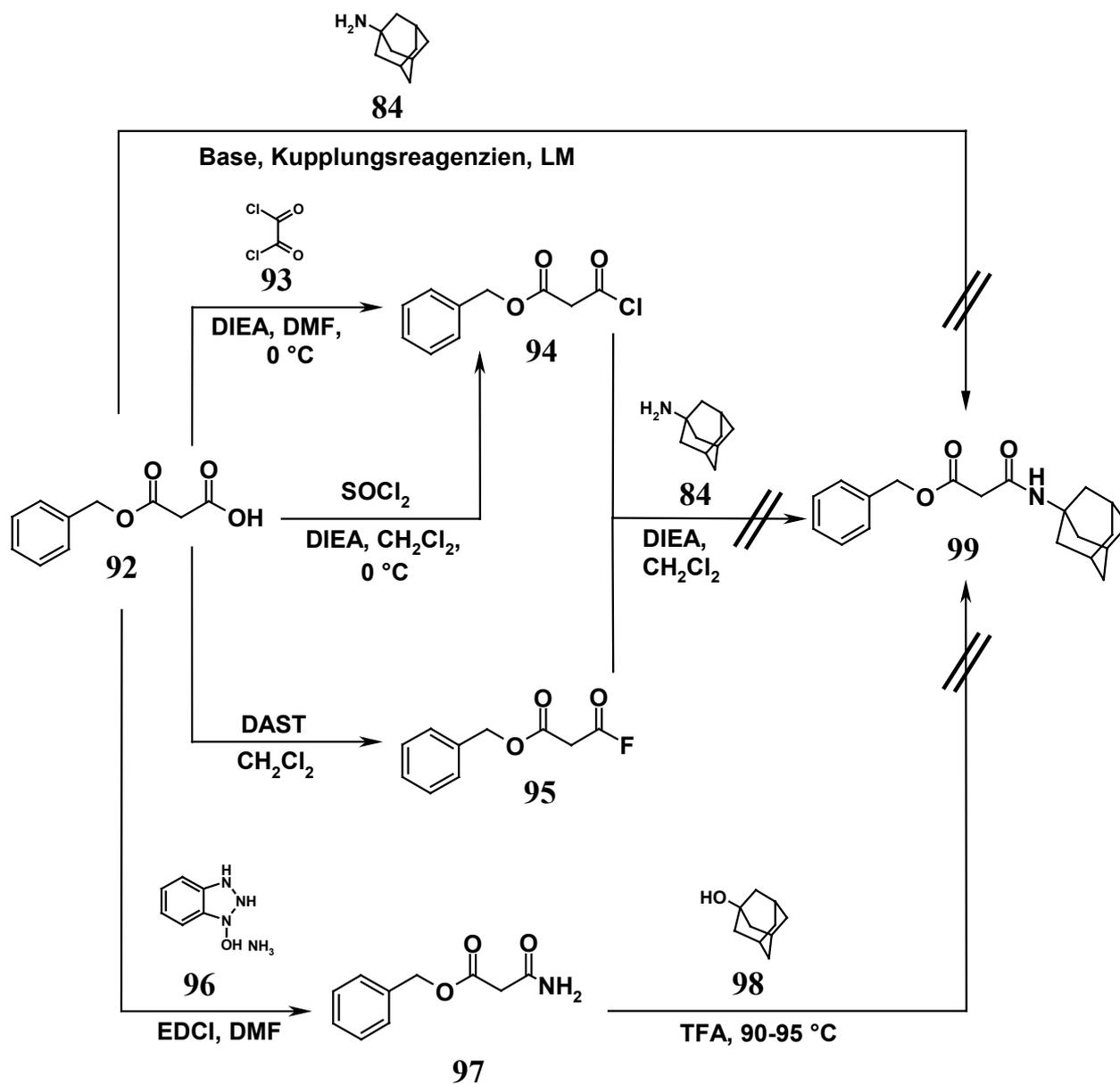


Abbildung 4-13: Problemstellungen bei der Darstellung des Adamantyl-Amids **99**.

Aus der Literatur bekannt sind zwei Varianten für eine modifizierte Ritter-Reaktion, (Abbildung 4-14) mit der es gelingt, Amine mit sterisch anspruchsvollen Resten in ein Säure-Amid zu überführen.^[150;151] Interessanterweise geht man hierbei nicht von der Säureverbindung selbst, sondern vom Cyano-Analogon **100** aus, das mit dem Adamantyl-Iodid (**101**) und Nitrosonium Tetra-fluorborat (NOBF₄) bzw. mit dem Hydroxy-Adamantan (**98**) und Trifluormethylsulfonsäureanhydrid (Tf₂O) zur

Zwischenstufe **102** reagiert. Diese führt dann nach basischer Hydrolyse zum gewünschten Adamantyl-Amid **99**. Für die vorliegende Arbeit wurde die zweite Variante nach Martinez und Mitarbeitern mit der Triflyl-Abgangsgruppe gewählt, da sich zeigte, dass bei der Variante mit NOBF_4 sehr starke Verunreinigungen mit Iod auftreten.

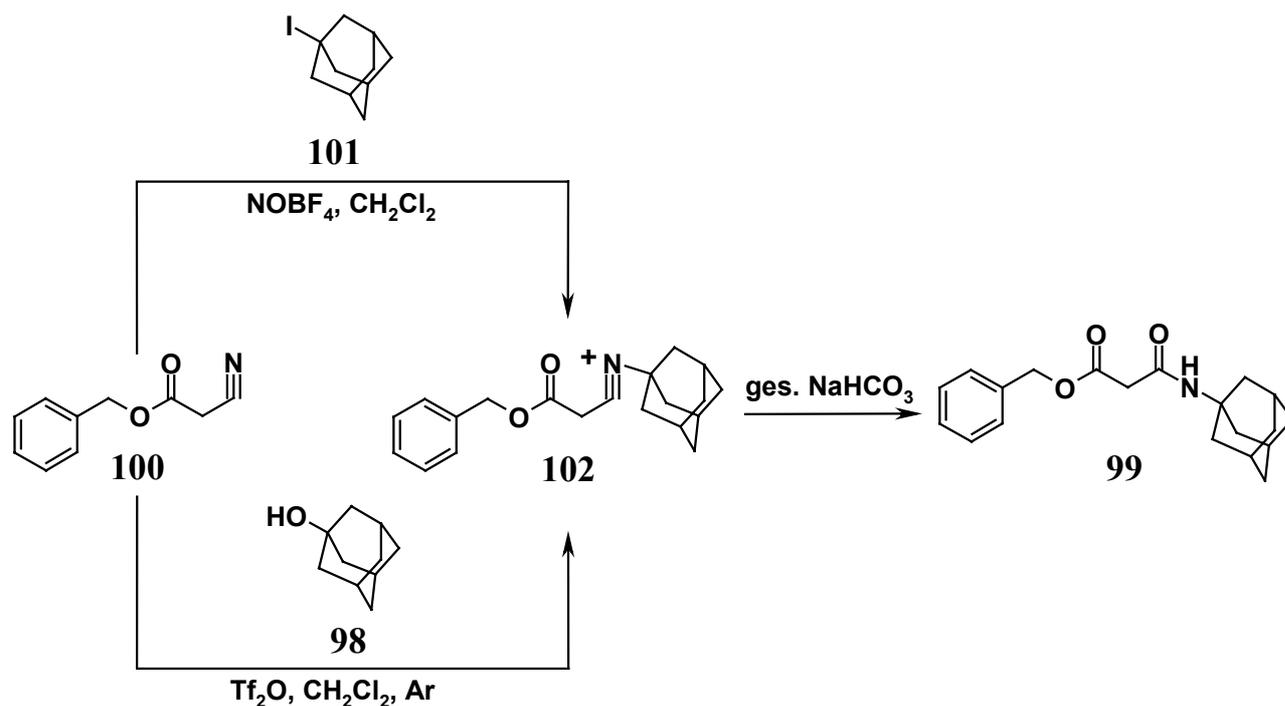


Abbildung 4-14: Die zwei möglichen Varianten der modifizierten Ritter-Reaktion zur Synthese des Adamantyl-Amids **99**.

Die neue und verbesserte Syntheseroute besteht nunmehr aus sechs Stufen und kann wie folgt beschrieben werden (Abbildung 4-15). Das Adamantyl-Amid **99** wird mittels Natriumhydrid bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ deprotoniert und mit 4-Nitro-benzyl-bromid (**78**) zum C-C-gekoppelten Racemat **103** umgesetzt.^[144] Durch Hydrogenolyse mittels 10% Palladium/Kohle als Katalysator wird bei Raumtemperatur die Nitro-Gruppe in eine Amino-Gruppe überführt und gleichzeitig die Benzyl-Schutzgruppe abgespalten, wobei **104** entsteht. In dritter Stufe erfolgt mit dem Guanidinylierungsreagenz **81** und

D-Diaminopropionsäure (Dap)-Derivate

Vorstufen

Der Aufbau des D-Diaminopropionsäure (Dap)-Bausteins sollte ausgehend vom kommerziell erhältlichen Boc- sowie Z-Seitenketten-geschützten D-Derivat erfolgen, aus dem mittels 95% aq. TFA das Amin **106** hergestellt wird. Unter Schotten-Baumann-Bedingungen im wässrigem Lösungsmittelgemisch mit Aceton, Dioxan oder THF konnte das Benzyl-sulfonsäurechlorid (**107**) aufgrund von Löslichkeitsproblemen des TFA-Salzes **106** nicht umgesetzt werden (Abbildung 4-16).^[152;153] Auch der Versuch, aus **106** mittels Benzyl-trimethyl-ammonium-hydroxid das sehr viel hydrophilere Triton B-Salz herzustellen, konnte die Problemstellung nicht beheben. Deswegen wurde die Reaktion auf ein organisches Lösemittelsystem übertragen. Mit TEA in DMF ist zwar einerseits das Löslichkeitsproblem des Salzes **106** vollständig behoben, andererseits erweist sich das Sulfonsäurechlorid **107** als Kupplungsreagenz unter diesen Bedingungen als nicht geeignet.^[154] Dieses bildet gemischte Anhydride mit dem C-Terminus des Dap-Moleküls, wodurch oligomere Nebenprodukte in großer Zahl beobachtet werden konnten.

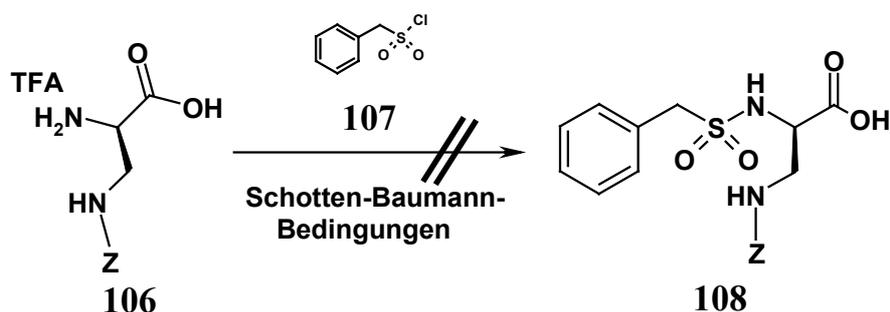


Abbildung 4-16: Problemstellung der Darstellung des D-Diaminopropionsäure-Bausteines **108** unter Schotten-Baumann-Bedingungen aus dem TFA-Salz **106**.

Als Lösungsansatz bietet sich an, eine Methylester-Schutzgruppe am C-Terminus einzuführen, um oligomere Nebenprodukte zu vermeiden, was allerdings effektiv zu zwei weiteren Synthesestufen führt. Alternativ und ohne diesen Umweg besteht die Möglichkeit, durch Silylierung (Abbildung 4-17) mit Trimethylsilylchlorid unter Schutzgas das N-terminal aktivierte sowie gleichzeitig C-terminal geschützte Intermediat **109** im organischen Lösemittelsystem zu erzeugen, das dann mit dem Sulfonsäurechlorid **107** und DIEA reagieren kann. Im Anschluss wird der Silylester am C-Terminus einfach durch Hydrolyse zum Produkt **108** gespalten, womit das Löslichkeitsproblem und die oligomeren Nebenprodukte vermieden werden konnten.^[155]

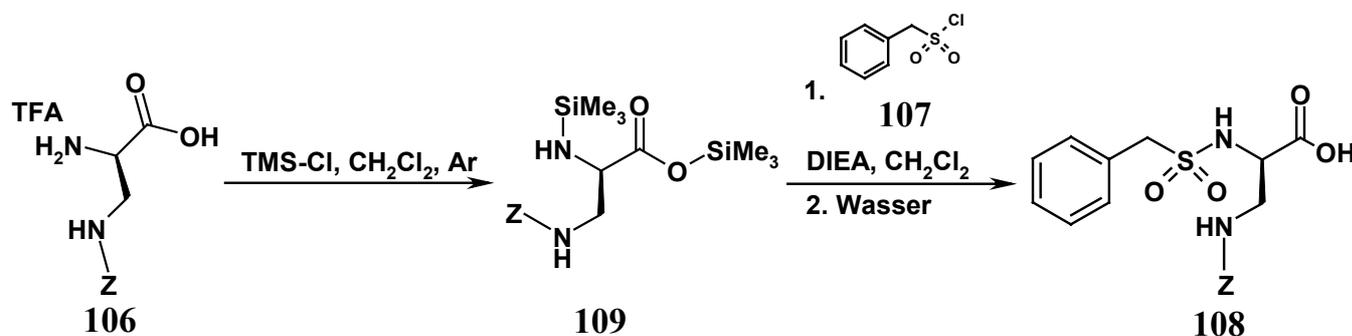


Abbildung 4-17: Darstellung des D-Diaminopropionsäure-Bausteines **108** über ein C-terminal geschütztes Silyl-Intermediat **109**.

Da das kommerziell erhältliche Boc- sowie Z-Seitenketten-geschützte D-Derivat sehr teuer ist, sollte für die anstehende Festphasensynthese der D-Diaminopropionsäure-Baustein **108** auf eine andere Weise hergestellt werden. Von Zhang und Mitarbeitern wurde eine generelle Methode berichtet, bei der mit einer Hofmann-Umlagerung aus geschützten Asparagin-Derivaten mit Iodbenzol-Diacetat (PIDA) Diaminopropionsäure-Derivate direkt erzeugt werden können.^[156] Abbildung 4-18 zeigt in Anlehnung daran ein Schema zur Darstellung des Fmoc-Derivates **113**. Ausgehend von Boc-D-Asn-OH (**109**), das im ersten Schritt nach Zhang *et al.* zur Diaminopropionsäure **110** umgelagert wird, folgt im zweiten Schritt mit Fmoc-OSu und Natriumcarbonat das Schützen der Seitenkette. Aus der so gewonnenen

Verbindung **111** wird mit Trimethylcyanosilan unter Schutzgas das N-terminal aktivierte sowie gleichzeitig C-terminal geschützte Intermediat **112** hergestellt, das dann mit dem Sulfonsäurechlorid **107** und DIEA weiter umgesetzt wird. Nach Hydrolyse erhält man dann den Fmoc-D-Diaminopropionsäure-Baustein **113**.

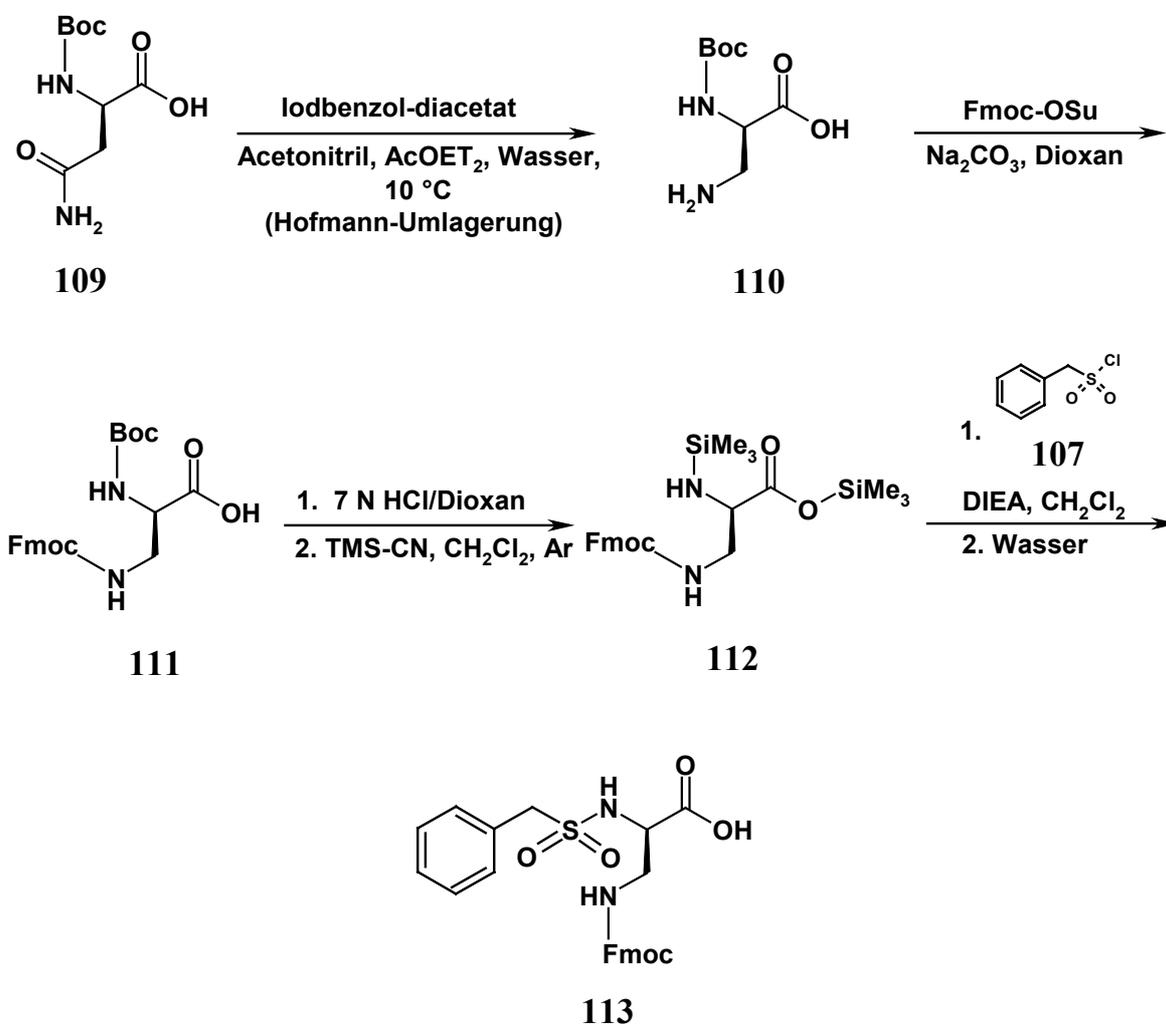


Abbildung 4-18: Darstellung des Seitenketten-geschützten Fmoc-D-Diaminopropionsäure-Bausteines **113** über das Silyl-Intermediat **112** durch eine Hofmann-Umlagerung ausgehend von Boc-D-Asn-OH (**109**).

Somit ergibt sich für die Darstellung der D-Diaminopropionsäure-Derivate die in Abbildung 4-19 dargestellte Synthese mit teilweiser Fmoc-Strategie. Sie besteht, ohne die Schritte der Synthese des Dap-Bausteins **108** bzw. **113**, aus fünf Stufen. In erster Stufe erfolgt mit dem Guanidinylierungsreagenz **81** und TEA die Überführung von

N-Fmoc-(4-amino)-benzylamin (**114**) zum Bis-Boc-geschützten Guanidin-Derivat **115**. Dieses wird nun mit 20 % Diethylamin (DEA) in DMF von der Amino-Schutzgruppe befreit und kann anschließend mit Fmoc-Glycin und dem Kupplungsreagenz PyBop unter basischen Bedingungen mit DIEA umgesetzt werden. Von **116** wird erneut mit 20 % DEA in DMF die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Das resultierende Produkt wird mit dem *Z*-D-Diaminopropionsäure-Derivat **108** und dem Kupplungsreagenz PyBop unter basischen Bedingungen zu **117** umgesetzt. Damit liegt die grundlegende Leitstruktur in Form der *Z*-geschützten Verbindung **117** als Ausgangsbaustein vor und kann nach Hydrogenolyse mittels 10% Palladium/Kohle als Katalysator bei Raumtemperatur von der Amino-Schutzgruppe befreit werden. Im Anschluss kann **118** entweder mit verschiedenen Säure-Derivaten direkt am Harz mittels PyBop umgesetzt werden oder unter basischen Bedingungen mit Isocyanat-Derivaten zu den entsprechenden Harnstoff-Verbindungen kondensiert werden. Abschließend wird die Guanidino-Gruppe mittels 7 M HCl in Dioxan von den beiden Boc-Schutzgruppen befreit und ergeben die Inhibitor-Derivate **119**. Als Problem erwiesen sich in dieser Synthese wiederum die Boc-Schutzgruppen, die teilweise bei der Hydrogenolyse zur Abspaltung der *Z*-Schutzgruppe verloren gingen. Eine Erklärungsmöglichkeit in diesem Zusammenhang könnte eine Vergiftung des Palladium-Katalysators durch Schwefelverunreinigungen sein, die durch das Sulfonsäurechlorid bei der Synthese des Dap-Bausteines **108** eingebracht werden. Dies kann unter Umständen bei der Hydrogenolyse zur reduktiven Ablösung der Boc-Schutzgruppen führen. Die Hydrogenolyse kann jedoch durch die Einführung einer reinen Fmoc-Strategie umgangen werden. Da allerdings die Synthese an der festen Phase in den Fokus rückte, wurde dies im Rahmen der Untersuchungen nicht weiter verfolgt. Zudem besitzen die in Lösung synthetisierten Verbindungen keine sehr hohe Reinheit, so dass Aufreinigungsschritte verfolgt werden müssen, um beispielsweise testreife Substanzen zu erhalten.

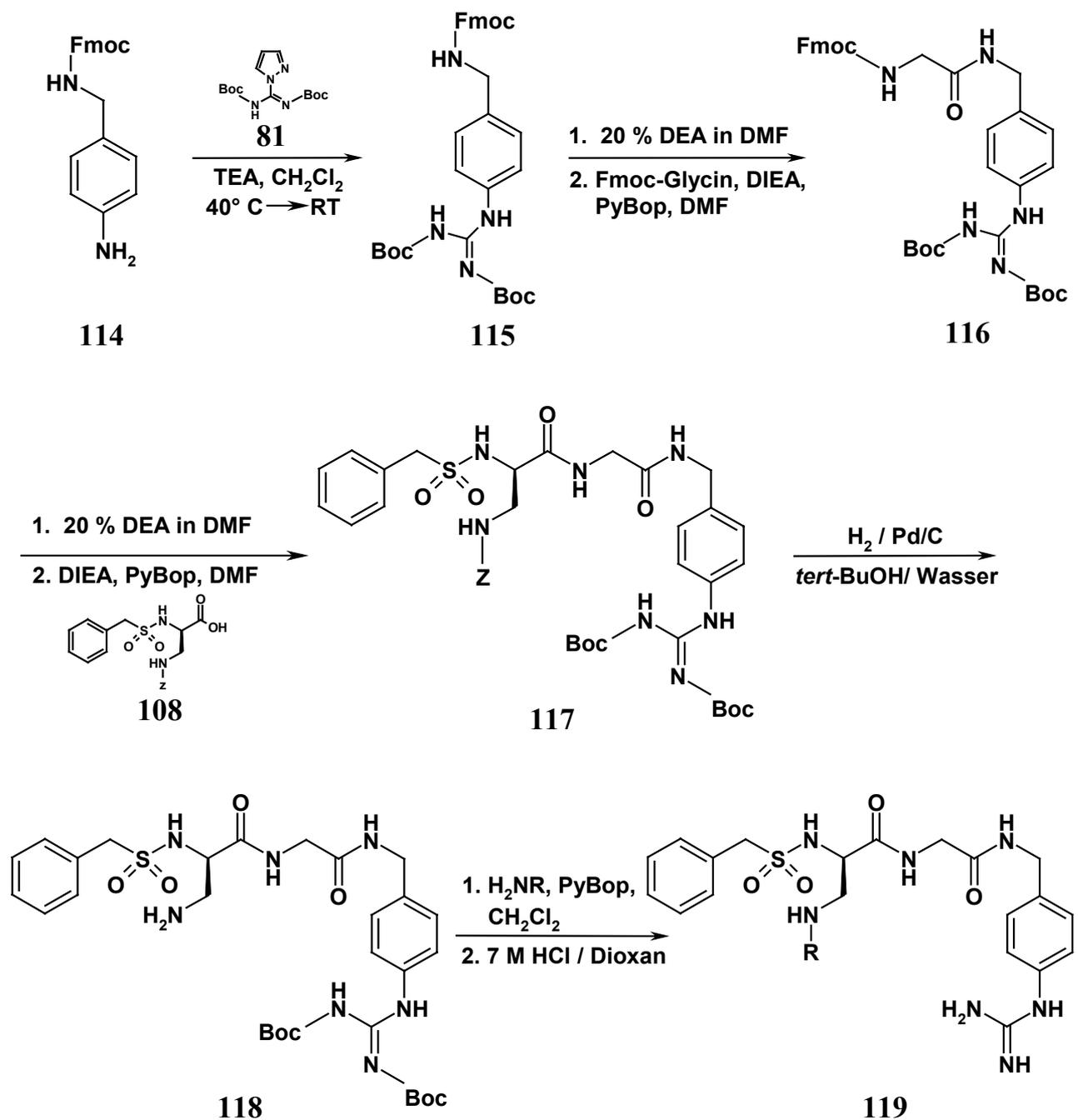


Abbildung 4-19: Synthesestrategie zur Darstellung der D-Diaminopropionsäure-Derivate **119** in Lösung.

4.8.3.2 Festphasensynthese

Aufgrund der beschriebenen Problematik bezüglich der Synthese von D-Diaminopropionsäure-Derivaten in Lösung wurde eine Festphasensynthese angestrebt. Dabei kann angenommen werden, dass dadurch verbesserte Synthesebedingungen vorliegen, um die Derivat-Diversität schneller erhöhen zu können. Hierbei wird die Guanidino-Funktion direkt an das Harz gekuppelt und kann somit als geschützt betrachtet werden, was eine Umgehung der vielfältigen Boc-Schutzgruppen-Probleme bei der Synthese in Lösung ermöglicht.

Da es sich bei der zu guanidinylierenden Stickstoff-Position am Anilin-Baustein der Ankergruppe um eine aromatische Amino-Gruppe handelt, ist es notwendig, hierfür ein geeignetes Harz zu finden, das dieser Aufgabenstellung gerecht werden kann. Die Amino-Gruppe am Anilin ist bekanntlich mit ihrem freien Elektronenpaar an der Mesomeriestruktur des Aromaten beteiligt. Folglich kommt solch einer Amino-Funktion ein verminderter nukleophiler Charakter zu, der sehr reaktive Guanidinylierungs-Reagenzien zu einer Umsetzung zum Guanidin voraussetzt. Darüber hinaus ist aufgrund der eingeschränkten Zugänglichkeit am Harz im Vergleich zur Synthese in Lösung die Reaktivität zusätzlich erschwert.

Das als sehr reaktiv beschriebene Harz **123** ist in der Lage, sogar sterisch gehinderte sekundäre Amine in nicht aromatischen Ringsystemen zu guanidinylieren und diente als erster Ansatzpunkt bei den Untersuchungen.^[157;158] Die Verbindung **123** beinhaltet eine Trifluormethylsulfonyl-Abgangsgruppe, die nach dem nukleophilen Angriff des Amins austritt, wodurch sich das harzgebundene Guanidin bildet. Für die Synthese am Harz ist es notwendig, das Mono-Boc-geschützte Guanidin **121** aus Guanidinium-Hydrochlorid (**120**) herzustellen. Dazu wurde **120** mit (Boc)₂O und wässriger Natriumhydroxid-Lösung umgesetzt (Abbildung 4-20).

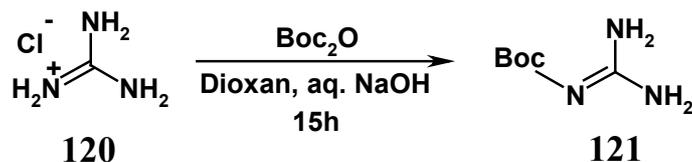


Abbildung 4-20: Darstellung der Boc-geschützten Vorstufe **121** aus Guanidinium-Hydrochlorid **120**.

Die eigentliche Synthese am Harz gelingt, wie in Abbildung 4-21 dargestellt, ausgehend vom *p*-Nitrophenyl-Wang-Harz **45**, das bei Raumtemperatur mit dem Mono-Boc-geschützten Guanidin **121** und DMAP zum harzgebundenen Guanidin **122** umgesetzt werden kann. In abschließender Reaktion wird bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ an die freie Stickstoff-Position des harzgebundenen Guanidins die Trifluormethylsulfonyl-Abgangsgruppe eingeführt, wobei das guanidinylierungsfähige Harz **123** entsteht. Zur Beladungsbestimmung wurde **123** mit der einfachen Testverbindung *N*^α-Fmoc-Lys-OH und 1 equiv DIEA umgesetzt. Anschließend wurde spektroskopisch über eine Piperidin-vermittelte Spaltung der Fmoc-Schutzgruppe die Belegung von **123** auf 0.16 mmol/g bestimmt.

Mit dem Harz **123** sollte nun versucht werden, die Anilin-Verbindung *N*-Fmoc-(4-amino)-benzylamin (**114**) an die feste Phase unter gleichzeitiger Guanidinylierung zu verknüpfen, wofür verschiedene Ansatzvarianten getestet wurden. Weder mit 1 equiv noch mit 5 equiv DIEA konnte **114** in DMF bei Raumtemperatur an das Harz gebunden werden. Der Zusatz von DMAP erbrachte ebenfalls keinen Erfolg. Zudem zeigte sich, dass auch Erwärmen des Ansatzes in CH₂Cl₂ oder THF bei gleichbleibenden Basenzusätzen zu keiner nennenswerten Reaktion führte. Im Anschluss wurde versucht, das Anilin-Derivat **114** durch Silylierung zu aktivieren, was mit *N,O*-Bis-(Trimethylsilyl)-acetamid (BSA) und 6 equiv DIEA in CH₂Cl₂ sowie THF bei 45 °C erfolgte. Dies führte ebenfalls nicht zum Erfolg, worauf die Untersuchungen mit dem Harz **123** aufgrund der ungenügenden Reaktivität gegenüber der Anilin-Verbindung **114** eingestellt wurden.

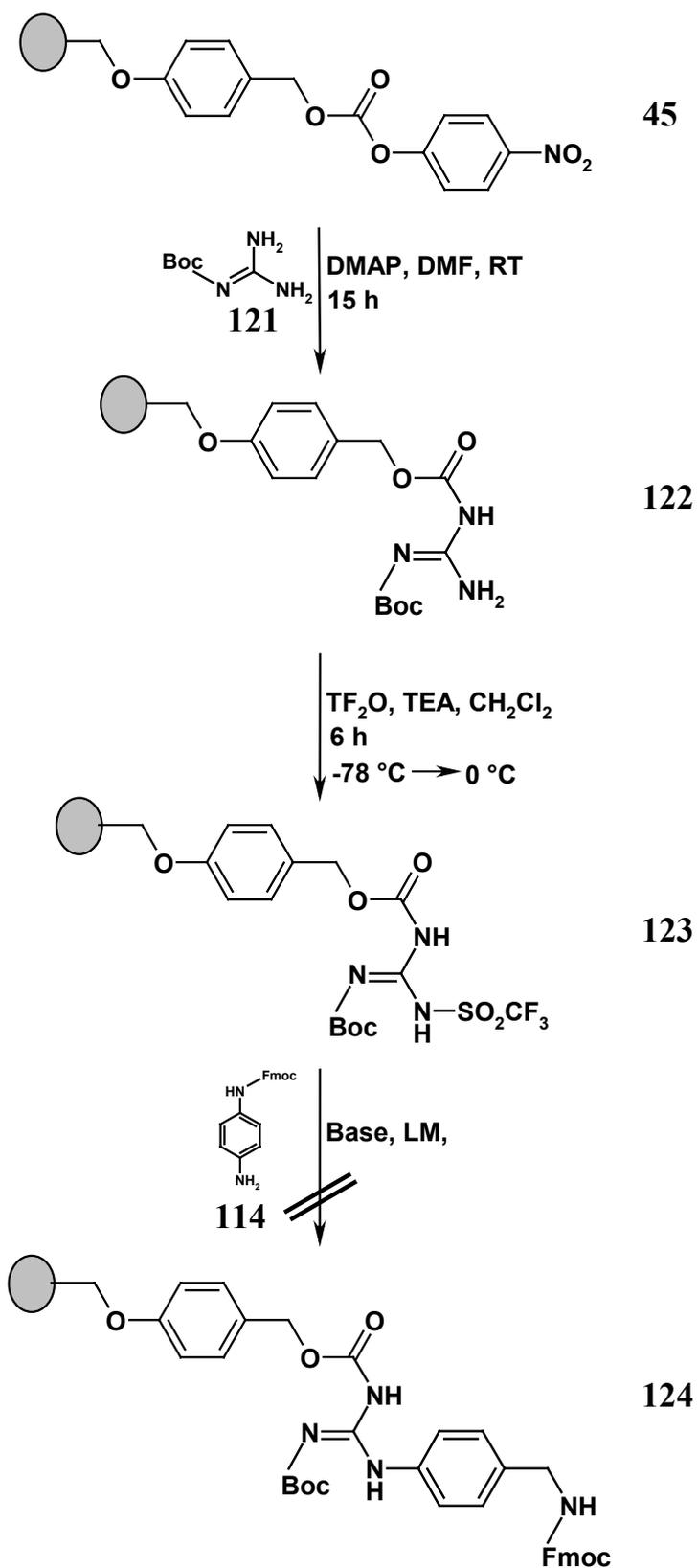


Abbildung 4-21: Darstellung des guanidinylierungsfähigen Harzes **123** nach Zapf und Mitarbeitern ^[158] und versuchter Umsatz mit **114** zu **124** unter verschiedenen Reaktionsbedingungen.

Für die Synthese in Lösung sind bereits einige potente Guanidinylierungsreagenzien einschlägig bekannt, die auf zweifach N,N' -geschützten Strukturen beruhen (Abbildung 4-22). Das wohl meist verbreitete Reagenz ist das N,N' -Di-*tert*-Butyloxycarbonyl-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin (**81**), das auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Synthese in Lösung verwendet wurde.^[145-147] Noch reaktiver zeigt sich das Triflyl-Guanidin-Derivat **125**, mit dem sowohl sterisch gehinderte Amine als auch sekundäre Amine in nicht aromatischen Ringsystemen umgesetzt werden können.^[159;160] Von Musiol *et al.* ist das N,N' -Di-*tert*-Butyloxycarbonyl-1*H*-benzotriazol-1-carboxamidin (**126**) durch Reaktion von Benzotriazol mit N,N' -Di-*tert*-Butyloxycarbonyl-thioharnstoff in Anwesenheit von Quecksilberchlorid (HgCl_2) synthetisiert worden. **126** und die entsprechenden 5-Chlor- (**127**) bzw. 6-Nitro-Derivate (**128**) zeigen sich dabei als äußerst potente Guanidinylierungsreagenzien. In Reaktionszeiten und Ausbeuten erweisen sich die drei Benzotriazol-Derivate (**126-128**) im Vergleich zum Pyrazol- (**81**) und dem Triflyl-Derivat (**125**) als überlegen.^[161] Bei den beiden Derivaten **127** und **128** ist die noch größere Reaktivität im Vergleich zu **126** auf den elektronenziehenden Effekt der elektronegativen Substituenten, der 5-Chlor- bzw. 6-Nitro-Gruppe, am Benzotriazol-Ringsystem zurückzuführen. Deshalb war es vielversprechend, diese Benzotriazol-Derivate aus der Synthese in Lösung an die feste Phase zu übertragen, um damit die höhere Reaktivität zu nutzen und die gewünschte Leitstruktur (**74**) ausgehend vom Anilin-Baustein **114** aufbauen zu können.

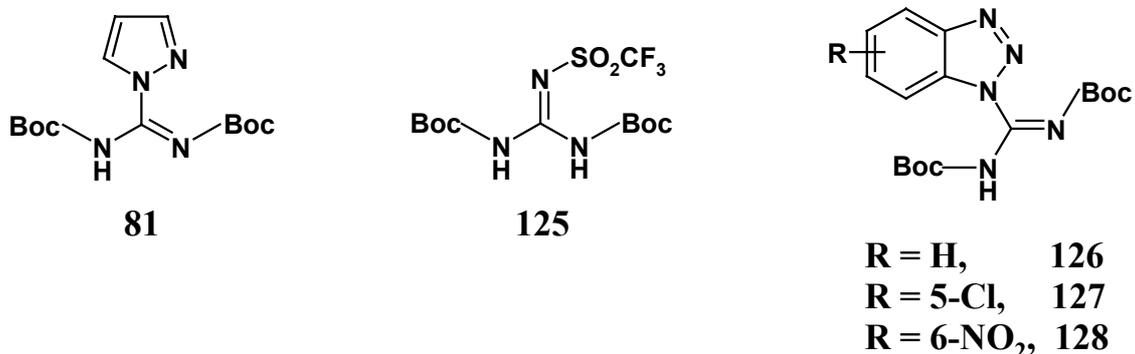


Abbildung 4-22: Zweifach N,N' -geschützte Guanidinylierungsreagenzien (**81**, **125-128**) für die Synthese in Lösung.

Synthese des Linkers

In Testansätzen unter verschiedenen Bedingungen sollte versucht werden, das Guanidino-benzotriazol **131** mit einem *p*-Nitrophenylcarbonat-Wang-Harz **45** umzusetzen und im Anschluss an die freie Stickstoff-Position die obligate Boc-Schutzgruppe einzuführen, um ein guanidinylierungsfähiges Harz auf direktem Wege zu erlangen. Dies gelang jedoch nicht, was einerseits an der Schwierigkeit der Einführung einer Boc-Schutzgruppe an ein harzgebundenes Guanidino-benzotriazol und andererseits auch auf Wechselwirkungen an der räumlich naheliegenden Polymerstruktur des Harzes beruht. Um letzteren Fall auszuschließen, wurde versucht **131** mit Rapp Tentagel S-OH Harz **130** umzusetzen, das aufgrund des relativ langen PEG-Spacers mehr Abstand zur Oberfläche des Polymerträgers bei der Reaktion gewährleisten kann, und anschließend die Boc-Schutzgruppe einzuführen (Abbildung 4-23). Im Laufe der Versuchsansätze wurde hierbei **132** im Lösemittel THF mit 2 equiv (Boc)₂O vorgelegt und jeweils mit 4 equiv der Basen Bis-(Trimethylsilyl)-lithiumamid, Natriumhydrid oder DIEA umgesetzt. Zudem wurde versucht, **132** in THF mit 5 equiv (Boc)₂O und 1 equiv DMAP umzusetzen. Dies führte in keinem der Ansätze zum Erfolg. Auch die Variante, die bereits Mono-Boc-geschützte Form von **131** direkt an die feste Phase zu koppeln, konnte weder für das Harz **45** noch für das Harz **130** gelingen.

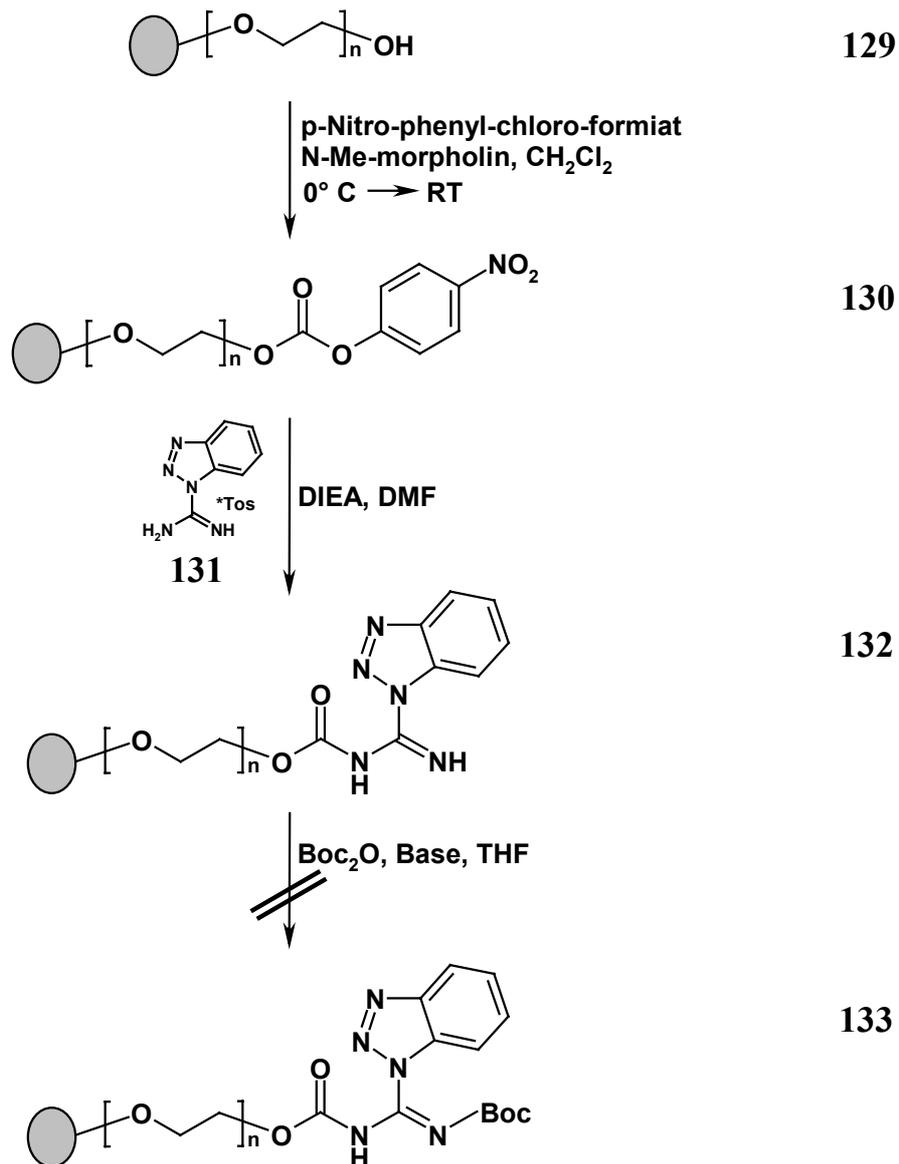


Abbildung 4-23: Problemstellung der Einführung der Boc-Schutzgruppe zur direkten Erzeugung des Benzotriazol-Harzes 133 ausgehend vom Tentagel S-OH Harz 129.

Eine Alternative zu diesem Ansatz bietet die Option, den Linker separat in Lösung aufzubauen, somit die Schutzgruppenproblematik an der festen Phase zu umgehen, und diesen dann mit einem Amino-Harz zu verknüpfen. In der Literatur wurde bereits eine Synthese eines Pyrazol-Linkers beschrieben und im Rahmen dieser Arbeit analog durchgeführt (Vorstufen sind im Experimentellen Teil mit **139b-141b** bezeichnet).^[162] Für den Benzotriazol-Linker **141** mussten die Reaktionsbedingungen, die in Abbildung 4-24 dargestellt sind, etwas abgewandelt werden. Im ersten Schritt wird 4-Hydroxymethyl-phenoxy-essigsäure (**134**) bei 35 °C mit Allylbromid (**135**), Kaliumhydrogencarbonat und Aliquat 336 umgesetzt. Die hierbei erhaltene Allylester-geschützte Verbindung **136** wird mit *p*-Nitrophenyl-chlor-formiat (**137**) bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht, wobei die Grundstruktur des Linkers **138** mit einer *p*-Nitrophenol-Abgangsgruppe entsteht. Dieser kann nun mit Guanidino-benzotriazol **131** und der Base TEA sowie DMAP bei Raumtemperatur unter Austritt der Abgangsgruppe zu **139** umgesetzt werden. Im Gegensatz zur Reaktion an der festen Phase gelingt nun mit **139** die Einführung der Boc-Schutzgruppe in Lösung mit 1.5 equiv Boc-Anhydrid und 1 equiv DMAP problemlos. Unter Schutzgas kann von **140** die Allyl-Schutzgruppe mittels Tetrakis-(triphenyl-phosphin)-Palladium (0) und *N*-Methyl-morpholin abgespalten werden, wobei der Benzotriazol-Linker **141** entsteht. Der Linker wird abschließend mit dem NovaSyn-TG-Amino-Harz, HOBt und DIC (*N,N'*-Diisopropylcarbodiimid) bei Raumtemperatur zum guanidinylierungsfähigem Benzotriazol-Harz **142** umgesetzt. Damit kann festgehalten werden, dass es gelingt, das Boc-Schutzgruppenproblem an der festen Phase durch die Verlagerung der Linkersynthese in Lösung zu umgehen.

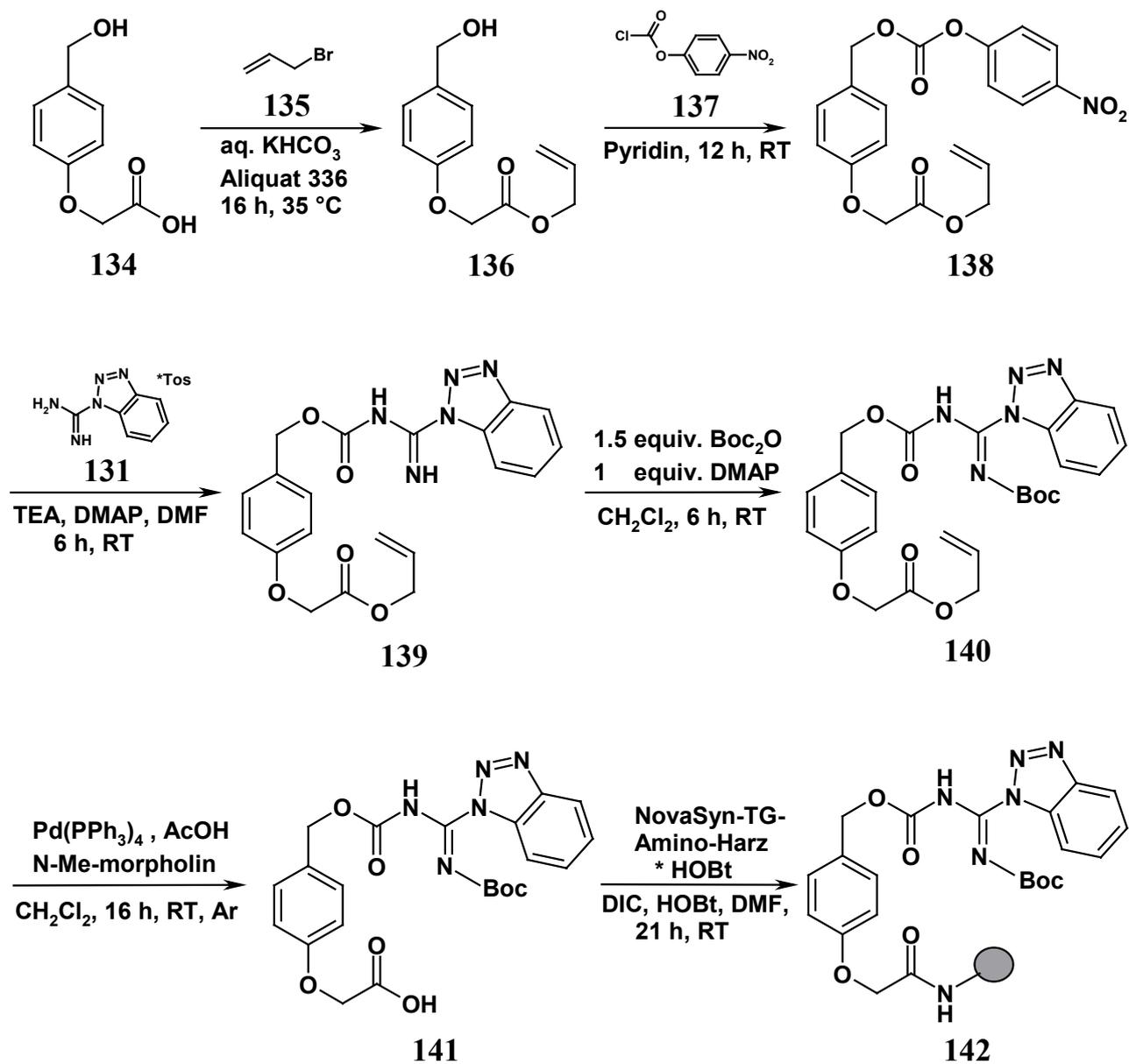
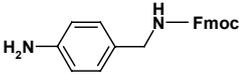
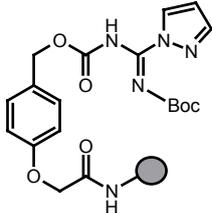
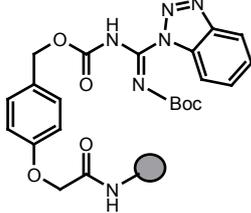


Abbildung 4-24: Syntheschema des Linker-Aufbaus in Lösung bis zur Stufe des guanidinylierungsfähigen Benzotriazol-Harzes **142**.

Erzielte Belegung der untersuchten Harze

Da bei den Untersuchungen sowohl das Pyrazol-Harz **143** als auch das Benzotriazol-Harz **142** (Abbildung 4-25) zum Einsatz kamen, waren in diesem Zusammenhang im Vergleich auch die erzielten Belegungen und Ausbeuten von Interesse. Dazu wurde jeweils die Reaktion des Pyrazol-Harzes **143** und des Benzotriazol-Harzes **142** mit *N*-Fmoc-(4-amino)-benzylamin (**114**) bei Raumtemperatur und bei 60 °C verglichen. Die Beladungen der Harze wurden über eine Piperidin-vermittelte Spaltung des harzgebundenen *N*-Fmoc-(4-guanidino)-benzylamins (**146**) photometrisch bei 301 nm ($\epsilon = 7800$) bestimmt. In Abbildung 4-25 werden die ermittelten Belegungen den jeweiligen Reaktionstemperaturen (Raumtemperatur bzw. 60 °C) und der Reaktionszeit von 16 h für beide hergestellten Harze gegenübergestellt. Das bereits bekannte Pyrazol-Harz **143** zeigt bei Raumtemperatur keine Beladung und somit keine Reaktion mit dem Anilin-Derivat **114**. Mit dem Benzotriazol-Harz **142** hingegen kann bei den gleichen Bedingungen bereits eine Beladung von 0.06 mmol/g bzw. eine Ausbeute von 21 % erzielt werden. Dieses Harz zeigt somit die Reaktivität, um zu einem geringen Anteil **114** zu guanidinylieren. Vergleicht man nun die beiden Harze bei einer Reaktionstemperatur von 60 °C, so zeigt das Pyrazol **143** eine gute Beladung von 0.15 mmol/g bzw. eine Ausbeute von 52 %, die das Benzotriazol **142** trotz seiner höheren Reaktivität bei Raumtemperatur nicht erbringen kann. **142** erweist sich mit einer Beladung von 0.09 mmol/g bzw. einer Ausbeute von 31 % damit im Verhältnis zu **143** interessanterweise als weniger reaktiv. Aufgrund dieses überraschenden Ergebnisses wurde der Fokus im weiteren Verlauf der Untersuchungen auf eventuell auftretende Nebenreaktionen gelegt, um mögliche Erklärungsansätze hierzu zu erhalten.

 114	Pyrazol-Harz:		Benzotriazol-Harz:	
	 143		 142	
	[mmol/g]	[%]	[mmol/g]	[%]
THF, 25 °C, 16 h	0	0	0.06	21
THF, 60 °C, 16 h	0.15	52	0.09	31

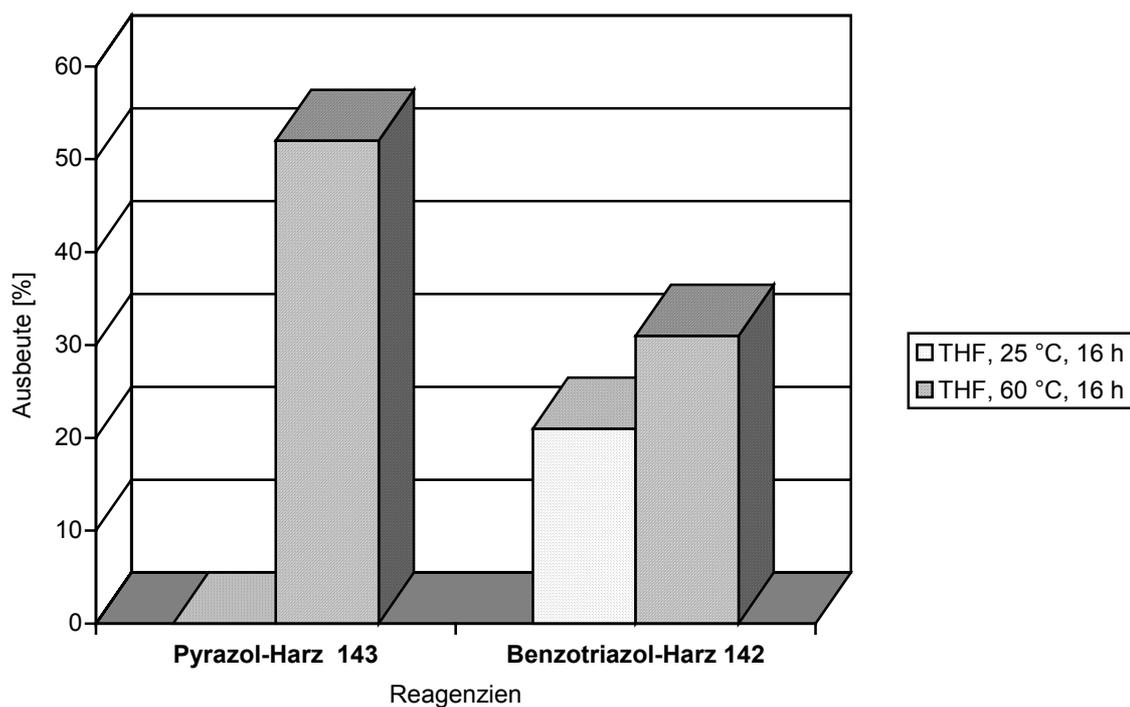


Abbildung 4-25: Vergleich der Reaktion des Pyrazol-Harzes **143** und des Benzotriazol-Harzes **142** mit *N*-Fmoc-(4-amino)-benzylamin (**114**) bei RT (gepunktet) und bei 60 °C (schraffiert) nach 16 h. Die Ausbeuten wurden spektroskopisch über eine Piperidin-vermittelte Spaltung des harzgebundenen *N*-Fmoc-(4-guanidino)-benzylamins (**146**) bestimmt.

Beobachtete Nebenreaktionen

Da die hergestellten Produkte der durchgeführten Guandinylierungen mit dem Benzotriazol-Harz **142** alle Verunreinigungen gleicher Struktur aufwiesen und die Ausbeute bei Reaktion mit dem Anker-Baustein *N*-Fmoc-(4-Amino)-benzylamin (**114**) bei Raumtemperatur vermindert ausfiel, sollten die dabei involvierten Nebenreaktionen genauer belichtet werden. Die beobachtete Produktverteilung und die Reaktionsprodukte des Pyrazol-Harzes **143** und des Benzotriazol-Harzes **142** bei 60 °C wurden verglichen. Die Untersuchung muss bei höherer Reaktionstemperatur durchgeführt werden, da das Pyrazol-Harz **143** bei Raumtemperatur bekanntlich im Gegensatz zum Benzotriazol-Harz **142** keinerlei Reaktion mit **114** zeigt. Die Produktverteilung wurde im Rahmen der Untersuchungen mittels LC-MS ermittelt (Abbildung 4-26). Die gewünschte Verbindung **146** ist bei beiden Harzen Hauptprodukt und mit 72 % im Falle des Pyrazol-Harzes **143** sowie mit 76 % im Falle des Benzotriazol-Harzes **142** vorzufinden. Es zeigen sich in beiden Fällen zwei Nebenprodukte. Die an der Guanidino-Funktion allylierte Verbindung **144** kann jedoch nicht ein Nebenprodukt der Reaktionsschritte am Harz sein. Da jedoch eine Allyl-Schutzgruppe im Verlauf der Linker-Synthese von **142** bzw. **143** eingesetzt wurde, konnte diese Nebenreaktion zugeordnet werden (vgl. Abbildung 4-24). Bei der Abspaltung der Allyl-Gruppe zur freien Säure **141** kann unter den gewählten Bedingungen ein Transfer zu einem Stickstoffatom der Guanidino-Gruppe des Moleküls stattfinden. Nach Reaktion des Linkers mit dem Amino-Harz wird es folglich als Artefakt bis zur Abspaltung vom Harz mitmodifiziert. Bei dem Harz **143** tritt es mit einem Anteil von 14 % und beim Harz **142** von 11 % auf. Das andere Nebenprodukt **145** enthält eine Amidino-Harnstoffgruppe. Zu der vorliegenden Reaktionsdurchführung bei 60 °C kann interessanterweise die Boc-Schutzgruppe am Guanidin mit einem weiteren Molekül **114** unter Verlust des *tert*-Butyl-Restes und Bildung einer Amidino-Harnstoff-Verbindung **145** reagieren. Derartige Reaktionen sind bereits literaturbekannt.^[163;164] Die entstandene Verteilung liegt im untersuchten Fall bei 14 % für **143** und 13 % für **142**.

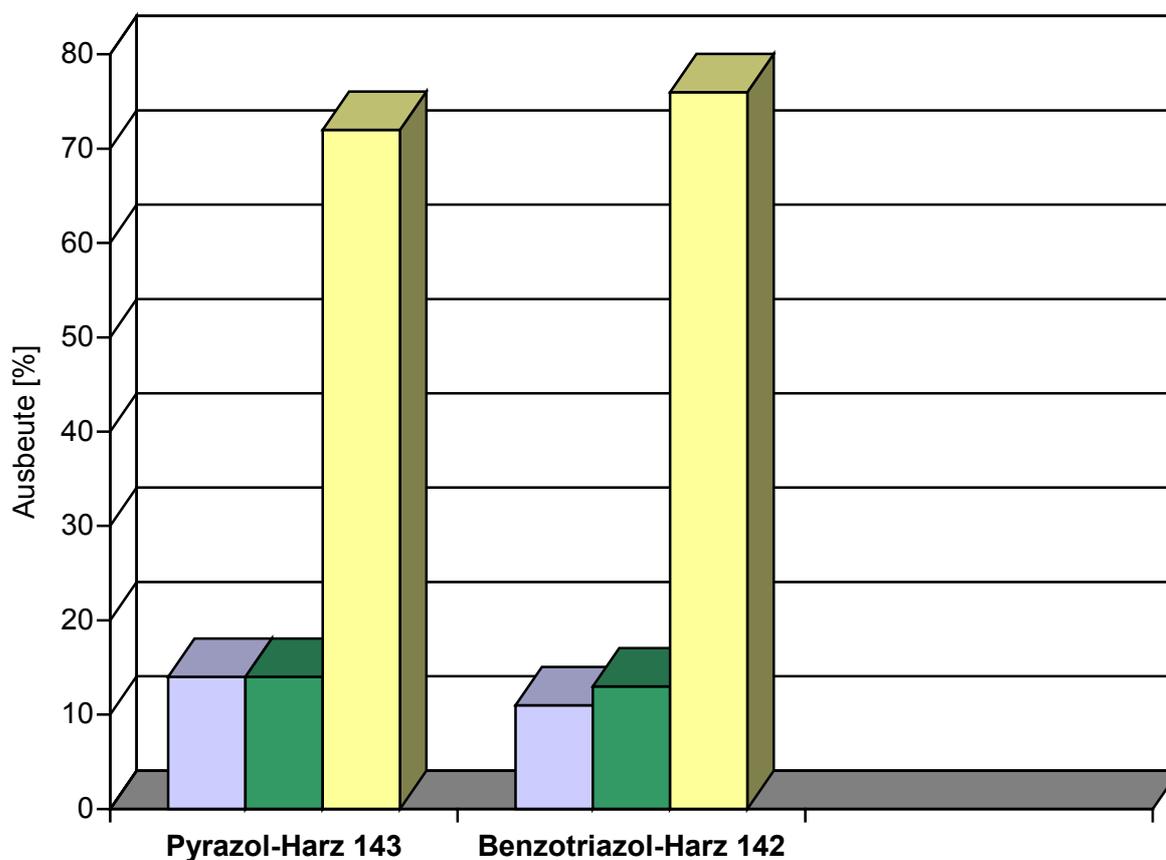
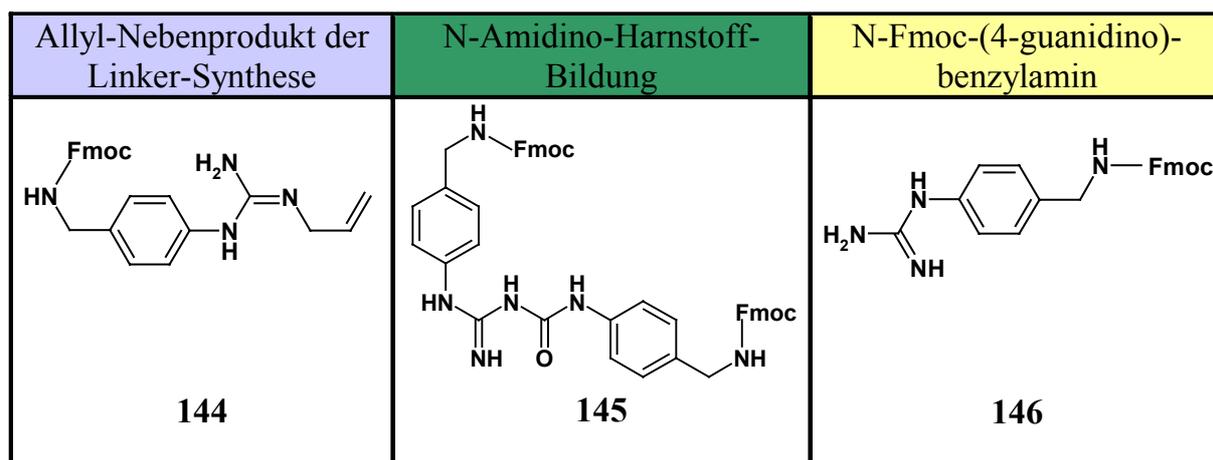


Abbildung 4-26: Beobachtete Produktverteilung und Reaktionsprodukte des Pyrazol-Harzes **143** und des Benzotriazol-Harzes **142** bei 60 °C. Die Produktverteilung wurde mittels LC-MS ermittelt. In Blau das Allyl-Nebenprodukt **144** der Linker-Synthese, in Grün die N-Amidino-Harnstoff-Verbindung **145** und in Gelb das gewünschte Produkt N-Fmoc-(4-guanidino)-benzylamin (**146**).

Als weitere interessante Nebenreaktion konnte eine „Selbst-Guanidinylierung“ freier Amino-Gruppen am NovaSyn-TG-Amino-Harz beobachtet werden. Dies tritt vermutlich bei der Reaktion des in Lösung synthetisierten Linker-Bausteins **141** mit dem Amino-Harz zum Aufbau des Guanidinylierungs-Harzes auf. Der qualitative Nachweis von Guanidino-Resten gelingt bekanntlich mit dem Sakaguchi-Test. Hierfür wird erst die Lösung A (Thymin in 10 % NaOH) und anschließend die Lösung B (α -Naphthol in EtOH) der zu testenden Verbindung bzw. dem zu testenden Harz in Lösung zugegeben. Eine entstehende Rotfärbung ist dabei charakteristisch für die Anwesenheit einer freien Guanidino-Gruppe.^[165] Die Abbildung 4-27 zeigt ein Bild der durchgeführten Tests. Während am ursprünglichen NovaSyn-TG-Amino-Harz und dem Pyrazol-Harz **143** keine freien Guanidino-Funktionen nachgewiesen werden können, zeigen die Arginin-Blindprobe und das Benzotriazol-Harz **142** eine deutliche charakteristische Rotfärbung und somit die Anwesenheit freier Guanidino-Gruppen. Diese „Selbst-Guanidinylierung“ ist sehr wahrscheinlich auf die hohe guanidinylierende Reaktivität der Benzotriazol-Verbindung im Vergleich zum Pyrazol-Derivat zurückzuführen, die sich auch in einer erhöhten Ausbeute bei der Reaktion mit dem *N*-Fmoc-(4-amino)-benzylamin (**114**) bei Raumtemperatur widerspiegelt (vgl. Abbildung 4-25). Diese Nebenreaktion ist vermutlich der eigentliche und indirekte Hauptgrund für die beobachtete verminderte Reaktionsausbeute bei Raumtemperatur und bei 60 °C im Vergleich zum Pyrazol-Harz **143**, da die anderen Nebenreaktionsprodukte bei beiden Harzen etwa gleich stark auftreten (vgl. Abbildung 4-26).

Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen gefolgert werden, dass es sich bei dem guanidinylierungsfähigen Benzotriazol-Harz **142** um eine zusätzliche Möglichkeit handelt, Moleküle mit Guanidino-Funktionen an der festen Phase zu synthetisieren. Die Guanidino-Funktion kann dabei während der gesamten Syntheseschritte als geschützt betrachtet werden und ist im Abschluss säurevermittelt abspaltbar. Vor allem das hohe Potential, das **142** durch Reaktion bei Raumtemperatur mit der nukleophil relativ unreaktiven Amino-Gruppe des Anilin-Derivates **114** zeigt, ist gerade für die Synthese von Inhibitoren, die auf derartige Ankergruppen-Bausteine gründen, von Interesse und eine attraktive Alternative zur Synthese in Lösung. Anzumerken bleibt, dass es die Nebenproduktproblematik und die verlusteinbringende

„Selbst-Guanidinylierung“ beim Harzaufbau von **142** durch Synthesemodifikationen in Zukunft zu vermeiden gilt. Im Ausblick bleibt dabei zu überprüfen, ob die von Musiol *et al.* beschriebenen, bereits in Lösung reaktiveren 5-Chlor- **127** und 6-Nitro-Derivate **128** des Benzotriazol-Grundgerüsts als weitere und reaktivere Variante eingesetzt werden könnten, oder ob dabei vor allem die „Selbst-Guanidinylierung“ bei der Reaktion des Linkers mit dem NovaSyn-TG-Amino-Harz weiter vorangetrieben wird.^[161]

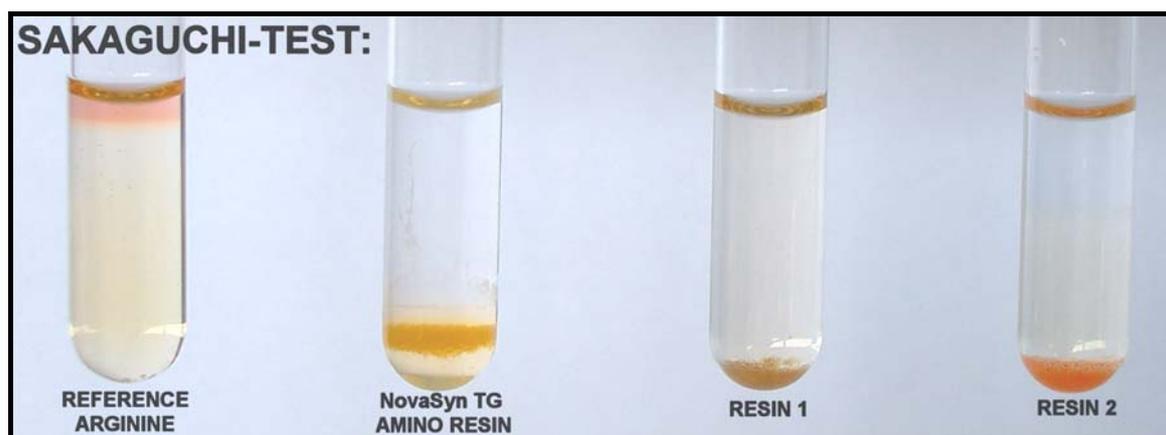
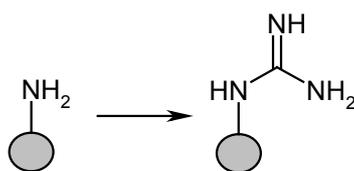


Abbildung 4-27: „Selbst-Guanidinylierung“ freier Amino-Gruppen als beobachtete Nebenreaktion bei der Synthese des Benzotriazol-Harzes **142** - nachgewiesen mittels des Sakaguchi-Tests. Von links nach rechts befindet sich im ersten Reagenzglas Arginin als Referenz für die positive Färbung des Tests, im zweiten das ursprüngliche NovaSyn-TG-Amino-Harz, im dritten das Pyrazol-Harz **143** (Resin 1) – beide negativ – und im vierten Reagenzglas, ebenfalls positiv gefärbt, das Benzotriazol-Harz **142** (Resin 2) mit freien Guanidino-Gruppen.

Synthese am Harz

Die eigentliche Festphasensynthese mit dem Harz **142** verläuft wie in Abbildung 4-28 skizziert und wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit analog zu diesem Schema auch mit dem Pyrazol-Harz **143** durchgeführt (Die entsprechenden Stufen sind im Experimentellen Teil mit **124b**, **147b**, **148b**) bezeichnet. Hierbei wird zuerst das hergestellte Benzotriazol-Harz **142** mit 10 equiv des Anilin-Derivates *N*-Fmoc-(4-amino)-benzylamin (**114**) bei Raumtemperatur bzw. 60 °C umgesetzt. Das so gekuppelte Molekül **124** besitzt damit eine völlig geschützte Guanidino-Funktion, die bei den folgenden Syntheseschritten nicht stören kann. Alle weiteren Schritte finden bei Raumtemperatur statt. **124** wird nun mit 20 % Piperidin in DMF von der Amino-Schutzgruppe befreit und kann mit Fmoc-Glycin und dem Kupplungsreagenz PyBop zusammen mit DIEA umgesetzt werden. Das nun um einen Glycin-Baustein erweiterte Molekül **147** wird erneut mit 20 % Piperidin in DMF von seiner Amino-Schutzgruppe befreit und kann dann mit dem Fmoc-D-Diaminopropionsäure-Derivat **113** und dem Kupplungsreagenz PyBop zusammen mit DIEA umgesetzt werden. Damit liegt die grundlegende Leitstruktur in Form der Fmoc-geschützten Verbindung **148** als Ausgangsbaustein vor und kann nach Behandlung mit 20 % Piperidin in DMF von der Amino-Schutzgruppe befreit werden. Im Anschluss kann **148** entweder mit verschiedenen Säure-Derivaten und dem Kupplungsreagenz PyBop oder unter basischen Bedingungen z. B. in Anwesenheit von DIEA oder TEA mit Isocyanat-Derivaten zu den entsprechenden Harnstoff-Verbindungen umgesetzt werden. Abschließend werden die Derivate mittels TFA/CH₂Cl₂ (1 : 1) zu **119** abgespalten. Nach Abspaltung zeigen die Verbindungen jedoch keine sehr hohe Reinheit, so dass die Festphasensynthese noch optimiert werden muss.

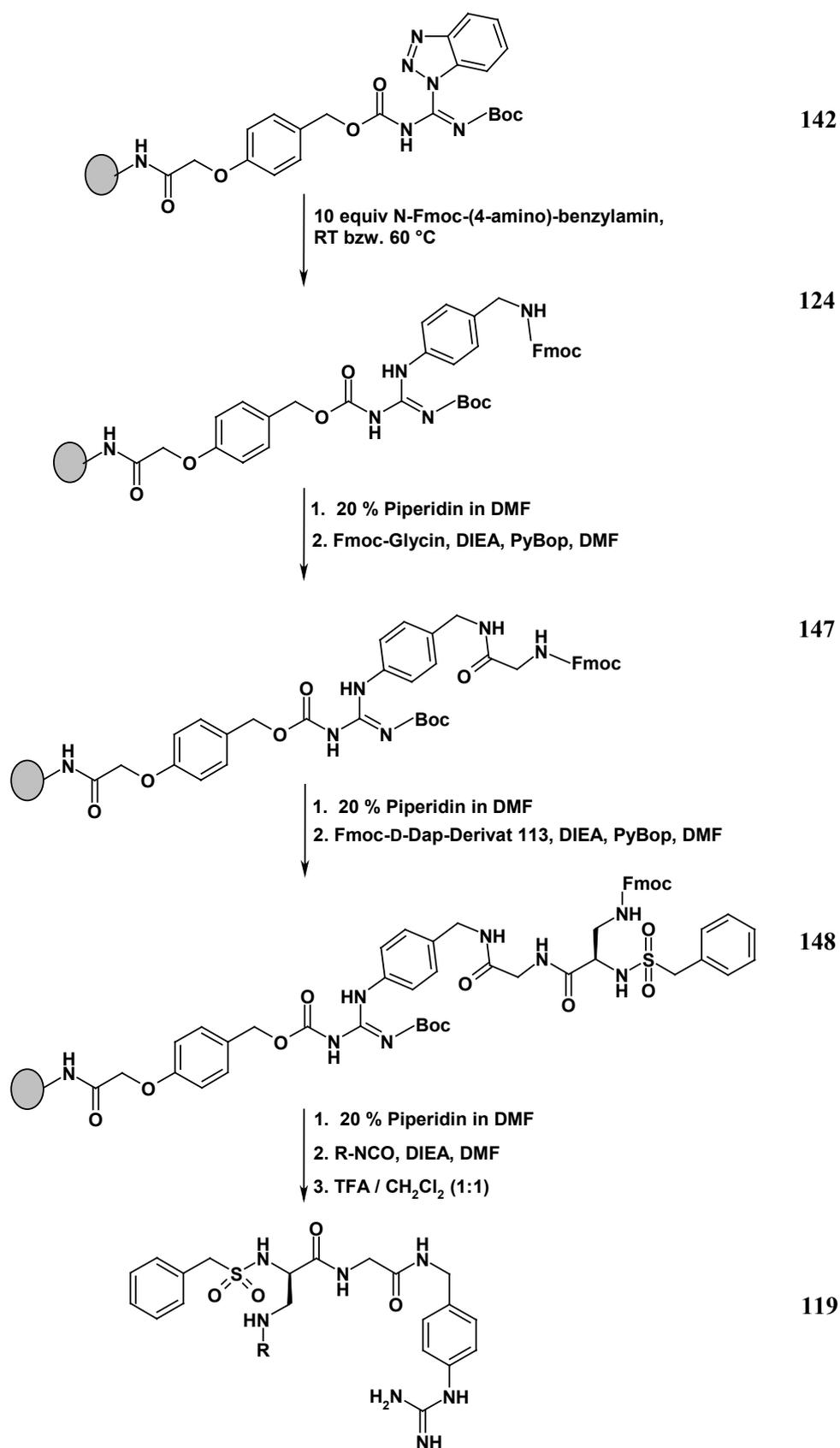


Abbildung 4-28: Festphasensynthese am Beispiel des Benzotriazol-Harzes 142 unter Fmoc-Strategie zur Erzeugung der Seitenketten-Derivate - hier im Falle der Harnstoff-Derivate. Die Guanidino-Funktion liegt dabei bis zur Abspaltung geschützt vor.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Faktor Xa Inhibitoren

Die Untersuchung und Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren im Bereich der antithrombotischen Wirkstoffe fand in den letzten Jahren eine zunehmende Aufmerksamkeit. Hierbei bieten sich innerhalb der Blutgerinnungskaskade verschiedene Möglichkeiten für eine potentielle Therapieintervention durch Hemmung an. Da die direkte Hemmung von Thrombin die Neubildung aus Prothrombin nicht verhindert, kann nur mit sehr hohen Dosen eine wirksame Antikoagulationstherapie erreicht werden. Untersuchungen dazu haben gezeigt, dass dadurch eine zu starke Hemmung des Gerinnungsprozesses eintreten kann und nicht-tolerierbare Nebenwirkungen wie schwere Blutungen auftreten. Durch die zentrale Position innerhalb der Gerinnungskaskade ergeben sich durch die Hemmung von Faktor Xa zwei Vorteile. Erstens wird die Neubildung von Thrombin aus Prothrombin vermindert und es kann aufgrund des Verstärkungscharakters der Kaskade mit weniger hohen Dosen gearbeitet werden, da sich Faktor Xa vor Thrombin in der Kaskade befindet. Zweitens bleibt damit eine Minimalkonzentration von Thrombin im Blut aufrecht erhalten, was das Auftreten von Blutungskomplikationen einschränken kann und für eine primäre Hämostase sorgt. Im Falle eines potentiellen Gerinnungshemmers, wie eines Faktor Xa-Inhibitors, spielen entscheidende pharmakologische Bewertungskriterien eine Rolle, die über die Hemmwirkung und Selektivität gegenüber relevanter Enzyme *in vitro* hinaus gehen. Eigenschaften wie beispielsweise die orale Bioverfügbarkeit und die Eliminierung aus der Blutbahn entscheiden, ob eine Verbindung die notwendigen Anforderungen erfüllen kann, um diese zum Wirkstoff weiter zu entwickeln oder nicht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch geeignete Derivatisierungsschritte die vorgegebene (*R*)-3-Amidinophenylalanin-Leitstruktur in ihrer chemischen Stabilität und Hemmwirkung bei exzellenter Selektivität gegenüber den relevanten Serinproteasen optimiert werden kann. Der Austausch einer N-terminal säurelabilen Adamantyloxycarbonyl-Gruppe gegen eine säurestabile Adamantyl-Harnstoffgruppe führte zu einer verbesserten chemischen Stabilität sowie auch

Resistenz gegen enzymatischen Abbau. Die Röntgenkristallstruktur-Analyse der C-terminalen Phenethylamid-Verbindung ($K_i = 74$ nM) im Komplex mit Faktor Xa enthüllte einen zu den „Modeling“-Daten entgegengesetzten, neuartigen Bindungsmodus. Hierbei vermag der Phenethylamid-Rest des Inhibitors durch hydrophobe Wechselwirkungen eine vorgelagerte Rille der S_1 -Tasche, die sogenannte „Subgroove“ bzw. $S_{1\beta}$ -Bindungstasche, zu adressieren. Dieses Bindungsmerkmal scheint die Hauptursache für die exzellente Selektivität des Inhibitors gegenüber anderen getesteten Serinproteasen zu sein. Ausgehend von diesen Daten gelang es die Hemmwirkung bei gleichbleibender Selektivität zu verbessern. So konnten N-terminal ein Amino-Derivat ($K_i = 59$ nM), eine Dioxol-Verbindung ($K_i = 48$ nM) und ein Thiophen-Derivat ($K_i = 60$ nM) mit erhöhter Hemmwirkung hergestellt werden. Der Versuch die Benzamidin-Ankergruppe an der Leitstruktur durch ein Imidazol zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit auszutauschen, führte leider zum totalen Verlust der Hemmwirkung und Selektivität.

Das Phenethylamid-Derivat wurde zudem in verschiedenen *in vivo*-Untersuchungen im Bereich Blutgerinnung und Metastasierung eingesetzt. Im Bereich der Blutgerinnung konnte festgestellt werden, dass diese Verbindung wegen der Benzamidin-Ankergruppe eine schlechte orale Bioverfügbarkeit besitzt und zudem Faktor Xa im Prothrombinasekomplex nur ungenügend hemmt. Darüber hinaus weist sie einen schlechten Thrombus-Score (3) auf und wird rasch aus der Blutbahn eliminiert. Trotz der hohen Selektivität und des exzellenten K_i -Wertes erfüllt dieser Hemmstoff unter pharmakologischen Bewertungskriterien nicht die notwendigen Anforderungen an einen Gerinnungshemmer, um ihn zum Arzneimittel weiter zu entwickeln. Ursache für die rasche Eliminierung des Inhibitors sind auftretende Plasma-Protein-Bindungen (> 99%), die es verhindern, dass dieser Hemmstoff in genügender Konzentration Faktor Xa erreichen kann. Deshalb wurde versucht eine polare Säure-Funktion in die Leitstruktur über ein weiteres C-terminales Phenylalanin einzuführen. Die Säurenvariante ($K_i = 54$ nM) zeigte unerwarteterweise nur eine marginale Verbesserung der Eliminierungsrate.

Das Phenethylamid-Derivat als selektiver Faktor Xa-Inhibitor erreicht im Bereich der *in vivo*-Untersuchungen zur anti-metastatischen Wirkung ein signifikantes Ergebnis. In zwei Mausmodellen konnte die Ausbildung von Metastasen um 91 % bzw. 63.9 %

reduziert werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass bei den behandelten Mäusen in beiden Modellen keine relevanten sichtbaren Blutungskomplikationen sowie Veränderungen des Gerinnungsstatus auftraten. Dies bestätigt zwar die ineffiziente Gerinnungshemmung des Hemmstoffes, der sich aber dadurch gerade für den Einsatz als anti-metastatisch wirksames Therapeutikum eignen könnte, da Blutungen als unerwünschte Nebenwirkung im Tier nicht beobachtet werden. Da die Synthese der Amid-Derivate bei ungeschützter Amidino-Gruppe sich als problematisch erwies, wurden für die Synthese in Lösung eine Schutzgruppenstrategie ausgearbeitet. Zudem wurde eine Synthese an der festen Phase mit einem Linker als Schutzgruppe erarbeitet, die solche Amidin-Peptidomimetika schneller und leichter zugänglich machen sollte.

5.2 uPA Inhibitoren

In den pathologischen Prozessen der Tumordinvasion und Metastasierung spielt der Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) eine zentrale Rolle. Nachdem die trypsin-ähnliche Serinprotease uPA das Plasminogen zu Plasmin aktiviert, veranlasst dieses die Aktivierung verschiedener Matrix-Metallo-Proteasen, die im Abbau der extrazellulären Matrix involviert sind. Durch die Bindung von uPA an seinen membrangebundenen uPA-Rezeptor (uPAR), kommt es an der Tumordinvasionsfront zu einer gerichteten proteolytischen Aktivität. Infolge dessen kann eine Tumorzelle den Bereich des ursprünglichen Primärtumors verlassen und zur Ausbildung von Metastasen bzw. Tochtergeschwulsten führen. Verbunden mit der erwiesenen, hohen klinischen Relevanz von uPA bei verschiedenen Krebserkrankungen als prognostischer Marker, ist dieses Enzym zu einem vielversprechenden pharmazeutischen Target für moderne Therapieansätze geworden.

Von zwei vorgegebenen Leitstrukturen, die auf einer 4-(Aminomethyl)-phenylguanidin-Grundstruktur basierten, wurden neue Derivate synthetisiert, um die Hemmwirkung und Selektivität *in vitro* sowie deren orale Bioverfügbarkeit zu verbessern. Dabei lagen in beiden Fällen Röntgenstruktur-Analysen vor, die es ermöglichten durch rationales Wirkstoffdesign die Wechselwirkung der Leitstrukturen

zu uPA zu optimieren. Die Einführung eines Malonsäure-Restes in die Leitstruktur ($K_i = 2.4 \mu\text{M}$), um zusätzliche Derivatisierungen über die Carboxylgruppen zu erlauben, führte zu keiner Verbesserung der Hemmwirkung sowie Selektivität. In der zweiten Leitstruktur ($K_i = 30 \text{ nM}$) sollte ein D-Serin-Strukturelement durch D-Diaminopropionsäure ersetzt werden, um über Derivatisierungen der Amino-Funktion die Bioverfügbarkeit zu verbessern. Obwohl erste Derivate zu keiner Verbesserung ($K_i = 480$ bzw. 130 nM) führten, ist dieser Weg sehr erfolgversprechend. Deshalb wurde zunächst eine neue Festphasensynthesestrategie erarbeitet, wobei der Harz-Linker gleichzeitig die Guanidino-Funktion schützen sollte. Dazu wurden Guanidinylierungsreagenzien am Harz gebunden, um Amino-Vorstufen umzusetzen, wodurch die entstehende Guanidino-Gruppe am Harz geschützt wird. Hierzu wurde eine Synthese an der festen Phase unter Guanidinylierung und gleichzeitiger Verknüpfung der Amino-Vorstufe ausgearbeitet, wobei die entstehende Guanidino-Gruppe als geschützt betrachtet werden kann. Die bekannten guanidinylierungsfähigen Harze erwiesen sich ungenügend reaktiv, um die aromatische Aminogruppen von Anilinvorstufen ausreichend zu guanidinylieren. Deswegen wurde ein neues Harz synthetisiert, das auf einer Guanidino-benzotriazol-Struktur basiert. Diese erlaubt Guanidinylierungen bei Raumtemperatur. Im Rahmen dieser synthetischen Arbeit musste der Linker getrennt aufgebaut werden. Auftretende Nebenreaktionen wurden im Detail untersucht, wodurch weitere Verbesserungen ermöglicht werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Material und Methoden

Die verwendeten Lösungsmittel wurden von den Firmen *Fluka* und *Merck* entweder in p. a. Qualität bezogen oder nach den üblichen Standardverfahren gereinigt. Für analytische HPLC und präparative HPLC wurde LiChrosolv Acetonitril von *Merck* eingesetzt. Weitere gängige Chemikalien wurden bei *Aldrich*, *Bachem*, *Fluka* und *Merck* erworben. Als Katalysator für die Hydrogenolyse wurde 10 % Pd auf Aktivkohle (Typ E10 E/W) der Firma *Degussa* verwendet. Das isomerenreine Boc-(3-cyano)-D-phenylalanin wurde von der Firma *Fluka*, das *p*-Nitrophenylcarbonat-Wang-Harz und das Nova Syn TG-Amino-Harz zur Festphasensynthese wurde von der Firma *Novabiochem* (Basel, Schweiz) bezogen. Das Adamantylloxycarbonylfluorid und das *N*-(Boc)-4-*O*-Benzyl-L-asparaginsäure-*N*-hydroxysuccinimid standen aus früheren Synthesen in der Abteilung zur Verfügung. Produkte wurden bei Bedarf aus *tert*-Butanol/Wasser (4 : 1) lyophilisiert.

Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Festphasensynthese

Quellen des Harzes: Dazu wurde das entsprechende Harz im Lösungsmittel der nachfolgenden Reaktion geschüttelt (3 x 1 min).

Waschen des Harzes: Das Reaktionsgemisch wurde vom Harz abgetrennt und dann mit dem Lösemittel, in welchem die Reaktion durchgeführt wurde, gewaschen (3 x 1 min). Anschließend wurde, falls nicht anders angegeben, die folgende Waschprozedur standardmäßig durchgeführt: Waschen mit DMF (3 x 1 min), Waschen mit MeOH (3 x 1 min), Waschen mit CH₂Cl₂ (3 x 1 min) und Waschen mit Diethylether (3 x 1 min). Zur Lagerung wurde das Harz im Vakuum getrocknet und dort aufbewahrt.

Fmoc-Abspaltung: Nach Quellen des Harzes in DMF wurde eine Mischung aus 20 % Piperidin in DMF zugesetzt (5 min). Danach wurde die Reaktionslösung vom Harz abgetrennt und erneut 20 % Piperidin in DMF zugesetzt (15 min). Abschließend wurde die Reaktionslösung abgetrennt und das Harz gewaschen.

Beladungsbestimmung (Fmoc-Bestimmung): Die effektive Beladung einer Fmoc-geschützten Verbindung am Harz wurde durch die spektroskopische Quantifizierung mittels UV eines Fulven/Piperidin-Adduktes bei 301 nm ($\epsilon = 7800$) bestimmt. Dazu wurde Fmoc mittels 20 % Piperidin in DMF (1 ml) abgespalten und nach 1 h mit MeOH auf ein Volumen von 10 ml verdünnt.

Dde-Abspaltung: Nach Quellen des Harzes in DMF wurde eine Mischung aus 2 % Hydrazin-Hydrat in DMF zugesetzt (5 min). Danach wurde die Reaktionslösung vom Harz abgetrennt und erneut 2 % Hydrazin-Hydrat in DMF zugesetzt (2 x 5 min). Abschließend wurde die Reaktionslösung abgetrennt und das Harz gewaschen.

Abspaltung vom Harz: Nach Quellen des Harzes erfolgte die Abspaltung der Amidine oder Guanidine entweder mittels 95 % aq. TFA in Wasser (1 h) oder einer Mischung aus 95 % aq. TFA in Wasser und CH_2Cl_2 (1 : 1, 1 h). Danach wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt. Die Produkte wurden aus PE/Ether umkristallisiert (Hydrochloride) oder falls erforderlich mittels präparativer HPLC gereinigt (Trifluoracetatsalze) und aus *tert*-Butanol/Wasser (4:1) lyophilisiert.

Sakaguchi-Test: Für den qualitativen Nachweis von Guanidiniumresten am Harz wurde der Sakaguchi-Test eingesetzt. Hierfür wurde erst die Lösung A (200 mg Thymin in 10 ml 10 % NaOH), dann die Lösung B (40 mg α -Naphthol in 100 ml EtOH) dem zu testenden Harz in Lösung zugegeben. Als Blindprobe diente eine Lösung aus Arginin in etwas EtOH. Eine rote Färbung ist charakteristisch für einen positiven Test.^[165]

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel 60 F₂₅₄ DC-Alufolien der Firma *Merck* (Darmstadt) eingesetzt. Die verwendeten Eluentensysteme sind jeweils angegeben. Die Detektion der Substanzen erfolgte in der Regel durch UV-Absorption (254 und 366 nm) sowie mittels Chlor/*o*-Tolidin (1.5 g *o*-Tolidin und 4.2 g KI in 60 ml Eisessig und 940 ml Wasser). Bei schlecht detektierbaren Substanzen wurde mit KMnO₄ (2 % in Wasser) oxidiert. Die verwendeten Fließmittelsysteme werden hierbei jeweils bei den Synthesevorschriften angegeben.

Präparative Säulenchromatographie

Für die präparative Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (230 - 400 mesh ASTM) der Firma *Merck* (Darmstadt) verwendet. Die eingesetzten Lösungsmittelgemische werden bei den entsprechenden Synthesen angegeben.

Präparative HPLC

Für die präparative HPLC wurde eine integrierte HPLC-Anlage der Firma *Abimed-Gilson* (Langenfeld), bestehend aus den Teilsystemen Pump 321, Detektor UV-VIS 152, Interface 506C und Fraction-Collector Model 202, verwendet. Als Software zur Systemsteuerung und Datenverarbeitung wurde UniPoint V 2.10 von *Gilson* eingesetzt. Dazu wurde eine Säule des Typs X Terra Prep MS C18, 5 µm, 19 x 100 mm der Firma *Waters* (Eschborn) mit den Eluenten 0.1 % wässrige TFA (A) und Acetonitril mit 0.1 % TFA (B) benutzt.

Analytische HPLC

Die analytische HPLC wurde mit einer Anlage der Firma *Waters* (Eschborn) bei einer Flussrate von 1 ml/min auf verschiedenen Säulentypen durchgeführt und bei 210 nm detektiert:

- (I) Säule Nucleosil 100/C8, 4 x 125 mm, *Macherey-Nagel* (Düren) mit linearem Gradienten Acetonitril/2 % H₃PO₄ von 5 : 95 (A) zu 90 : 10 (B) in 13 min mit anschließend 2 min isokratischer Elution.
- (II) Säule X-Terra-TM-C8, 5 µm, 3.9 x 150 mm, *Waters* (Eschborn) mit linearem Gradienten Acetonitril/2 % H₃PO₄ von 5 : 95 (A) zu 90 : 10 (B) in 15 min mit anschließend 1 min isokratischer Elution.
- (III) Säule Luna C18, 5µm, 4.6 x 150 mm, *Phenomenex* (Aschaffenburg) mit linearem Gradienten Acetonitril/2 % H₃PO₄ von 5 : 95 (A) zu 90 : 10 (B) in 15 min mit anschließend 1 min isokratischer Elution.
- (IV) Säule Symmetry C18, 5 µm, 3.9 x 150 mm, *Waters* (Eschborn) mit linearem Gradienten Acetonitril/2 % H₃PO₄ von 5 : 95 (A) zu 90 : 10 (B) in 15 min mit anschließend 1 min isokratischer Elution.
- (V) Säule Chromolith Performance RP 18e, 4.6 x 100 mm, *Merck* (Darmstadt) mit linearem Gradienten Acetonitril/2 % H₃PO₄ von 5 : 95 (A) zu 90 : 10 (B) in 6 min mit anschließend 1 min isokratischer Elution.

Massenspektrometrie

Die ESI-Massenspektren wurden an einem Spektrometer des Typs PE SCIEX API 165 der Firma *Applied Biosystems* (Darmstadt) aufgenommen. Das Gerät wurde hierbei auch mit einem 15 min Gradienten von 5-80 % Acetonitril/Wasser bei einem Fluss von 250 µl mit 1 % TFA zur kombinierten HPLC-MS Analyse eingesetzt. Das PE online HPLC System bestand dabei aus einem 140 Microgradient Pumpensystem, einem Series 200 Autosampler und einem 785 A UV/VIS Detektor. Als Trennsäule diente eine Säule vom Typ 100/C8, 2 x 125 mm, *Macherey-Nagel* (Düren).

UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Spektren wurden an einem Spektroskop des Typs Lambda 19 der Firma *Perkin Elmer* (Rodgau -Jügesheim) aufgenommen. Als Software wurde zugehörige UV WinLab Version 2.0 verwendet. Die Schichtdicke der Quarzglasküvette betrug 1 cm.

IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden an einem FT-IR Spektroskop des Typs 1760 X der Firma *Perkin Elmer* (Rodgau-Jügesheim) aufgenommen. Für Messungen mit einer ATR-Zelle wurde eine Zelle vom Typ SensIR DuraSampl IR II verwendet.

Schmelzpunkte

Zur Schmelzpunktbestimmung wurde eine Schmelzpunktapparatur des Typs 510 der Firma *Büchi* (Flawil, Schweiz) verwendet. Die ermittelten Werte sind nicht korrigiert.

6.2 Enzymkinetik

Ermittlung der Inhibitionskonstanten (K_i -Werte)

Die K_i -Werte für die Hemmung der verschiedenen Enzyme wurden im Zentrum für vaskuläre Biologie und Medizin, Erfurt, in der Arbeitsgruppe von Dr. Jörg Stürzebecher und unter Verwendung spezifischer synthetischer Substrate ermittelt. Die Reaktionen wurden auf Mikrotiter-Platten ausgeführt und mit dem Mikroplate-Reader iEMS Reader MF der Firma *Labsystems* (Helsinki, Finnland) bei 25 °C gemessen. Das Testmedium bestand aus 200 µL Tris-Puffer (0.05 M; 0.154 M NaCl, 5 % EtOH, pH 8.0), 25 µL wässriger Substratlösung und 50 µL Enzymlösung. Die K_i -Werte wurden jeweils mit zwei verschiedenen Substrat- und fünf unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen bestimmt. Drei Minuten nach Messbeginn wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µL 50 % aq. Essigsäure gestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm erfasst. Die Dissoziationskonstanten der Enzym-Inhibitor-Komplexe wurden nach Dixon mit einem linearen Regressionsprogramm berechnet.^[166] Die errechneten K_i -Werte sind Mittelwerte aus mindestens 3 Einzelbestimmungen.

Eingesetzte Enzyme und Substrate zur K_i -Wert-Bestimmung

Folgende Enzyme und Substrate wurden mit den jeweils in Klammern angegebenen Aktivitäten und Konzentrationen zur Ermittlung der Inhibitionskonstanten eingesetzt. Die verwendeten Substrate stammen von der Firma *Pentapharm Ltd.* (Basel, Schweiz):

- **bovines Pankreas-Trypsin** (42 U/mg, 0.0038 U/mL), *Serva* (Heidelberg); Substrat: MeSO₂-D-hexahydrotyrosyl-Gly-Arg-pNA (0.18 und 0.06 mM).
- **bovines Thrombin** wurde gemäß der Beschreibung von Walsmann (Walsmann 1968) hergestellt (2262 U/mg, 0.45 U/mL); Substrat: MeSO₂-D-hexahydrotyrosyl-Gly-Arg-pNA (0.18 und 0.09 mM).
- **humaner Faktor Xa** (4 mg/vial, 0.18 µg/mL), *Kordia Lab. Supplies* (Leiden, Niederlande); Substrat: MeSO₂-D-Nle-Gly-Arg-pNA (0.36 und 0.18 mM).
- **humaner uPA** (500000 U/vial, abschließende Konzentration 150 U/mL), *Ribosepharm GmbH* (Haan); Substrat: Bz-βAla-Gly-Arg-pNA (0.18 und 0.09 mM).
- **humanes Plasmin** (0.67 CTA-U/mg, 0.06 CTA-U/mL), *Behringwerke AG* (Marburg); Substrat: Tos-Gly-Pro-Lys-pNA (0.18 und 0.09 mM).

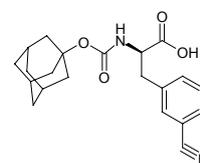
6.3 Faktor Xa-Inhibitoren

6.3.1 Synthesevorschriften

6.3.1.1 Synthese in Lösung

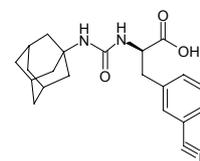
(R)-2-(Adamant-1-yl-oxycarbonylamino)-3-(3-cyanophenyl)-propionsäure (30b)

Zu einer Lösung des TFA-Salzes der (R)-2-Amino-3-(3-cyanophenyl)-propionsäure (1.0 g, 3.4 mmol) und TEA (1.4 ml, 10.3 mmol) in DMF (5 ml) wurde Adoc-F (0.7 g, 3.4 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde für 4 h durch Zugabe von TEA auf pH 8-9 gehalten. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in AcOEt aufgenommen. Anschließend wurde die organische Phase mit 0.1 M HCl (3 x), Wasser (2 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 1.2 g (94 %) farbloses Öl; HPLC (II): t_R 12.1 min; ESI-MS: m/z = 369.2 (M+H)⁺, ber. für C₂₁H₂₄N₂O₄: 368.4.



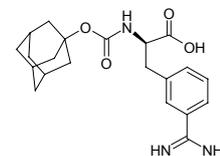
(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-cyanophenyl)-propionsäure (30)

Zu einer Lösung des TFA-Salzes der (R)-2-Amino-3-(3-cyanophenyl)-propionsäure (2.1 g, 7 mmol) und TEA (2.9 ml, 21.1 mmol) in DMF (10 ml) wurde 1-Adamantylisocyanat (1.5 g, 8.4 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde für 4 h durch Zugabe von TEA auf pH 8-9 gehalten. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in AcOEt aufgenommen. Anschließend wurde die organische Phase mit 0.1 M HCl (3 x), Wasser (2 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 2.5 g (96 %) farbloses Öl; HPLC (II): t_R 11.3 min; ESI-MS: m/z = 368.2 (M+H)⁺, ber. für C₂₁H₂₅N₃O₃: 367.4.



(R)-2-(Adamant-1-yl-oxycarbonylamino)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-propionsäure (32b)

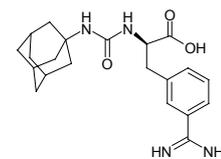
(R)-2-(Adamant-1-yl-oxycarbonylamino)-3-(3-cyanophenyl)-propionsäure (1.3 g, 3.4 mmol), Hydroxylamin Hydrochlorid (0.4 g, 5.2 mmol) und DIEA (1.7 ml, 10.3 mmol) wurden in EtOH (10 ml)



über Nacht unter Rückfluss gekocht. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.1 M HCl gelöst und mit AcOEt gewaschen. Das Produkt wurde aus der wässrigen Phase mit wassergesättigtem *n*-Butanol (3 x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (2 x), gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Diese Zwischenstufe wurde in 2-Propanol/Wasser (4 : 1; 100 ml), dem 1 equiv HCl und 10 % Pd/C zugegeben wurden, bei 40 °C über Nacht hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 0.8 g (64 %); HPLC (II): *t*_R 8.5 min; ESI-MS: *m/z* = 386.2 (M+H)⁺, ber. für C₂₁H₂₇N₃O₄: 385.5.

(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-propionsäure (32)

Die Titelverbindung wurde wie für das Adamantyl-oxycarbonylderivat beschrieben hergestellt. Ausbeute: 1.3 g (58 %); HPLC (II): *t*_R 9.1 min; ESI-MS: *m/z* = 385.2 (M+H)⁺, ber. für C₂₁H₂₈N₄O₃: 384.5.

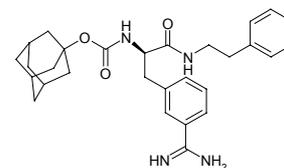


Allgemeine Vorschrift zur Synthese der (*R*)-2-(Adamant-1-yl-oxycarbonylamino)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-*N*-aryl-propionamide und der (*R*)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-*N*-aryl-propionamide:

Zu einer Lösung des Hydrochlorids der 3-Amidinoverbindung (1 equiv) und PyBOP (1.2 equiv) in DMF wurde das entsprechende Amin (1 equiv) zugegeben (für den Fall, dass das Amin als Hydrochlorid vorlag, zusammen mit 1 equiv DIEA). Nach 5 min Voraktivierung wurde erneut 1 equiv Amin zugegeben (für den Fall, dass das Amin als Hydrochlorid vorlag, wiederum mit 1 equiv DIEA). Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt und nach der vollständigen Umsetzung wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in AcOEt aufgenommen und mehrmals gegen 5 % aq. NaHCO₃, 0.1 M HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, das Lösemittel eingeengt und die Produkte aus PE/Ether umkristallisiert (Hydrochloride). Falls erforderlich wurden die so gewonnenen Derivate mittels präparativer HPLC gereinigt (Trifluoracetatsalze) und aus *tert*-Butanol/Wasser (4 : 1) lyophilisiert.

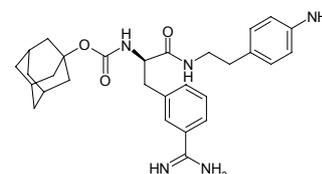
(*R*)-2-(Adamant-1-yl-oxycarbonylamino)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-*N*-(phenethyl)-propionsäureamid (8)

Ausbeute: 28 mg (80 %) weißes Pulver; HPLC (I): t_R 9.9 min;
ESI-MS: $m/z = 489.4$ (M+H)⁺, ber. für C₂₉H₃₆N₄O₃: 488.3.



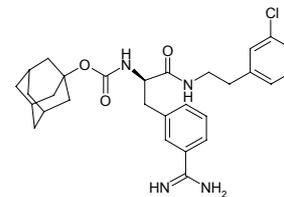
(*R*)-2-(Adamant-1-yl-oxycarbonylamino)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-*N*-[2-(4-amino-phenyl)-ethyl]-propionsäureamid (9)

Ausbeute: 77 mg (60 %) (Rohprodukt), 5 mg (4 %) (nach Reinigung) gelbes Pulver; HPLC (V): t_R 2.0 min; ESI-MS: $m/z = 504.4$ (M+H)⁺, ber. für C₂₉H₃₇N₅O₃: 503.6.

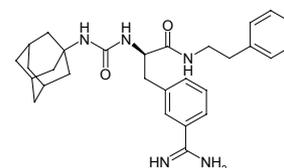


(R)-2-(Adamant-1-yl-oxycarbonylamino)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-N-[2-(3-chlor-phenyl)-ethyl]-propionsäureamid (10)

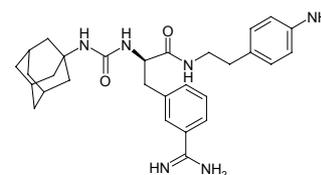
Ausbeute: 74 mg (56 %) (Rohprodukt), 4 mg (3 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 3.4 min; ESI-MS: $m/z = 523.2$ (M+H)⁺, ber. für C₂₉H₃₅ClN₄O₃: 522.

**(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-N-(phenethyl)-propionsäureamid (11)**

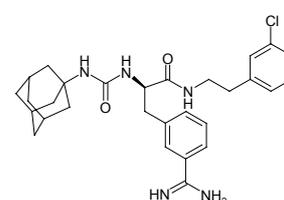
Ausbeute: 32 mg (76 %) (Rohprodukt), 6 mg (14 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (II): t_R 10 min; ESI-MS: $m/z = 488.4$ (M+H)⁺, ber. für C₂₉H₃₇N₅O₂: 487.6.

**(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-N-[2-(4-amino-phenyl)-ethyl]-propionsäureamid (12)**

Ausbeute: 42 mg (65 %) (Rohprodukt), 2 mg (4 %) (nach Reinigung) gelbes Pulver; HPLC (III): t_R 9.2 min; ESI-MS: $m/z = 503.4$ (M+H)⁺, ber. für C₂₉H₃₈N₆O₂: 502.7.

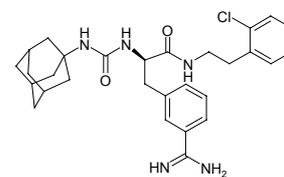
**(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-N-[2-(3-chlor-phenyl)-ethyl]-propionsäureamid (13)**

Ausbeute: 43 mg (65 %) (Rohprodukt), 3 mg (4 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (III): t_R 8.2 min; ESI-MS: $m/z = 522.4$ (M+H)⁺, ber. für C₂₉H₃₆ClN₅O₂: 521.



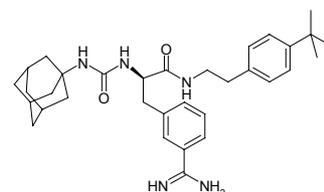
(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-N-[2-(2-chlor-phenyl)-ethyl]-propionsäureamid (14)

Ausbeute: 56 mg (84 %) (Rohprodukt), 4 mg (3 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (III): t_R 8.2 min; ESI-MS: $m/z = 522.4$ (M+H)⁺, ber. für C₂₉H₃₆ClN₅O₂: 521.



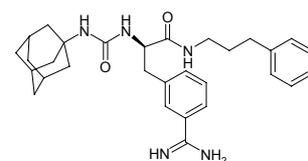
(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-N-[2-(4-tert-butyl-phenyl)-ethyl]-propionsäureamid (15)

Ausbeute: 54 mg (78 %) (Rohprodukt), 3 mg (4 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (III): t_R 9.3 min; ESI-MS: $m/z = 544.4$ (M+H)⁺, ber. für C₃₃H₄₅N₅O₂: 543.8.



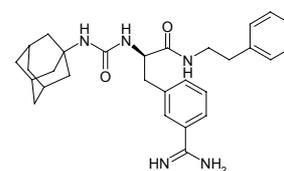
(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-N-[3-(phenyl)-propyl]-propionsäureamid (16)

Ausbeute: 109 mg (85 %) (Rohprodukt), 6 mg (4 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 3.2 min; ESI-MS: $m/z = 502.4$ (M+H)⁺, ber. für C₃₀H₃₉N₅O₂: 501.7.



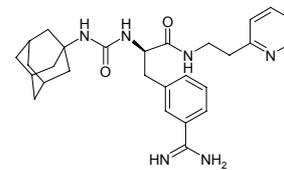
(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-N-(2-pyridin-4-yl-ethyl)-propionsäureamid (17)

Ausbeute: 75 mg (55 %) (Rohprodukt), 6 mg (4 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 1.8 min; ESI-MS: $m/z = 489.4$ (M+H)⁺, ber. für C₂₈H₃₆N₆O₂: 488.6.

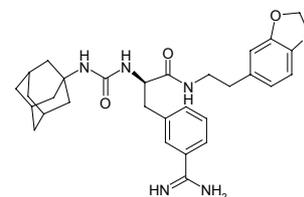


(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-N-(2-pyridin-2-yl-ethyl)-propionsäureamid (18)

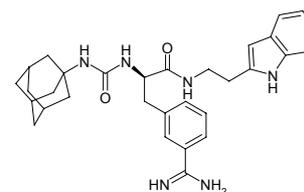
Ausbeute: 22 mg (38 %) (Rohprodukt), 2 mg (3 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 1.8 min; ESI-MS: $m/z = 489.4$ (M+H)⁺, ber. für C₂₈H₃₆N₆O₂: 488.6.

**(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-N-(2-benzo[1,3]dioxol-5-yl-ethyl)-propionsäureamid (19)**

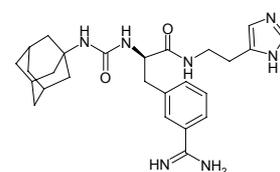
Ausbeute: 60 mg (45 %) (Rohprodukt), 5 mg (3 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 2.9 min; ESI-MS: $m/z = 532.4$ (M+H)⁺, ber. für C₃₀H₃₇N₅O₄: 531.7.

**(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-N-[2-(1H-indol-2-yl)-ethyl]-propionsäureamid (20)**

Ausbeute: 94 mg (70 %) (Rohprodukt), 3 mg (2 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 3 min; ESI-MS: $m/z = 527.4$ (M+H)⁺, ber. für C₃₁H₃₈N₆O₂: 526.7.

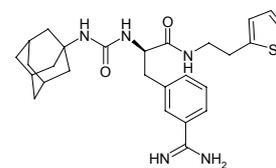
**(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-N-[2-(3H-imidazol-4-yl)-ethyl]-propionsäureamid (21)**

Ausbeute: 92 mg (75 %) (Rohprodukt), 4 mg (3 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 3 min; ESI-MS: $m/z = 478.4$ (M+H)⁺, ber. für C₂₆H₃₅N₇O₂: 477.6.



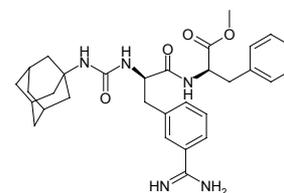
(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-N-(2-thiophen-2-yl-ethyl)-propionsäureamid (22)

Ausbeute: 112 mg (82 %) (Rohprodukt), 7 mg (4 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 3 min; ESI-MS: $m/z = 494.4$ (M+H)⁺, ber. für C₂₇H₃₅N₅O₂S: 493.7.



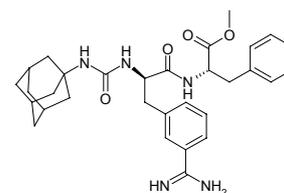
(R)-2-[(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-propionylamino]-3-phenyl-propionsäure-methylester (23)

Ausbeute: 215 mg (78 %) (Rohprodukt), 10 mg (4 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 3.1 min; ESI-MS: $m/z = 546.4$ (M+H)⁺, ber. für C₃₁H₃₉N₅O₄: 545.7.



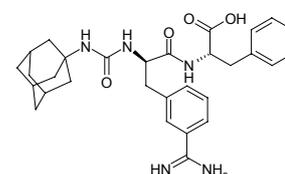
(S)-2-[(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-propionylamino]-3-phenyl-propionsäure-methylester (24)

Ausbeute: 159 mg (58 %) (Rohprodukt), 7 mg (2 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 3.1 min; ESI-MS: $m/z = 546.4$ (M+H)⁺, ber. für C₃₁H₃₉N₅O₄: 545.7.



(S)-2-[(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-propionylamino]-3-phenyl-propionsäure (25)

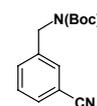
Die Methylesterverbindung (410 mg, 0.75 mmol) wurde in einem Lösemittelgemisch von THF und Wasser (1 : 1) vorgelegt. Anschließend wurde LiOH (63 mg, 1.5 mmol) in etwas Wasser



zugegeben. Nach 1 h wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 278 mg (69 %) (Rohprodukt), 11 mg (3 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 2.8 min; ESI-MS: $m/z = 532.4$ (M+H)⁺, ber. für C₃₀H₃₇N₅O₄: 531.7.

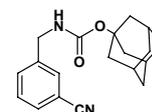
[3-(Di-*tert*-butyl-oxycarbonyl)-aminomethyl]-benzonitril (**38**)

Unter einer Argonatmosphäre wurde 3-Brom-methyl-benzonitril (1.2 g, 6.3 mmol) mit Natriumhydrid (200 mg, 7 mmol) in THF (10 ml) vorgelegt. Das Di-*tert*-butyl-iminodicarboxylat (1.5 g, 7 mmol) wurde in THF (10 ml) gelöst und zugetropft. Die Reaktionslösung wurde über Nacht gerührt und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Nach der Zugabe von etwas Diethylether wurde die organische Phase mit Wasser (1 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen sowie über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 1.9 g (90 %) beige Kristalle; HPLC (II): t_R 14.1 min; ESI-MS: $m/z = 333.4$ (M+H)⁺, ber. für C₁₈H₂₄N₂O₄: 332.4.



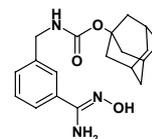
(3-Cyanobenzyl)-carbamatsäure-adamantan-1-yl-ester (**39**)

Die Verbindung **38** (900 mg, 3.7 mmol) wurde mittels 95 % aq. TFA in Wasser von den Boc-Schutzgruppen befreit. Der Rückstand wurde in DMF (10 ml) vorgelegt. Anschließend wurden erst TEA (1.5 ml, 11 mmol) und dann Adoc-F (730 mg, 3.7 mmol) zugegeben. Der pH wird mit TEA auf 9 gehalten. Nach 4 h wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in AcOEt aufgenommen. Anschließend wurde die organische Phase mit 5 % aq. KHSO₄ (2 x), Wasser (1 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 1.1 g (98 %) gelbliches Pulver; HPLC (II): t_R 13.3 min; ESI-MS: $m/z = 311.2$ (M+H)⁺, ber. für C₁₉H₂₂N₂O₂: 504.6.



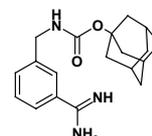
[3-(*N*-Hydroxycarbamimidoyl)-benzyl]-carbamatsäure-adamantan-1-yl-ester (**40**)

Die Cyano-Verbindung **39** (1.1 g, 3.7 mmol), Hydroxylamin Hydrochlorid (380 mg, 5.5 mmol) und KOH (510 mg, 9.1 mmol) wurden in EtOH (10 ml) über Nacht unter Rückfluss gekocht. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.1 M HCl gelöst und mit AcOEt gewaschen. Das Produkt wurde aus der wässrigen Phase mit wassergesättigtem *n*-Butanol (3 x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (2 x), gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der feste Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (HCCl₃/MeOH = 9 : 1 zu 4 : 1). Ausbeute: 423 mg (33 %) weißes Pulver; DC: HCCl₃/MeOH = 9 : 1, R_f 0.3; HPLC (II): t_R 9.1 min; ESI-MS: *m/z* = 344.2 (M+H)⁺, ber. für C₁₉H₂₅N₃O₃: 343.4.



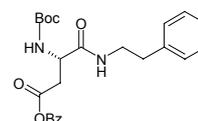
3-(Carbamimidoyl-benzyl)-carbamatsäure-adamantan-1-yl-ester (**27**)

Das Hydroxyamidin **40** (20 mg, 0.05 mmol) wurde mit 1 equiv HCl in MeOH/Wasser (9 : 1, 50 ml) vorgelegt und über Nacht hydriert. Der Hydrierungskatalysator wurde abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 15 mg (77 %) weißes Pulver; HPLC (II): t_R 9.3 min; ESI-MS: *m/z* = 328.2 (M+H)⁺, ber. für C₂₀H₂₅N₃O₂: 327.4.



(*S*)-3-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)-4-phenethylcarbonyl-butansäure-benzylester (**42**)

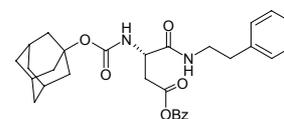
Zu einer mittels Eisbad gekühlten Suspension von Boc-Asp(OBz)-OSu (**41**) (1 g, 2.4 mmol) in CH₂Cl₂ (10 ml) wurde Phenethylamin (0.5 ml, 4.8 mmol) zugetropft. Die entstandene Lösung liess man auf RT erwärmen und wurde anschließend über Nacht gerührt. Nach



der Zugabe von etwas CH_2Cl_2 wurde die organische Phase mit 5 % aq. NaHCO_3 (1 x), 5 % aq. KHSO_4 (1 x) und Wasser (1 x) extrahiert. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 993 mg (98 %) gelbliches Pulver; HPLC (II): t_R 12.9 min; ESI-MS: $m/z = 427.2$ (M+H)⁺, ber. für $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$: 426.5.

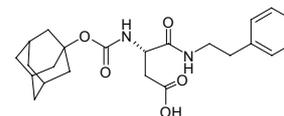
(S)-3-(Adamant-1-yl-oxycarbonylamino)-4-phenethylcarbonyl-butansäurebenzylester (43)

Die Verbindung **42** (1 g, 2.3 mmol) wurde mittels 95 % aq. TFA in Wasser von der Boc-Schutzgruppe befreit. Der Rückstand wurde in DMF (10 ml) vorgelegt. Anschließend wurden erst TEA (1 ml, 7 mmol) und dann Adoc-F (462 mg, 2.3 mmol) zugegeben. Der pH-Wert wird mit TEA auf 9 gehalten. Nach 4 h wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in AcOEt aufgenommen. Anschließend wurde die organische Phase mit 5 % aq. KHSO_4 (2 x), Wasser (1 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 1 g (88 %) gelbliches Pulver; HPLC (II): t_R 14.3 min; ESI-MS: $m/z = 505.4$ (M+H)⁺, ber. für $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5$: 504.6.



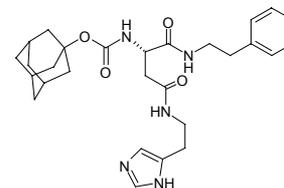
(S)-3-(Adamant-1-yl-oxycarbonylamino)-4-phenethylcarbonyl-butansäure (44)

Die Verbindung **43** (0.2 g, 0.4 mmol) wurde mit 1 equiv HCl in Isopropanol/Wasser (4 : 1, 50 ml) vorgelegt und über Nacht hydriert. Der Hydrierungskatalysator wurde abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 131 mg (79 %) weißes Pulver; HPLC (II): t_R 11.8 min; ESI-MS: $m/z = 415.2$ (M+H)⁺, ber. für $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$: 414.5.



(S)-3-(Adamant-1-yl-oxycarbonylamino)-4-phenethylcarbonyl-N-[2-(3H-imidazol-4-yl)-ethyl]-butansäureamid (28)

Zu einer Lösung von **44** (40 mg, 0.1 mmol) und HOBt (17 mg, 0.1 mmol) in DMF (3 ml) wurde TBTU (40 mg, 0.1 mmol) und Histamin (33 mg, 0.3 mmol) zugegeben. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in AcOEt

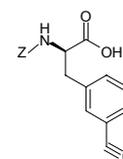


aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 5 % aq. NaHCO₃ (3 x), 0.1 M HCl (1 x), Wasser (1 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 17 mg (35 %) weißes Pulver; HPLC (II): t_R 9.7 min; ESI-MS: *m/z* = 508.4 (M+H)⁺, ber. für C₂₈H₃₇N₅O₄: 507.6.

6.3.1.2 Festphasensynthese

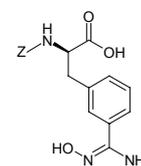
(*R*)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-3-(3-cyanophenyl)-propionsäure (**50**)

NaHCO₃ (0.2 g, 2.4 mmol) wurde in Wasser (5 ml) gelöst. Der Lösung wurden das TFA-Salz der (*R*)-2-Amino-3-(3-cyanophenyl)-propionsäure (0.5 g, 1.2 mmol), Dioxan (5 ml) und Z-OSu (0.3 g, 1.2 mmol) zugesetzt. Der pH wurde überprüft und mittels NaHCO₃ auf 8 eingestellt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in AcOEt aufgenommen und mit 0.1 M HCl (2 x) und Wasser (2 x) gewaschen. Die wässrige Phase wurde nochmals mit AcOEt extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (2 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 370 mg (96 %) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 3.1 min; ESI-MS: *m/z* = 325.2 (M+H)⁺, ber. für C₁₈H₁₆N₂O₄: 324.3.



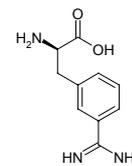
(*R*)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-3-[3-(*N*-hydroxycarbamimidoyl)-phenyl]-propionsäure (**51**)

Die Verbindung **50** (0.4 g, 1.2 mmol), Hydroxylamin Hydrochlorid (0.1 g, 1.8 mmol) und DIEA (0.6 ml, 3.6 mmol) wurden in EtOH (10 ml) über Nacht unter Rückfluss gekocht. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.1 M HCl gelöst und mit AcOEt gewaschen. Das Produkt wurde aus der wässrigen Phase mit wassergesättigtem *n*-Butanol (3 x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (2 x), gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 425 mg (91 %) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 1.8 min; ESI-MS: *m/z* = 358.2 (M+H)⁺, ber. für C₁₈H₁₉N₃O₅: 357.4.

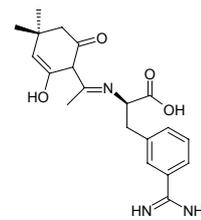


(R)-2-Amino-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-propionsäure (52)

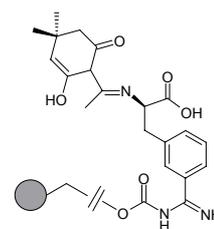
Die Verbindung **51** (0.4 g, 1.2 mmol) wurde mit 2 equiv HCl in Isopropanol/Wasser (4 : 1, 50 ml) vorgelegt und über Nacht bei 40 °C hydriert. Der Hydrierungskatalysator wurde abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 350 mg (76 %) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 1.4 min; ESI-MS: $m/z = 207.8$ (M+H)⁺, ber. für C₁₀H₁₃N₃O₂: 207.2.

**(R)-2-[1-(2-hydroxy-4,4-dimethyl-6-oxocyclohex-2-enyl)-eth-(E)-ylidenamino]-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-propionsäure (53)**

Die Aminoverbindung **52** (0.3 g, 1.2 mmol) wurde in DMF (5 ml) vorgelegt und langsam DIEA (0.3 ml, 1.6 mmol), Acetyldimedon (0.3 g, 1.8 mmol), und TMOF (0.6 ml, 6.3 mmol) zugegeben. Nach 4 h Rühren wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in CH₂Cl₂ (5 ml) aufgenommen. Es wurden PE (15 ml) zugegeben und der entstandene weiße Niederschlag abgesaugt. Ausbeute: 375 mg (74 %) graues Pulver; HPLC (V): t_R 1.6 min; ESI-MS: $m/z = 372.2$ (M+H)⁺, ber. für C₂₀H₂₅N₃O₄: 371.4.

**(R)-2-[1-(2-hydroxy-4,4-dimethyl-6-oxocyclohex-2-enyl)-eth-(E)-ylidenamino]-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-propionsäure, harzgebunden (54)**

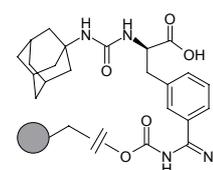
Zur Synthese am Harz wurde ein *p*-Nitrophenylcarbonat-Wang-Harz (**45**) (Belegung: 0.6 mmol/g, 767 mg, 0.5 mmol) gequollen. TEA (1.3 ml, 9.2 mmol) und das Amidin **53** (375 mg, 0.9 mmol) wurden mit DMF (1 ml) als Lösemittel zugegeben und über Nacht geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde vom Harz abgetrennt und wie folgt gewaschen: Waschen mit DMF (6 x 1 min), Waschen mit MeOH (6 x 1 min), Waschen mit CH₂Cl₂ (6 x 1 min) und Waschen mit Diethylether (6 x 1 min).



Testabspaltung: HPLC (V): t_R 1.6 min; ESI-MS: $m/z = 372.2$ (M+H)⁺, ber. für C₂₀H₂₅N₃O₄: 371.4.

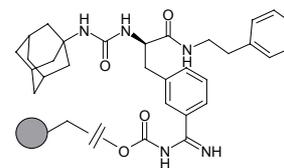
(R)-2-(3-Adamant-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-propionsäure, harzgebunden (55)

Das Harz **54** (50 mg, 0.03 mmol) wurde gequollen, die Dde-Schutzgruppe abgespalten und gewaschen. Anschließend wurden Adamantylisocyanat (22 mg, 0.12 mmol), DIEA (31 mg, 0.24 mmol) und eine katalytische Menge DMAP mit DMF (1 ml) als Lösemittel zugegeben und für 3 h geschüttelt. Die Reaktionsprozedur wurde noch 2 x wiederholt (3 x 3 h). Das Reaktionsgemisch wurde abgetrennt und das Harz gewaschen. Testabspaltung: HPLC (V): t_R 2 min; ESI-MS: $m/z = 385.2$ (M+H)⁺, ber. für C₂₁H₂₇N₄O₃: 384.5.



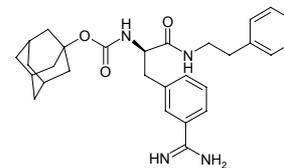
(R)-2-(Adamant-1-yl-oxycarbonylamino)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-N-(phenethyl)-propionsäureamid, harzgebunden (56)

Das Harz **55** (50 mg, 0.03 mmol) wurde gequollen und Phenethylamin (30 μ l, 0.24 mmol) und PyBOP (62 mg, 0.12 mmol) mit DMF (1 ml) als Lösemittel zugegeben und für 4 h geschüttelt. Die Reaktionsprozedur wurde noch 2 x wiederholt (3 x 3 h). Das Reaktionsgemisch wurde abgetrennt und das Harz gewaschen. Testabspaltung: HPLC (V): t_R 2.9 min; ESI-MS: $m/z = 489.4$ (M+H)⁺, ber. für C₂₉H₃₆N₄O₃: 488.3.



(R)-2-(Adamant-1-yl-oxycarbonylamino)-3-(3-carbamimidoyl-phenyl)-N-(phenethyl)-propionsäureamid (11)

Die Abspaltung erfolgte mittels TFA und CH₂Cl₂ (1 : 1, 1 h).
Gesamtausbeute: 2 mg (14 %) weißes Pulver; HPLC (V):
t_R 2.9 min; ESI-MS: $m/z = 489.4$ (M+H)⁺, ber. für C₂₉H₃₆N₄O₃:
488.3.



6.3.2 Röntgenstrukturanalyse des Faktor Xa/Inhibitor 11-Komplexes

Die Röntgenkristallstruktur-Analyse des Faktor Xa/Inhibitor *WX-FX4* (**11**)-Komplexes wurde in Kooperation mit der Abteilung Prof. Huber (Arbeitsgruppe Prof. Bode, Abteilung für Strukturforschung, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) durchgeführt.

Hierfür wurde Des-Gla-Faktor X durch chymotryptische Spaltung aus Faktor X produziert und nach Abspaltung des Fragments L1-L44 aus dem humanen Plasma isoliert (im folgenden wurde für die Reste der katalytischen Domäne die Chymotrypsin-Nummerierung verwendet). Leichte Kettenreste hingegen werden durch ihre Sequenznummer und mit dem Prefix "L" angegeben). Des-Gla-Faktor X wurde mittels „Russel's viper venom factor X activator“ aktiviert, wonach Des-Gla-Faktor Xa nach Brandstetter *et al.* aufgereinigt wurde.^[37]

Orthorhombische Kristalle der Raumgruppe $P2_12_12_1$ (Tabelle 6-1) wurden, wie bei Brandstetter *et al.* beschrieben, bei 20 °C, mit 0.1 M MES/OH bei pH 5.8, 10 mM CaCl_2 , 18 % Polyethylenglykol 6000 als Fällungsmittel und 10 mM Inhibitor mittels der Dampfdiffusionmethode im hängenden Tropfen vergrößert. Nach kurzem Transfer der Kristalle in Polyfluorether der Firma *Lancaster* (Mühlheim) wurde ein Einkristall in einem Stickstoffstrom bei 100 K schockgefroren. Ein kompletter, nativer Datensatz mit einer Auflösung bis 2.22 Å wurde von dem Einkristall aufgenommen. Hierfür wurde ein Drehanodengenerator (Rigaku, RU 200) mit graphitmonochromatisierter CuK_α -Strahlung ($\lambda = 1.5418$ Å), mit einem MAR 345 „image plate“-Detektor, MAR Research (Hamburg), verwendet. Diese Daten wurden mit dem MOSFLM package prozessiert und mit SCALA skaliert.^[167] Für die Verfeinerung von Orientierung und Position der Faktor Xa Moleküle im Kristall wurden Rotations- and Translationsuchläufe mit AMORE durchgeführt.^[168] Hierfür wurden die Daten mit einer Auflösung von 25 bis 3.5 Å und das isomorphe Des-Gla-factor Xa Modell von Brandstetter *et al.* verwendet.^[37] Die kristallographische Verfeinerung wurde in zahlreichen Zyklen mit dem Programm O von Jones *et al.* durchgeführt und darüber hinaus wurde die „conjugate gradient“-Methode und die „simulated annealing“-Methode unter Verwendung der CNS Standardprotokolle nach Brünger *et al.* benutzt,

wobei die Zielparameter von Engh und Huber eingesetzt wurden.^[169-171] Diese Prozedur führte rasch zu einem verlässlichen Modell. In abschließenden Modellverfeinerungszyklen wurden Wassermoleküle an stereochemischen sinnvollen Stellen eingesetzt und mit Verfeinerungsprotokollen des individuellen, isotropen B-Faktors verbessert. 10 % aller Reflexe wurden von der Verfeinerung ausgeschlossen, um den freien R-Faktor zu ermitteln. Der finale R-Faktor und der freie R-Faktor betragen 26.1 % und 30.5 %, für alle Daten bei einer Auflösung bis 2.22 Å. Die EGF1-Domäne ist hierbei nicht sichtbar. Die Hauptkette der EGF2-Domäne und der folgenden Verknüpfungen ist durch Leu-88L bis Glu-138L (in den Koordinaten mit Leu-1L bis Glu-51L bezeichnet) definiert. Die Hauptkette der katalytischen Domäne wurde durch eine zutreffende Elektronendichte von dem N-terminalen Ile-16 bis zum Thr-244 (Chymotrypsin-Nomenklatur) wiedergegeben. Die Koordinaten wurden in der Brookhaven Protein Data Bank hinterlegt und erhielten den ID code **1KYE**.

Statistische Daten	
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Moleküle in der asymmetrischen Einheit	1
Zellkonstanten	
A	56.48 Å
B	72.51 Å
C	78.33 Å
α, β, γ	90.00°
Auflösung	34.5-2.22 Å
Unabhängige Reflexe	15 846
Vollständigkeit (letzte Auflösungsschale)	94.5 %
I/ σ (I)	14.3
Verfeinerungsstatistik	
Nicht-Wasserstoff-Protein Atome	2225
Inhibitoratome	35
Lösemittelatome	124
Test set size	10 %
Auflösungsbereich	25.0-2.22 Å
R-Faktor (letzte Auflösungsschale)	26.1 %
Freier R-Faktor (letzte Auflösungsschale)	30.5 %
rms Abweichungen von Idealwerten	
Bindungslänge	0.006 Å
Bindungswinkel	1.3°
Ramachandran plot	
Meist bevorzugte Region	84.9 %
bevorzugte Region	13.5 %
Freigegebene Region	1.2 %

Tabelle 6-1: Kristallographische Daten der Röntgenstruktur des Faktor Xa/Inhibitor 11-Komplexes.

6.3.3 Studien zur *in vivo*-Eliminierung von 11 und 25

Die Bestimmung der Eliminationskinetik der entsprechenden Derivate wurde im Zentrum für vaskuläre Biologie und Medizin, Erfurt, in der Arbeitsgruppe von Dr. Jörg Stürzebecher durchgeführt. Hierfür wurden weibliche Wistar-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 240 – 300 g eingesetzt. Nach dem Narkotisieren der Tiere (Ethylurethan 1.25 g/kg Körpergewicht i.p.) erfolgte die Präparation der am Hals gelegenen Arteria carotis. Ein in diesem Gefäß fixierter Katheter ermöglichte die Blutentnahme zu festgelegten Zeiten.

In den Versuchen wurde die Substanz in einer Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht verabreicht, das Applikationsvolumen betrug 0.5 ml/Tier. Die Applikationslösung (in 0.9 % NaCl) wurde dort im Labor hergestellt und steril filtriert.

Aus der katheterisierten Arteria carotis communis der Ratte wurden jeweils 500 µl Zitratblut im Verhältnis 1 : 10 zu folgenden Zeitpunkten entnommen: 2, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 und 270 Minuten nach der Applikation. Der entstandene Blutverlust wurde unmittelbar nach der Entnahme durch physiologische Kochsalzlösung kompensiert. Zitratplasma wurde durch Zentrifugation des Blutes bei 3800 U/min für 10 min bei 4 °C erhalten. Die Plasmakonzentration der Substanzen wurde anschließend mittels HPLC bestimmt.

6.3.4 *In vivo*-Untersuchung zur anti-metastatischen Wirkung von **11**

Die Untersuchung der inhibitorischen Wirkung des synthetischen hochspezifischen Faktor Xa (FXa)-Inhibitors *WX-FX4* (**11**) auf die experimentelle Metastasierung in der Maus wurde im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Klinikum Rechts der Isar, Technische Universität München, in der Arbeitsgruppe von PD. Dr. Krüger von Ingo Banke durchgeführt. Die Methoden und Ergebnisse sind aus der Dissertation von Ingo Banke entnommen (Banke, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die antimetastatische Effizienz des FXa-Inhibitors **11** wurde in zwei unterschiedlichen Tumormodellen untersucht: zum einen im *syngen*en T-Zell-Lymphommodell (Dauer: 7 Tage ^[89]) mit immunkompetenten Mäusen, welches modelltypisch in die Leber metastasiert, und zum anderen im *xenogen*en Fibrosarkommodell (Dauer: 23 Tage) mit immundefizienten Nacktmäusen, welches modelltypisch in die Lunge metastasiert. Im T-Zell-Lymphommodell wurden 5000 murine *lacZ*-markierte T-Zell-Lymphomzellen in die Schwanzvene von immunkompetenten Mäusen, und im Fibrosarkommodell 1.000.000 humane *lacZ*-markierte Fibrosarkomzellen in die Schwanzvene von immundefizienten Nacktmäusen gespritzt. Der Inhibitor **11** wurde täglich frisch in 100 % EtOH aufgelöst, und in sterilem und pyrogen-freiem Wasser auf eine Konzentration von 5% (v/v) EtOH verdünnt. Die 2 mal tägliche i.p. Injektionsbehandlung (Applikationsvolumen = 200 µl/pro Behandlung) mit einer Tagesdosis von 3 mg/kg/Tag erstreckte sich je nach Modell (siehe oben) über einen Zeitraum von 7 bzw. 23 Tagen. An Tag 7 bzw. 23 wurden die Mäuse geopfert, die Metastasenzahlen in der Leber (T-Zell-Lymphommodell) bzw. Lunge (Fibrosarkommodell) evaluiert, auf statistisch signifikante Unterschiede überprüft und als Balkendiagramme dargestellt.

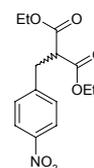
6.4 uPA-Inhibitoren

6.4.1 Synthesevorschriften

6.4.1.1 Synthese in Lösung

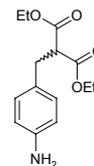
2-(4-Nitro-benzyl)-malonsäure-diethylester (79)

Unter einer Argonatmosphäre wurde Natriumhydrid (0.6 g, 15 mmol) in DME (10 ml) vorgelegt und mittels eines Eisbades auf 0 °C gekühlt. Zu dieser weißen Suspension wurde der Malonsäure-diethylester (3.2 g, 20 mmol) langsam zugetropft. Nach Ende der Gasentwicklung wurde das 4-Nitrobenzylbromid (2.2 g, 10 mmol) in DME (5 ml) gelöst und ebenfalls langsam zugetropft. Die entstandene orange Suspension erwärmte man auf RT und rührte weiter für 1 h. Die Reaktionslösung wurde in einen Scheidetrichter gefüllt, mit gesättigter NH₄Cl (20 ml) versetzt und die wässrige Phase mit AcOEt (3 x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (2 x) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Hexan/Diethylether umkristallisiert. Ausbeute: 2 g (67 %) weiße Kristalle; HPLC (II): t_R 12 min; ESI-MS: m/z = 296.2 (M+H)⁺, ber. für C₁₄H₁₇NO₆: 295.3.



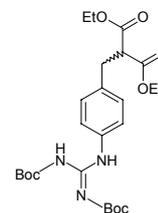
2-(4-Amino-benzyl)-malonsäure-diethylester (80)

Die Nitroverbindung **79** (2 g, 6.2 mmol) wurde mit 1 equiv HCl in EtOH/Wasser (8 : 1, 90 ml) vorgelegt und über Nacht hydriert. Der Hydrierungskatalysator wurde abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 1.7 g (90 %) beiges Pulver; HPLC (II): t_R 6.9 min; ESI-MS: m/z = 266 (M+H)⁺, ber. für C₁₄H₁₉NO₄: 265.3.

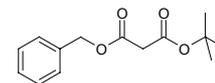


2-{4-[*N,N'*-Bis-(*tert*-butyloxycarbonyl)-guanidino-benzyl]}-malonsäure-diethylester (82)

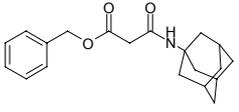
Die Aminoverbindung **80** (1 g, 3.3 mmol), *N,N'*-Di-*tert*-Butyloxycarbonyl-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin (1 g, 3.3 mmol) und TEA (464 μ l, 3.3 mmol) wurden in CH_2Cl_2 (5 ml) vorgelegt und kurz auf 40 °C erwärmt. Die Reaktionslösung wurde bei RT über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in MTB-Ether aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 0.1 M HCl (2 x), 5 % aq. NaHCO_3 (1 x), Wasser (1 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 1.6 g (96 %) beige Kristalle; HPLC (II): t_R 13.6 min; ESI-MS: $m/z = 508.2$ ($\text{M}+\text{H}^+$), ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_4$: 507.6.

**Malonsäure-benzylester-*tert*-butylester (91)**

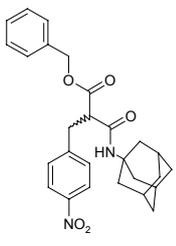
Malonsäure-*tert*-butylester (10 mg, 0.6 mmol) wurde in DMF (4 ml) gelöst. TEA (86 μ l, 0.6 mmol) wurde zugegeben und anschließend Benzylbromid (74 μ l, 0.6 mmol). Die Reaktionslösung wurde für 1 h gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in AcOEt aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 0.1 M HCl (2 x), 5 % aq. NaHCO_3 (2 x), Wasser (1 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 141 mg (91 %) farbloses Öl; HPLC (II): t_R 13.6 min; ESI-MS: $m/z = 251.2$ ($\text{M}+\text{H}^+$), ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$: 250.3.



***N*-Adamantan-1-yl-malonsäure-benzylester (99)**

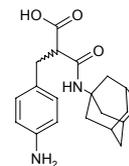
Unter einer Argonatmosphäre wurde 2-Cyanoessigsäurebenzylester (2 g, 11.4 mmol) in CH₂Cl₂ (5 ml) gelöst.  Trifluormethansäureanhydrid (1.9 ml, 11.4 mmol) und Adamantol (1.7 g, 11.4 mmol) wurden in CH₂Cl₂ (10 ml) gelöst und langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 2 h gerührt. Anschließend wurde Wasser zugegeben (10 ml) und für 1 h weitergerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in AcOEt aufgenommen. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung (2 x) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. 1.6 g oranges Öl wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/AcOEt = 1 : 2), R_f 0.6. Ausbeute: 0.8 g (21 %) oranges Öl; HPLC (III): t_R 12.4 min; ESI-MS: *m/z* = 328 (M+H)⁺, ber. für C₂₀H₂₅NO₃: 327.5.

***N*-Adamantan-1-yl-2-(4-Nitro-benzyl)-malonsäure-benzylester (103)**

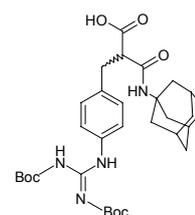
Unter einer Argonatmosphäre wurde Natriumhydrid (108 mg, 6.8 mmol) in DME (10 ml) vorgelegt und mittels eines Eisbades auf 0 °C gekühlt. Zu dieser weißen Suspension wurde **99** (1.5 g, 4.5 mmol) langsam zugetropft. Nach Ende der Gasentwicklung wurde das 4-Nitro-benzylbromid (1 g, 4.5 mmol) in DME (5 ml) gelöst und ebenfalls langsam zugetropft. Die entstandene orange Suspension lies man auf RT erwärmen und weiter für 1 h rühren. Die Reaktionslösung wurde in einen Scheidetrichter gefüllt, mit gesättigter NH₄Cl (5 ml) versetzt und die wässrige Phase mit AcOEt (3 x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (2 x) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Hexan/Diethylether umkristallisiert. Ausbeute: 1.9 g (91 %) weiße Kristalle; HPLC (III): t_R 14.5 min; ESI-MS: *m/z* = 463.4 (M+H)⁺, ber. für C₂₇H₃₀N₂O₅: 462.6. 

***N*-Adamantan-1-yl-2-(4-Amino-benzyl)-malonsäure (104)**

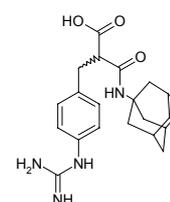
Die Nitroverbindung **103** (842 mg, 1.8 mmol) wurde mit 2 equiv HCl in DME/Wasser (10 : 1, 80 ml) vorgelegt und über Nacht hydriert. Der Hydrierungskatalysator wurde abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 0.6 g (88 %) weißes Pulver; HPLC (II): t_R 5.7 min; ESI-MS: $m/z = 343.2$ (M+H)⁺, ber. für C₂₀H₂₆N₂O₃: 342.4.

***N*-Adamantan-1-yl-2-{4-[*N,N'*-Bis-(*tert*-butyloxycarbonyl)-guanidino-benzyl]}-malonsäure (105)**

Die Aminoverbindung **104** (0.3 mg, 0.8 mmol), *N,N'*-Di-*tert*-Butyloxycarbonyl-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin (241 mg, 0.8 mmol) und TEA (217 μ l, 1.6 mmol) wurden in CH₂Cl₂ (1 ml) vorgelegt und kurz auf 40 °C erwärmt. Die Reaktionslösung wurde bei RT über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in AcOEt aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 0.1 M HCl (2 x), 5 % aq. NaHCO₃ (1 x), Wasser (1 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 423 mg (93 %) gelbliches Pulver; HPLC (II): t_R 13 min; ESI-MS: $m/z = 585.2$ (M+H)⁺, ber. für C₃₁H₄₄N₄O₇: 584.7.

***N*-Adamantan-1-yl-2-(4-guanidino-benzyl)-malonsäure (70)**

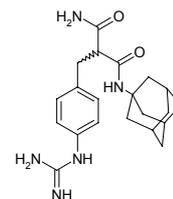
Die Bis-Boc-geschützte Verbindung **105** (10 mg, 0.02 mmol) wurde in 7 M HCl in Dioxan (1 ml) vorgelegt und mit aufgesetztem Trockenrohr (CaCl₂) über Nacht entschützt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 4 mg (75 %) (Rohprodukt), 1 mg (14 %) (nach



Reinigung) weißes Pulver; HPLC (III): t_R 6.2 min; ESI-MS: $m/z = 385.2$ (M+H)⁺, ber. für C₂₁H₂₈N₄O₃: 384.5.

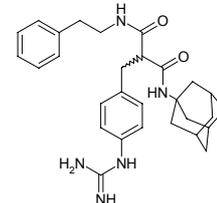
***N*-Adamantan-1-yl-2-(4-guanidino-benzyl)-malonsäureamid (71)**

Die Bis-Boc-geschützte Verbindung **105** (150 mg, 0.26 mmol) wurde in CH₂Cl₂ (2 ml) gelöst. Es wurden HOBT*NH₃-Komplex (46 mg, 0.31 mmol) und EDCI (59 mg, 0.31 mmol) zugegeben und über Nacht gerührt. Danach wurde CH₂Cl₂ (15 ml) zugegeben und die organische Phase mit 5 % aq. NaHCO₃ (1 x), 0.1 M HCl (2 x), Wasser (1 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Anschließend wurde der Rückstand in 7 M HCl in Dioxan (1 ml) gelöst und mit aufgesetztem Trockenrohr (CaCl₂) entschützt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 98 mg (89 %) (Rohprodukt), 9 mg (8 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 2.2 min; ESI-MS: $m/z = 384.2$ (M+H)⁺, ber. für C₂₁H₂₈N₄O₃: 383.5.



***N*-Adamantan-1-yl-2-(4-guanidino-benzyl)-*N'*-phenethyl-malonsäureamid (72)**

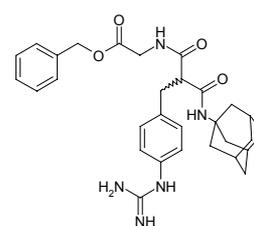
Die Bis-Boc-geschützte Verbindung **105** (40 mg, 0.07 mmol) wurde in CH₂Cl₂ (1 ml) gelöst. Es wurden PyBOP (39 mg, 0.08 mmol) und Phenethylamin (17 μ l, 0.14 mmol) zugegeben und über Nacht gerührt. Danach wurde CH₂Cl₂ (10 ml) zugegeben und die organische Phase mit 5 % aq. NaHCO₃ (1 x), 0.1 M HCl (2 x), Wasser (1 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Anschließend wurde der Rückstand in 7 M HCl in Dioxan (1 ml) gelöst und mit aufgesetztem Trockenrohr (CaCl₂) entschützt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 26 mg (75 %) (Rohprodukt), 2 mg (5 %) (nach



Reinigung) weißes Pulver; HPLC (III): t_R 8.4 min; ESI-MS: $m/z = 488.4$ (M+H)⁺, ber. für C₂₉H₃₇N₅O₂: 487.6.

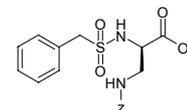
***N*-Adamantan-1-yl-*N'*-glycyl-benzylester-2-(4-guanidino-benzyl)-malonsäureamid (73)**

Die Bis-Boc-geschützte Verbindung **105** (40 mg, 0.07 mmol) wurde in CH₂Cl₂ (1 ml) gelöst. Es wurden PyBOP (39 mg, 0.08 mmol) und Glycinbenzylester (23 mg, 0.07 mmol) zugegeben und über Nacht gerührt. Danach wurde CH₂Cl₂ (10 ml) zugegeben und die organische Phase mit 5 % aq. NaHCO₃ (1 x), 0.1 M HCl (2 x), Wasser (1 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Anschließend wurde der Rückstand in 7 M HCl in Dioxan (1 ml) gelöst und mit aufgesetztem Trockenrohr (CaCl₂) entschützt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 27 mg (67 %) (Rohprodukt), 2 mg (5 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (III): t_R 8.5 min; ESI-MS: $m/z = 532.4$ (M+H)⁺, ber. für C₃₀H₃₇N₅O₄: 531.7.



(*R*)-3-Benzyloxycarbonylamino-2-phenylmethansulfonylamino-propionsäure (108)

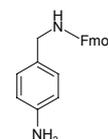
Boc-2-D-3-Z-Diaminopropionsäure Dicyclohexylamin (2 g, 3.9 mmol) wurde in AcOEt aufgenommen und mit KHSO₄ (0.6 g, 4.7 mmol) in Wasser gewaschen und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Die freie Säure wurde mittels 95 % aq. TFA 1 h von der Boc-Schutzgruppe befreit und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ (10 ml) gelöst, DIEA (2 ml, 11.8 mmol) und anschließend Trimethylchlorsilan (1 ml, 7.9 mmol) zugegeben und für 1 h unter Rückfluss gekocht. Der pH wurde dabei mittels Zugabe von DIEA auf 8 gehalten. Danach wurde die Lösung mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt,



Benzylsulfonsäurechlorid (753 mg, 3.9 mmol) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in AcOEt aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 0.1 M HCl (3 x), Wasser (1 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde aus PE/AcOEt umkristallisiert. Ausbeute: 1.4 g (90 %) weiße Kristalle; HPLC (V): t_R 3.1 min; ESI-MS: *m/z* = 393 (M+H)⁺, ber. für C₁₈H₂₀N₂O₆S: 392.4.

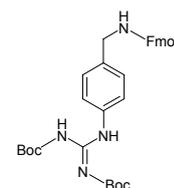
4-Fluorenylmethyloxycarbonylaminomethyl-anilin (114)

Unter einer Argonatmosphäre wurde Fmoc-OSu (13.8 ml, 41 mmol) in Acetonitril (50 ml) vorgelegt. Zu der weißen Suspension wurden 4-Aminomethylanilin (4.6 ml, 41 mmol) und TEA (5.7 ml, 41 mmol) in Acetonitril/DMF (8 : 1, 45 ml) langsam zugetropft. 15 min nach dem vollständigen Zutropfen wurde die Lösung eingeeengt und das Produkt mittels Wasser gefällt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und mit Trifluorethanol/MTB-Ether (1 : 1) gewaschen. Ausbeute: 10.7 g (76 %) grauweißes Pulver; HPLC (IV): t_R 6.3 min; ESI-MS: *m/z* = 345.2 (M+H)⁺, ber. für C₂₂H₂₀N₂O₂: 344.4.



4-[*N,N'*-Bis-(*tert*-butyloxycarbonyl)-guanidino-benzyl]-(fluorenylmethyloxycarbonyl)-amin (115)

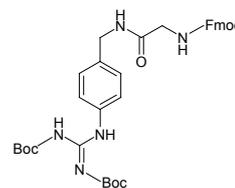
Das Anilinderivat **114** (2 g, 5.8 mmol), *N,N'*-Di-*tert*-Butyloxycarbonyl-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin (1.8 g, 5.8 mmol) und TEA (815 µl, 5.8 mmol) wurden in CH₂Cl₂ (5 ml) vorgelegt und kurz auf 40 °C erwärmt. Die Reaktionslösung wurde bei RT über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in MTB-Ether aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 0.1 M HCl (2 x), 5 % aq. NaHCO₃ (1 x), Wasser (1 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO₄



getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 3.1 g (92 %) weißes Pulver; HPLC (IV): t_R 9.2 min; ESI-MS: $m/z = 587.5$ (M+H)⁺, ber. für C₃₃H₃₈N₄O₆: 586.7.

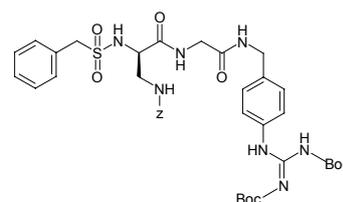
4-[*N,N'*-Bis-(*tert*-butyloxycarbonyl)-guanidino-benzyl]-(*fluorenylmethoxy-carbonyl*)-glycinamid (116)

Die Verbindung **115** (2 g, 3.4 mmol) wurde mit 20 % Diethylamin in DMF 1 h entschützt und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Fmoc-Glycin (1 g, 3.4 mmol), PyBOP (2.1 g, 4 mmol) und DIEA (1.2 ml, 6.8 mmol) wurden in DMF (5 ml) vorgelegt. Der Rückstand wurde in etwas DMF gelöst und der Lösung zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in AcOEt aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 5 % aq. NaHCO₃ (3 x), 0.1 M HCl (1 x), Wasser (1 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 1.8 g (83 %) weißes Pulver; HPLC (IV): t_R 10.6 min; ESI-MS: $m/z = 635.6$ (M+H)⁺, ber. für C₃₅H₄₁N₅O₇: 634.7.



{4-[*N,N'*-Bis-(*tert*-butyloxycarbonyl)-guanidino-benzyl]-glycin-2-yl}-(*R*)-3-benzyl-oxycarbonylamino-2-phenylmethansulfonylamino-propionsäureamid (117)

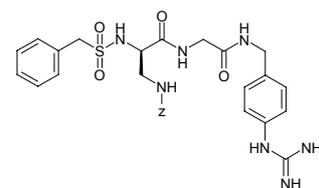
Das Guanidinderivat **116** (772 mg, 1.8 mmol) wurde mit 20 % Diethylamin in DMF 1 h entschützt und das Lösemittel im Vakuum entfernt. (*R*)-3-Benzyl-oxycarbonylamino-2-phenylmethansulfonyl-amino-propionsäure (719 mg, 1.8 mmol) wurde mit PyBOP (1 g, 2 mmol) in DMF (2 ml) vorgelegt. Danach wurde 1 equiv DIEA (313 μ l, 1.8 mmol) zugegeben und für 5 min voraktiviert. Das entschützte Guanidinderivat und 1 equiv DIEA (313 μ l, 1.8 mmol)



wurden in etwas DMF gelöst zugegeben und über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in AcOEt aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 5 % aq. NaHCO₃ (3 x), 0.1 M HCl (1 x), Wasser (1 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das farblose Öl wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/AcOEt = 1 : 1), R_f 0.5. Ausbeute: 1.1 g (78 %) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 4.2 min; ESI-MS: *m/z* = 796.2 (M+H)⁺, ber. für C₃₈H₄₉N₇O₁₀S: 795.9.

[(4-Guanidino-benzyl)-glycin-2-yl]-(R)-3-benzyloxycarbonylamino-2-phenylmethansulfonylamino-propionsäureamid (76)

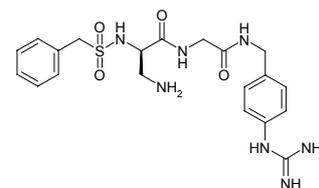
Die Bis-Boc-geschützte Verbindung **117** (190 mg, 0.02 mmol) wurde in 7 M HCl in Dioxan (1 ml) vorgelegt und mit aufgesetztem Trockenrohr (CaCl₂) über Nacht entschützt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt.



Ausbeute: 121 mg (85 %) (Rohprodukt), (50 mg gereinigt) 3 mg (6 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 2.4 min; ESI-MS: *m/z* = 596.2 (M+H)⁺, ber. für C₂₈H₃₃N₇O₆S: 595.7.

[(4-Guanidino-benzyl)-glycin-2-yl]-(R)-3-amino-2-phenylmethansulfonylamino-propionsäureamid (75)

Die Verbindung **76** (56 mg, 0.09 mmol) wurde mit 2 equiv HCl in *tert*-BuOH/Wasser (4 : 1, 40 ml) vorgelegt und über Nacht hydriert. Der Hydrierungskatalysator wurde abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Ausbeute: 40 mg

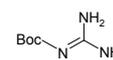


(95 %) (Rohprodukt), 2 mg (4 %) (nach Reinigung) weißes Pulver; HPLC (V): t_R 1.1 min; ESI-MS: *m/z* = 462.4 (M+H)⁺, ber. für C₂₆H₂₇N₇O₄S: 461.6.

6.4.1.2 Festphasensynthese

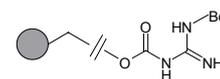
(*tert*-Butyloxycarbonyl)-guanidin (**121**)

Guanidinium-Hydrochlorid (20 g, 0.21 mol) wurden in 4 M NaOH (60 ml) gelöst und mittels eines Eisbades auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde Boc₂O (26.7 g, 0.17 mol) in Dioxan (45 ml) langsam zugetropft und anschließend über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der entstandene Niederschlag mit Wasser (100 ml) im Ultraschallbad gewaschen. Der Niederschlag wurde abgesaugt und mit Diethylether gewaschen. Ausbeute: 17.6 g (66 %) grauweißes Pulver; DC: CHCl₃/MeOH/AcOH = 90 : 8 : 2, R_f 0.5; ESI-MS: *m/z* = 160.2 (M+H)⁺, ber. für C₆H₁₃N₃O₂: 159.2.

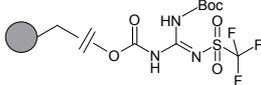


(*tert*-Butyloxycarbonyl)-guanidin, harzgebunden (**122**)

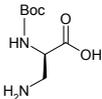
Zur Synthese am Harz wurde ein *p*-Nitrophenylcarbonat-Wang-Harz (**45**) (4 g, Belegung: 0.6 mmol/g, 4.4 mmol) gequollen. TEA (1.7 ml, 12 mmol), **121** (1.9 g, 12 mmol) und 0.1 equiv DMAP wurde mit DMF (1 ml) als Lösemittel zugegeben und für 24 h geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde vom Harz abgetrennt und wie folgt gewaschen: Waschen mit DMF (6 x 1 min), Waschen mit MeOH (6 x 1 min), Waschen mit CH₂Cl₂ (6 x 1 min) und Waschen mit Diethylether (6 x 1 min). Testabspaltung: grauweißes Pulver; DC: CHCl₃/MeOH/AcOH = 90 : 8 : 2, R_f 0.5; ESI-MS: *m/z* = 160.2 (M+H)⁺, ber. für C₆H₁₃N₃O₂: 159.2. FT-IR (ATR-Zelle): 1944, 1732, 1657, 1623, 1602, 1583, 1543, 1513, 1493, 1452, 1370, 1285, 1244, 1153, 1120, 1041, 1028 cm⁻¹.



***N*-Diaminomethylen-trifluoromethansulfonamid, harzgebunden (123)**

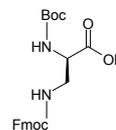
Unter einer Argonatmosphäre wurde das Harz **122** (theoretische Belegung: 0.6 mmol/g, 3.7 g, 4 mmol) in CH₂Cl₂ (30 ml)  gequollen und mittels Isopropanol/Trockeneis auf –78 °C gekühlt. Danach wurde TEA (2.8 ml, 20 mmol) zugetropft und für weitere 15 min geschüttelt. Im Anschluss wurde Trifluormethansäure Anhydrid (3.3 ml, 20 mmol) zugetropft und danach in einem Eisbad auf 0 °C erwärmt und für 5 h geschüttelt. Das Harz wurde abgesaugt und ausgiebig mit MeOH sowie CH₂Cl₂ gewaschen. FT-IR (ATR-Zelle): 1944, 1794, 1740, 1692, 1623, 1601, 1584, 1554, 1513, 1493, 1452, 1396, 1373, 1195, 1171, 1129, 1099, 1029, 1071, 1025, 1014 cm⁻¹.

***(R)*-2-*tert*-Butyloxycarbonylamino-3-amino-propionsäure (110)**

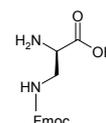
Zu einer Suspension von Boc-D-Asn-OH (**109**) (5 g, 21.5 mmol) in  Acetonitril (29 ml), AcOEt (29 ml) und Wasser (14.5 ml) wurde bei 10 °C unter Rühren portionsweise Iodobenzol-Diacetat (PIDA) (8.3 g, 25.8 mmol) zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf 15 °C erwärmt und für weitere 30 min gerührt, worauf eine klare Lösung entstand, aus der langsam ein Niederschlag ausfiel. Nach 4.5 h bei RT wurde mittels eines Eisbades auf 0 °C abgekühlt, der Niederschlag abgesaugt, mit eiskaltem AcOEt (1 x) und Diethylether (2 x) gewaschen. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Ausbeute: 2.9 g (68 %) weiße Kristalle; DC: CHCl₃/Acetonitril/80 % AcOH = 5 : 2 : 1, R_f 0.1, CHCl₃/MeOH/AcOH/Wasser = 60 : 40 : 5 : 10, R_f 0.7; ESI-MS: *m/z* = 205 (M+H)⁺, ber. für C₈H₁₆N₂O₄: 204.2.

(R)-2-tert-Butyloxycarbonylamino-3-fluorenylmethyloxycarbonylamino-propionsäure (111)

Zu einer Lösung von Natriumcarbonat (1.8 g, 17.2 mmol) in Wasser (30 ml), wurde **110** (3.2 g, 15.7 mmol) und darauf folgend Dioxan (10 ml) zugegeben. Die Lösung wurde auf 5 °C gekühlt und mit Fmoc-OSu (4.8 g, 14.3 mmol) in Dioxan (40 ml) versetzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung bei RT über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum eingengt und AcOEt zugegeben. Die wässrige Phase wurde nochmals mit AcOEt extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (2 x) und gesättigter NaCl-Lösung (1 x) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand aus PE/MTB-Ether umkristallisiert. Ausbeute: 6.1 g (99 %) weiße Kristalle; DC: CHCl₃/Acetonitril/80 % AcOH = 5 : 2 : 1, R_f 0.8, CHCl₃/MeOH/AcOH/Wasser = 60 : 40 : 5 : 10, R_f 0.9; ESI-MS: *m/z* = 427 (M+H)⁺, ber. für C₂₃H₂₆N₂O₆: 426.5.

**(R)-3-Fluorenylmethyloxycarbonylamino-2-amino-propionsäure (111b)**

Das Edukt **111** (2 g, 3.9 mmol) wurde in Dioxan (25 ml) aufgenommen und 6 N HCl/Dioxan (60 ml) zugegeben. Nach 2 h fiel das Produkt aus und das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in MTB-Ether dirigiert, abgesaugt, mit MTB-Ether und PE gewaschen sowie über KOH getrocknet. Ausbeute: 4.3 g (90 %) weiße Kristalle; DC: CHCl₃/Acetonitril/80 % AcOH = 5 : 2 : 1, R_f 0.1, CHCl₃/MeOH/AcOH/Wasser = 60 : 40 : 5 : 10, R_f 0.75; ESI-MS: *m/z* = 327 (M+H)⁺, ber. für C₁₈H₁₉N₂O₄: 326.2.



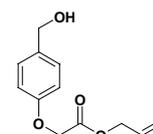
(*R*)-3-Fluorenylmethyloxycarbonylamino-2-phenylmethansulfonylamino-propionsäure (113)

Unter einer Argonatmosphäre wurde das Hydrochlorid **111b** (2 g, 5.5 mmol) in CH₂Cl₂ (10 ml) mit Trimethylcyanosilan (2 ml, 16.5 mmol) vorgelegt und mittels eines Ölbades auf 38 °C erwärmt bis eine klare Lösung entstand. Anschließend wurde diese mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt und das Benzylsulfonsäurechlorid (1 g, 5.5 mmol) als Feststoff zugegeben. Darauf folgend wurde DIEA (950 µl, 5.5 mmol) zugetropft und die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in AcOEt/Wasser aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 5 % aq. KHSO₄ (2 x) und Wasser (4 x) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde aus Diisopropylether/AcOEt umkristallisiert. Ausbeute: 2.1 g (80 %) weiße Kristalle; HPLC (II): t_R 14.1 min; ESI-MS: *m/z* = 481.4 (M+H)⁺, ber. für C₂₅H₂₄N₂O₆S: 480.5.



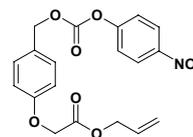
(4-Hydroxymethyl-phenoxy)-essigsäureallylester (136)

Zu einer mittels eines Eisbades auf 0 °C gekühlten Lösung von 4-Hydroxymethyl-phenoxy-essigsäure (5 g, 27.6 mmol) in CH₂Cl₂ (40 ml), Wasser (48 ml) und NaHCO₃ (4.8 g, 57.1 mmol) wurden Allylbromid (7.4 ml, 84.7 mmol) und anschließend Aliquat 336 (33 g) zugegeben. Die Lösung wurde auf 35 °C erwärmt und über Nacht gerührt. Die entstandenen Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ (1 x) nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das so erhaltene Öl wurde säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/AcOEt = 7 : 3 zu 4 : 3). Ausbeute: 4.8 g (79 %) weiße Kristalle; DC: Hexan/AcOEt = 1 : 1, R_f 0.1; HPLC (V): t_R 2.4 min; ESI-MS: *m/z* = 205.2 (M+H)⁺-18, ber. für C₁₂H₁₄O₄: 222.2.

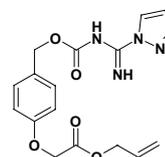


[4-(4-Nitro-phenoxy-carbonyloxymethyl)-phenoxy]-essigsäureallylester (138)

Zu einer Lösung von **136** (4.5 g, 20 mmol) und Chlorameisensäure-nitrophenylester (4 g, 20 mmol) in CH₂Cl₂ (45 ml) wurde Pyridin (8 ml) zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht gerührt, die organische Phase mit 5 % aq. KHSO₄ (2 x) und Wasser (2 x) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das so erhaltene Öl wurde säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/AcOEt = 7 : 3), R_f 0.4. Ausbeute: 5 g (65 %) weiße Kristalle; HPLC (V): t_R 4.3 min; ESI-MS: m/z = 338.4 (M+H)⁺-50, ber. für C₁₉H₁₇NO₈: 387.3; Smp: 52-54 °C.

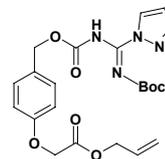
**[4-(Imino-pyrazol-1-yl-imino-methyl-carbamoyloxymethyl)-phenoxy]-essigsäureallylester (139b)**

Eine Lösung aus Pyrazol-1-carboxamidin Hydrochlorid (1.7 g, 11.6 mmol) in Wasser (5 ml) und 1M NaOH (11.6 ml, 11.6 mmol) wurde mit einem Lösemittelgemisch (40 ml) aus THF und MTB-Ether (3 : 1) extrahiert (2 x). Die organische Phase wurde über Mg₂SO₄ getrocknet und auf 4-(4-Nitro-phenoxy-carbonyloxymethyl)-phenoxy]-essigsäure-allylester (2.2 g, 5.8 mmol) gegossen. Nach 3 h wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der feste Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/AcOEt/TEA = 50 : 25 : 5). Die vereinigten Fraktionen wurden aus PE/MTB-Ether umkristallisiert. Ausbeute: 1.7 g (81 %) gelbe Kristalle; HPLC (V): t_R 4.2 min; ESI-MS: m/z = 359.2 (M+H)⁺, ber. für C₁₇H₁₈N₄O₅: 358.4; Smp: 93-95 °C.



{4-[Imino-pyrazol-1-yl-(*tert*-butoxycarbonylimino)-methyl-carbamoyloxy-methyl]-phenoxy}-essigsäure-allyester (140b)

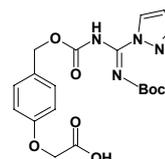
Unter einer Argonatmosphäre wurde **139b** (1.7 g, 4.8 mmol) und Boc_2O (3.1 g, 14.1 mmol) in THF (25 ml) vorgelegt und anschließend bei RT portionsweise Natriumhydrid (460 mg, 9.6 mmol) zugegeben.



Nach 15 min Rühren wurde die Lösung für 1 h unter Rückfluss gekocht. Die abgekühlte Suspension wurde über Celite abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der feste Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/AcOEt/AcOH = 60 : 30 : 1). Ausbeute: 2 g (91 %) farbloses Öl; DC: Hexan/AcOEt/AcOH = 60 : 30 : 1, R_f 0.35; ESI-MS: $m/z = 459.4$ (M+H)⁺, ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_7$: 458.5.

{4-[Imino-pyrazol-1-yl-(*tert*-butoxycarbonylimino)-methyl-carbamoyloxy-methyl]-phenoxy}-essigsäure (141b)

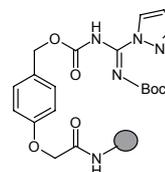
Unter einer Argonatmosphäre wurde **140b** (2 g, 4.4 mmol) in DMF (17 ml) vorgelegt und AcOH (3.1 ml, 52.3 mmol), *N*-Methylmorpholin (1.4 ml, 12.6 mmol) und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (150 mg, 0.13 mmol)



zugegeben. Die Lösung wurde bei RT über Nacht gerührt und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in AcOEt (100 ml) aufgenommen und anschließend mit eiskalter, 16 % aq. Trinatrium-Citrat Lösung (45 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde nochmals mit AcOEt (50 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Mg_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CHCl}_3/\text{Acetonitril}/\text{AcOH} = 80 : 20 : 2$). Das resultierende Öl enthielt etwas *N*-Allyl-Derivat. Ausbeute: 1.3 g (71 %) zähes Öl; DC: $\text{CHCl}_3/\text{Acetonitril}/\text{AcOH} = 80 : 20 : 2$, R_f 0.3, Cyclohexan/ $\text{CHCl}_3/\text{AcOH} = 45 : 45 : 10$, R_f 0.2; HPLC (V): t_R 3.2 min; ESI-MS: $m/z = 419.2$ (M+H)⁺, ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_7$: 418.4.

Pyrazol-Guanidinierungsreagenz, harzgebunden (143)

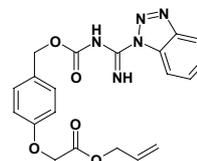
Das Nova Syn TG-Amino-Harz (Belegung: 0.29 mmol/g, 1 g, 0.29 mmol) wurde gequollen, mit einer Lösung von 5 % HOBt in DMF geschüttelt und anschließend gewaschen. Danach wurden **141b**



(485 mg, 1.16 mmol), HOBt (157 mg, 1.16 mmol), DIC (179 μ l, 1.16 mmol) mit DMF (5 ml) als Lösemittel zugegeben und über Nacht geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde abgetrennt und das Harz gewaschen. Testabspaltung: HPLC (V): t_R 0.6 min; ESI-MS: $m/z = 111$ (M+H)⁺, ber. für C₄H₆N₄: 110.1.

[4-(Benzotriazol-1-yl-imino-methyl-carbamoyloxymethyl)-phenoxy]-essigsäureallylester (139)

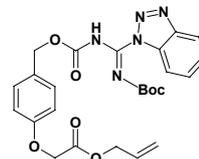
Unter einer Argonatmosphäre wurde **138** (2.4 g, 6.1 mmol) und Benzotriazol-1-carboxamidin Tosylat (3.7 g, 11 mmol) in DMF



sowie danach portionsweise DMAP (134 mg, 1.1 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde für 7 h gerührt und anschließend das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in AcOEt aufgenommen und die organische Phase mit 2.5 % aq. KHSO₄ (2 x) und Wasser (2 x) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der feste Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/AcOEt/CHCl₃/TEA = 500 : 125 : 125 : 50 über 300 : 175 : 175 : 50 bis 100 : 375 : 175 : 50). Die vereinigten Fraktionen wurden noch aus PE/AcOEt umkristallisiert. Ausbeute: 1.8 g (72 %) weiße Kristalle; DC: Hexan/AcOEt/TEA = 50 : 25 : 5, R_f 0.4; HPLC (V): t_R 4 min; ESI-MS: $m/z = 410.4$ (M+H)⁺, ber. für C₂₀H₁₉N₅O₅: 409.4; Smp: 141-143 °C.

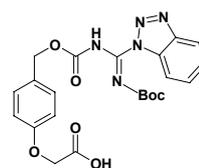
{4-[Benzotriazol-1-yl-(*tert*-butoxycarbonylimino)-methyl-carbamoyloxymethyl]-phenoxy}-essigsäure-allylester (140)

Unter einer Argonatmosphäre wurde **139** (409 mg, 1 mmol) in CH₂Cl₂ (12 ml) vorgelegt und anschließend Boc₂O (262 mg, 0.17 mmol) zugegeben sowie danach portionsweise DMAP (98 mg, 0.8 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde für 6 h gerührt, mit CH₂Cl₂ verdünnt, anschließend mit 2.5 % aq. KHSO₄ (1 x) und Wasser (2 x) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der feste Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/AcOEt = 3 : 1 bis 2 : 1). Das resultierende Öl enthielt etwas Bis-Boc-Derivat. Ausbeute: 335 mg (66 %) farbloses Öl; DC: Hexan/AcOEt = 3 : 1, R_f 0.3, Cyclohexan/CHCl₃/AcOH = 70 : 25 : 5, R_f 0.2; HPLC (V): t_R 4.4 min; ESI-MS: *m/z* = 510.4 (M+H)⁺, ber. für C₂₅H₁₇N₅O₇: 509.5.



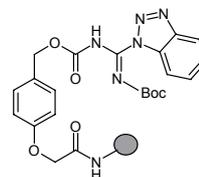
{4-[Benzotriazol-1-yl-(*tert*-butoxycarbonylimino)-methyl-carbamoyloxymethyl]-phenoxy}-essigsäure (141)

Unter einer Argonatmosphäre wurde **140** (306 mg, 0.6 mmol) in CH₂Cl₂ (8 ml) vorgelegt und AcOH (420 µl, 7 mmol), *N*-Methylmorpholin (192 µl, 1.7 mmol) und Pd(PPh₃)₄ (70 mg, 0.06 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht gerührt, mit CH₂Cl₂ verdünnt, anschließend mit Wasser (2 x) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der feste Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (CHCl₃/Acetonitril/AcOH = 80 : 20 : 2). Das resultierende, zähe Öl enthielt etwas *N*-Allyl-Derivat. Ausbeute: 190 mg (67 %) zähes Öl; DC: CHCl₃/Acetonitril/AcOH = 80 : 20 : 2, R_f 0.2, Cyclohexan/CHCl₃/AcOH = 45 : 45 : 1, R_f 0.3; HPLC (V): t_R 3.2 min; ESI-MS: *m/z* = 470.2 (M+H)⁺, ber. für C₂₂H₁₃N₅O₇: 469.5.



Benzotriazol-Guanidinilierungsreagenz, harzgebunden (142)

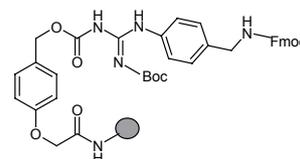
Das Nova Syn TG-Amino-Harz (Belegung: 0.29 mmol/g, 310 mg, 0.09 mmol) ließ man quellen. Danach wurde es mit einer Lösung von 5 % HOBt in DMF geschüttelt und anschließend gewaschen. Danach wurden



{4-[Benzotriazol-1-yl-(*tert*-butoxycarbonylimino)-methyl-carbamoyl-oxy-methyl]-phenoxy}-essigsäure (190 mg, 0.09 mmol), HOBt (54 mg, 0.4 mmol), DIC (62 μ l, 0.4 mmol) mit DMF (1 ml) als Lösemittel zugegeben und über Nacht geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde abgetrennt und das Harz gewaschen. Testabspaltung: HPLC (V): t_R 1.1 min; ESI-MS: $m/z = 162.2$ (M+H)⁺, ber. für C₇H₇N₅: 161.2.

Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von *N*-Fmoc-(4-amino)-benzylamin, harzgebunden (124, 124b)

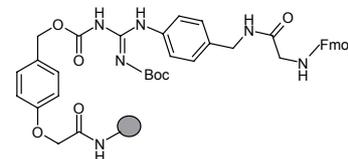
Das entsprechende pyrazol- (**143**) bzw. benzotriazolbasierende Guanidinilierungsharz (**142**) (1 equiv) ließ man quellen. Danach wurde *N*-Fmoc-(4-amino)-benzylamin (10 equiv) mit



dem Lösemittel zugegeben und über Nacht geschüttelt. Falls der Ansatz auf 60 °C erwärmt werden sollte, wurde ein 5 ml Wheaton Screw-top V-Vail in einem Ölbad geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde abgetrennt und das Harz gewaschen. Testabspaltung: HPLC (V): t_R 2 min; ESI-MS: $m/z = 165.2$ (M+H)⁺, ber. für C₈H₁₂N₄: 164.2. Die erhaltenen Belegungen sind im Kapitel 4.8.3.2, Abbildung 4-25 gegenübergestellt.

[(4-Guanidino-benzylcarbamoyl)-methyl]-carbamoyl-9H-fluoren-9-yl-methylester, harzgebunden (147)

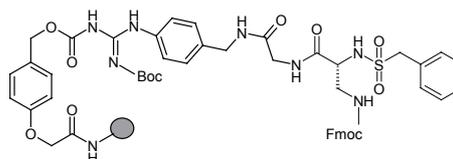
Das Harz **124** (Belegung: 0.09 mmol/g, 117 mg, 0.11 mmol) ließ man quellen. Danach wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und das Harz gewaschen. Anschließend wurden



Fmoc-Glycin (12 mg, 0.04 mmol), HOBt (7 mg, 0.04 mmol), HBTU (16 mg, 0.04 mmol) und DIEA (7 μ l, 0.08 mmol) mit DMF (0.5 ml) als Lösemittel zugegeben und für 2 h geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde abgetrennt und das Harz gewaschen. Testabspaltung: HPLC (II): t_R 10.9 min; ESI-MS: $m/z = 444.2$ (M+H)⁺, ber. für C₂₆H₂₆N₄O₃: 443.5.

[(4-Guanidino-benzylcarbamoyl)-methyl]-carbamoyl-9H-fluoren-9-yl-methylester, harzgebunden (148)

Das Harz **147** (Belegung: 0.09 mmol/g, 0.11 mmol) ließ man quellen. Danach wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und das Harz



gewaschen. Anschließend wurden (*R*)-3-Fluorenylmethyloxycarbonyl-amino-2-phenylmethan-sulfonylamino-propionsäure (12 mg, 0.04 mmol), HOBt (7 mg, 0.04 mmol), HBTU (16 mg, 0.04 mmol) und DIEA (70 μ l, 0.08 mmol) mit DMF (0.5 ml) als Lösemittel zugegeben und für 2 h geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde abgetrennt und das Harz gewaschen. Testabspaltung: HPLC (II): t_R 11.3 min; ESI-MS: $m/z = 684.4$ (M+H)⁺, ber. für C₃₅H₃₇N₇O₆S: 683.8.

7 Literaturverzeichnis

- [1] A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner, *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, **1998**.
- [2] H. J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign. Der Weg zum Arzneimittel*, Spektrum Akademischer Verlag, **1996**.
- [3] L. Schechter und A. Berger, *On size of active site in proteases. 1. Papain*, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **1967**, 27, 157-162.
- [4] R. Huber, D. Kukla, W. Bode, P. Schwager, K. Bartels, Deisenhofer, J. Steigema, W., *Structure of complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin-inhibitor. 2. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution*, *J. Mol. Biol.*, **1974**, 89, 73-101.
- [5] W. Bode, D. Turk, J. Stürzebecher, *Geometry of binding of the benzamide-based and arginine-based inhibitors N- α -(2-naphthyl-sulfonyl-glycyl)-DL-para-amidinophenylalanyl-piperidine (NAPAP) and (2R,4R)-4-methyl-1-[N- α -(3-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-8-quinolinesulphonyl)-l-arginyl]-2-piperidine carboxylic-acid (MQPA) to human α -thrombin - X-ray crystallographic determination of the NAPAP-trypsin complex and modeling of NAPAP-thrombin and MQPA-thrombin*, *Eur. J. Biochem.*, **1990**, 193, 175-182.
- [6] T. Matsuzaki, C. Sasaki, C. Okumura, H. Umeyama, *X-ray-analysis of a thrombin inhibitor-trypsin complex*, *J. Biochem.*, **1989**, 105, 949-952.
- [7] D. W. Banner, P. Hadvary, *Crystallographic analysis at 3.0-Å resolution of the binding to human thrombin of 4 active site-directed inhibitors*, *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 20085-20093.
- [8] D. Turk, J. Stürzebecher, W. Bode, *Geometry of binding of the N- α -tosylated piperidides of meta-amidino-phenylalanine, para-amidino-phenylalanine and para-guanidino-phenylalanine to thrombin and trypsin - X-ray crystal-structures of their trypsin complexes and modeling of their thrombin complexes*, *FEBS Lett.*, **1991**, 287, 133-138.
- [9] M. T. Stubbs, R. Huber, W. Bode, *Crystal-structures of factor Xa specific inhibitors in complex with trypsin - structural grounds for inhibition of factor Xa and selectivity against thrombin*, *FEBS Lett.*, **1995**, 375, 103-107.
- [10] B. Gabriel, M. T. Stubbs, A. Bergner, J. Hauptmann, W. Bode, J. Stürzebecher, L. Moroder, *Design of benzamide-type inhibitors of factor Xa*, *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 4240-4250.

- [11] M. Renatus, W. Bode, R. Huber, J. Stürzebecher, M. T. Stubbs, *Structural and functional analyses of benzamidine-based inhibitors in complex with trypsin: Implications for the inhibition of factor Xa, tPA, and urokinase*, J. Med. Chem., **1998**, *41*, 5445-5456.
- [12] S. Sperl, A. Bergner, J. Stürzebecher, V. Magdolen, W. Bode, L. Moroder, *Urethanyl-3-amidinophenylalanine derivatives as inhibitors of factor Xa. X-ray crystal structure of a trypsin/inhibitor complex and modeling studies*, Biol. Chem., **2000**, *381*, 321-329.
- [13] B. Gabriel, *Strukturbasierendes Design von Benzamidinen als Inhibitoren von Faktor Xa*, Dissertation an der technischen Universität München, **1998**.
- [14] I. Banke, Unveröffentlichte Ergebnisse, Dissertation in Vorbereitung an der technischen Universität München, **2003**.
- [15] S. Sperl, *Design und Synthese niedermolekularer Inhibitoren der Serinproteasen uPA und FXa*, Dissertation an der technischen Universität München, **2000**.
- [16] S. Sperl, U. Jacob, N. A. de Prada, J. Stürzebecher, O. G. Wilhelm, W. Bode, V. Magdolen, R. Huber, L. Moroder, *(4-Aminomethyl)phenylguanidine derivatives as nonpeptidic highly selective inhibitors of human urokinase*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **2000**, *97*, 5113-5118.
- [17] R. F. Schmidt, *Physiologie des Menschen*, 28., korr. u. aktualisierte Aufl. 2000, **2000**.
- [18] L. Stryer, *Biochemie*, 1. nachkorrigierter Nachdruck 1999 der 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, **1996**.
- [19] J. M. Fevig, R. R. Wexler, *Anticoagulants: Thrombin and factor Xa inhibitors*, Ann. Rep. Med. Chem., Vol 34, **1999**, *34*, 81-100.
- [20] S. A. V. Raghavan, M. Dikshit, *Recent advances in the status and targets of antithrombotic agents*, Drugs of the Future, **2002**, *27*, 669-683.
- [21] J. Hirsh, *Heparin - reply*, N. Engl. J. Med., **1991**, *325*, 1585-1586.
- [22] J. Hirsh, S. M. Bates, *The emerging role of low-molecular-weight heparin in cardiovascular medicine*, Progress in Cardiovascular Diseases, **2000**, *42*, 235-246.
- [23] E. Young, B. Cosmi, J. Weitz, J. Hirsh, *Comparison of the nonspecific-binding of unfractionated heparin and low-molecular-weight heparin (enoxaparin) to plasma-proteins*, Thromb. Haemost., **1993**, *70*, 625-630.
- [24] J. Hirsh, *Oral anticoagulant drugs - reply*, N. Engl. J. Med., **1992**, *326*, 68-69.

- [25] M. Elg, D. Gustafsson, S. Carlsson, *Antithrombotic effects and bleeding time of thrombin inhibitors and warfarin in the rat*, *Thromb. Res.*, **1999**, *94*, 187-197.
- [26] J. Hirsh, J. E. Dalen, D. Deykin, L. Poller, *Oral anticoagulants - mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range*, *Chest*, **1992**, *102*, S312-S326.
- [27] J. Hirsh, *Current anticoagulant therapy - unmet clinical needs*, *Thromb. Res.*, **2003**, *109*, S1-S8.
- [28] S. Elodi, K. Varadi, *Optimization of conditions for the catalytic effect of the factor-IXa - factor-VIII complex - probable role of the complex in the amplification of blood-coagulation*, *Thromb. Res.*, **1979**, *15*, 617-629.
- [29] F. Al Obeidi, J. A. Ostrem, *Factor Xa inhibitors by classical and combinatorial chemistry*, *DDT*, **1998**, *3*, 223-231.
- [30] U. Sinah, *Synthetic inhibitors of coagulation factor Xa*, *Exp. Opin. Invest. Drugs*, **1999**, 567-573.
- [31] A. G. G. Turpie, *Pharmacology of the low-molecular-weight heparins*, *Am. Heart J.*, **1998**, *135*, S329-S335.
- [32] C. Hougie, E. M. Barrow, J. B. Graham, *Stuart clotting defect. 1. Segregation of an hereditary hemorrhagic state from the heterogeneous group heretofore called stable factor (SPCA, proconvertin, factor-VII) deficiency*, *J. Clin. Invest.*, **1957**, *36*, 485-496.
- [33] J. B. Graham, E. M. Barrow, C. Hougie, *Stuart clotting defect. 2. Genetic aspects of a new hemorrhagic state*, *J. Clin. Invest.*, **1957**, *36*, 497-503.
- [34] F. Duckert, P. Fluckiger, M. Matter, F. Koller, *Clotting factor-X - physiologic and physico-chemical properties*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1955**, *90*, 17-22.
- [35] C. M. Jackson, T. F. Johnson, D. J. Hanahan, *Studies on bovine factor X. 1. Large-scale purification of bovine plasma protein possessing factor X activity*, *Biochem.*, **1968**, *7*, 4492-4505.
- [36] S. P. Leytus, D. C. Foster, K. Kurachi, E. W. Davie, *Gene for human factor-X - a blood-coagulation factor whose gene organization is essentially identical with that of factor-IX and protein-C*, *Biochem.*, **1986**, *25*, 5098-5102.
- [37] H. Brandstetter, A. Kuhne, W. Bode, R. Huber, W. vonderSaal, K. Wirthensohn, R. A. Engh, *X-ray structure of active site-inhibited clotting factor Xa - Implications for drug design and substrate recognition*, *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 29988-29992.

- [38] M. J. Heeb, J. Rosing, H. M. Bakker, J. A. Fernandez, G. Tans, J. H. Griffin, *Protein-S binds to and inhibits factor-Xa*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **1994**, *91*, 2728-2732.
- [39] S. S. Mao, *Factor Xa inhibitors*, Perspectives in Drug Discovery and Design, **1994**, 423-430.
- [40] J. Dodt, *Anticoagulatory substances of bloodsucking animals - from hirudin to hirudin mimetics*, Angew. Chem.-Int. Ed., **1995**, *34*, 867-880.
- [41] F. Markwardt, *Antithrombotic agents from hematophagous animals*, Clin. Appl. Thromb./Hemo., **1996**, *2*, 75-82.
- [42] C. T. Dunwiddie, L. Waxman, G. P. Vlasuk, P. A. Friedman, *Purification and characterization of inhibitors of blood-coagulation factor Xa from hematophagous organisms*, Proteolytic Enzymes in Coagulation, Fibrinolysis, and Complement Activation, Part B, **1993**, *223*, 293-312.
- [43] J. Hauptmann, B. Kaiser, *Anticoagulant and antithrombotic action of the factor-Xa inhibitor antistasin (ATS)*, Thromb. Res., **1993**, *71*, 169-174.
- [44] C. T. Dunwiddie, M. P. Neepser, E. M. Nutt, L. Waxman, D. E. Smith, K. J. Hofmann, P. K. Lumma, V. M. Garsky, G. P. Vlasuk, *Site-directed analysis of the functional domains in the factor Xa inhibitor tick anticoagulant peptide - identification of 2 distinct regions that constitute the enzyme recognition sites*, Biochem., **1993**, *32*, 3196-3196.
- [45] S. P. Jordan, S. S. Mao, S. D. Lewis, J. A. Shafer, *Reaction pathway for inhibition of blood-coagulation factor-Xa by tick anticoagulant peptide*, Biochem., **1992**, *31*, 5374-5380.
- [46] M. Rigbi, M. Orevi, A. Eldor, *Platelet aggregation and coagulation inhibitors in leech saliva and their roles in leech therapy*, Seminars in Thrombosis and Hemostasis, **1996**, *22*, 273-278.
- [47] R. Kornowski, A. Eldor, M. M. Werber, N. Ezov, E. Zwang, A. Nimrod, A. Chernine, A. Finkelstein, A. Panet, S. Laniado, G. Keren, *Enhancement of recombinant tissue-type plasminogen activator thrombolysis with a selective factor Xa inhibitor derived from the leech *Hirudo medicinalis*: Comparison with heparin and hirudin in a rabbit thrombosis model*, Coronary Artery Disease, **1996**, *7*, 903-909.
- [48] M. Cappello, G. P. Vlasuk, P. W. Bergum, S. Huang, P. J. Hotez, *Ancylostoma-caninum anticoagulant peptide - a hookworm-derived inhibitor of human coagulation-factor Xa*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **1995**, *92*, 6152-6156.

- [49] P. Stanssens, P. W. Bergum, Y. Gansemans, L. Jespers, Y. Laroche, S. Huang, S. Maki, J. Messens, M. Lauwereys, M. Cappello, P. J. Hotez, I. Lasters, G. P. Vlasuk, *Anticoagulant repertoire of the hookworm *Ancylostoma caninum**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **1996**, *93*, 2149-2154.
- [50] K. R. Stark, A. A. James, *A factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti**, Exp. Parasit., **1995**, *81*, 321-331.
- [51] R. Apitz-Castro, S. Beguin, A. Tablante, F. Bartoli, J. C. Holt, H. C. Hemker, *Purification and partial characterization of draculin, the anticoagulant factor present in the saliva of vampire bats (*desmodus-rotundus*)*, Thromb. Haemost., **1995**, *73*, 94-100.
- [52] B. Y. Zhu, R. M. Scarborough, *Factor Xa inhibitors: Recent advances in anticoagulant agents*, Ann. Rep. Med. Chem., Vol 35, **2000**, *35*, 83-102.
- [53] J. Stürzebecher, U. Stürzebecher, H. Vieweg, G. Wagner, J. Hauptmann, F. Markwardt, *Synthetic inhibitors of bovine factor-Xa and thrombin comparison of their anticoagulant efficiency*, Thromb. Res., **1989**, *54*, 245-252.
- [54] T. Hara, A. Yokoyama, Y. Morishima, S. Kunitada, *Species-differences in anticoagulant and anti-Xa activity of DX-9065a, a highly selective factor Xa inhibitor*, Thromb. Res., **1995**, *80*, 99-104.
- [55] B. Y. Zhu, R. M. Scarborough, Curr. Opin. Cardiovascular, Pulmonary and Renal Invest. Drugs, **1999**, *1*, 63.
- [56] J. S. Bostwick, R. Bentley, S. Morgan, K. Brown, V. Chu, W. R. Ewing, A. P. Spada, H. Pauls, M. H. Perrone, C. T. Dunwiddie, R. J. Leadley, *RPR120844, a novel, specific inhibitor of coagulation factor Xa inhibits venous thrombosis in the rabbit*, Thromb. Haemost., **1999**, *81*, 157-160.
- [57] R. J. Leadley, S. R. Morgan, R. Bentley, J. S. Bostwick, C. J. Kasiewski, C. Heran, W. Chu, K. Brown, P. Moxey, W. R. Ewing, H. Pauls, A. P. Spada, M. H. Perrone, C. T. Dunwiddie, *Pharmacodynamic activity and antithrombotic efficacy of RPR120844, a novel inhibitor of coagulation factor Xa*, J. Cardiovasc. Pharmacol., **1999**, *34*, 791-799.
- [58] D. J. P. Pinto, M. J. Orwat, S. G. Wang, E. Amparo, J. R. Pruitt, K. A. Rossi, R. S. Alexander, J. M. Fevig, J. Cacciola, P. Y. S. Lam, R. M. Knabb, P. C. Wong, R. R. Wexler, *The discovery of a novel pyrazole SN429, a highly potent inhibitor of coagulation factor Xa*, Abstracts of Papers of the Am. Chem. Soc., **1999**, *217*, 1156-1156.
- [59] M. L. Quan, A. Y. Liauw, C. D. Ellis, J. R. Pruitt, D. J. Carini, L. L. Bostrom, P. P. Huang, K. Harrison, R. M. Knabb, M. J. Thoolen, P. C. Wong, R. R. Wexler, *Design and synthesis of isoxazoline derivatives as factor Xa inhibitors. 1*, J. Med. Chem., **1999**, *42*, 2752-2759.

- [60] M. L. Quan, C. D. Ellis, A. Y. Liauw, R. S. Alexander, R. M. Knabb, G. Lam, M. R. Wright, P. C. Wong, R. R. Wexler, *Design and synthesis of isoxazoline derivatives as factor Xa inhibitors. 2*, J. Med. Chem., **1999**, *42*, 2760-2773.
- [61] J. Preston und A. Stocker, WO 9909027, **1999**.
- [62] J. Maignan, J. P. Guilloteau, V. Mikol, Y. M. Choi-Sledeski, M. R. Becker, W. R. Klein, W. R. Ewing, H. W. Pauls, und A. P. Spada, 218th ACS National Meeting, New Orleans, Aug.22-26. 218th ACS National Meeting, New Orleans, Aug.22-26. **1999**.
- [63] W. He, B. Hanney, M. R. Myers, A. P. Spada, K. Brown, D. Colussi, V. Chu, *Nonbenzamidine compounds as selective factor Xa inhibitors*, Bioorg. Med. Chem. Lett., **2000**, *10*, 1737-1739.
- [64] G. Wagner, B. Voigt, F. Markwardt, und J. Stürzebecher, *Verfahren zur Herstellung von N α -aryl- bzw. N α -heteroarylsulfonylaminoacylierten Amidinophenylalaninen*, DD 1555954B1, **1981**.
- [65] J. I. Levin, E. Turos, S. M. Weinreb, *An alternative procedure for the aluminum-mediated conversion of esters to amides*, Synth. Comm., **1982**, *12*, 989-993.
- [66] R. S. Garigipati, *An efficient conversion of nitriles to amidines*, Tetrahedron Lett., **1990**, *31*, 1969-1972.
- [67] U. E. W. Lange, B. Schafer, D. Baucke, E. Buschmann, H. Mack, *A new mild method for the synthesis of amidines*, Tetrahedron Lett., **1999**, *40*, 7067-7070.
- [68] W. Stüber, R. Koschinsky, M. Reers, D. Hoffmann, J. Czech, G. Dickneite, *Preparation and evaluation of PEG-bound thrombin inhibitors based on 4-amidinophenylalanine*, Pept. Res., **1995**, *8*, 78-85.
- [69] R. E. Bolton, S. J. Coote, H. Finch, A. Lowdon, N. Pegg, M. V. Vinader, *3-Substituted-1,2,4-oxadiazolin-5-one - a useful amidine precursor and protecting group*, Tetrahedron Lett., **1995**, *36*, 4471-4474.
- [70] B. D. Judkins, D. G. Allen, T. A. Cook, B. Evans, T. E. Sardharwala, *A versatile synthesis of amidines from nitriles via amidoximes*, Synth. Comm., **1996**, *26*, 4351-4367.
- [71] H. Möhrle, J. Lessel, *Quecksilber(II)-EDTA-Dehydrierung N- und O-funktionalisierter 2-tert-Amino-benzamidine*, Arch. Pharm.(Weinheim), **1991**, *324*, 313-315.
- [72] C. Lila, P. Gloanec, L. Cadet, Y. Herve, J. Fournier, F. Leborgne, T. J. Verbeuren, G. De Nanteuil, *Large scale preparation of protected 4-aminomethylbenzamidine. Application to the synthesis of the thrombin inhibitor, melagatran*, Synth. Comm., **1998**, *28*, 4419-4429.

- [73] R. Mohan, W. Y. Yun, B. O. Buckman, A. Liang, L. Trinh, M. M. Morrissey, *Solid-phase synthesis of N-substituted amidinophenoxy pyridines as factor Xa inhibitors*, *Bioorg. Med. Chem. Letters*, **1998**, *8*, 1877-1882.
- [74] U. E. W. Lange, C. Zechel, *Solid-phase synthesis of thrombin inhibitors*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, 1571-1573.
- [75] C. M. Stevens, R. Watanabe, *Amino acid derivatives. 1. Carboallyloxy derivatives of α -amino acids*, *Journal of the American Chemical Society*, **1950**, *72*, 725-727.
- [76] I. A. Nash, B. W. Bycroft, W. C. Chan, *Dde - A selective primary amine protecting group: A facile solid phase synthetic approach to polyamine conjugates*, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 2625-2628.
- [77] A. M. Yu, Z. P. Zhang, H. Z. Yang, C. X. Zhang, Z. Liu, *Wang resin bound addition reactions under microwave irradiation*, *Synth. Comm.*, **1999**, *29*, 1595-1599.
- [78] P. Sieber, *A new acid-labile anchor group for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides by the Fmoc method*, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 2107-2110.
- [79] M. S. Bernatowicz, S. B. Daniels, H. Koster, *A comparison of acid labile linkage agents for the synthesis of peptide C-terminal amides*, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 4645-4648.
- [80] S. Sperl, A. Bergner, J. Stürzebecher, V. Magdolen, W. Bode, L. Moroder, *Urethanyl-3-amidinophenylalanine derivatives as inhibitors of factor Xa. X-ray crystal structure of a trypsin/inhibitor complex and modeling studies*, *Biol. Chem.*, **2000**, *381*, 321-329.
- [81] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe, *A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm*, *J. Mol. Biol.*, **1996**, *261*, 470-489.
- [82] V. L. Nienaber, D. Davidson, R. Edalji, V. L. Giranda, V. Klinghofer, J. Henkin, P. Magdalinos, R. Mantei, S. Merrick, J. M. Severin, R. A. Smith, K. Stewart, K. Walter, J. Y. Wang, M. Wendt, M. Weitzberg, X. M. Zhao, T. Rockway, *Structure-directed discovery of potent non-peptidic inhibitors of human urokinase that access a novel binding subsite*, *Structure*, **2000**, *8*, 553-563.
- [83] E. Zeslowska, A. Schweinitz, A. Karcher, P. Sondermann, S. Sperl, J. Stürzebecher, U. Jacob, *Crystals of the urokinase type plasminogen activator variant β c-uPA in complex with small molecule inhibitors open the way towards structure-based drug design*, *J. Mol. Biol.*, **2000**, *301*, 465-475.

- [84] D. Rauh, G. Klebe, J. Stürzebecher, M. T. Stubbs, *ZZ made EZ: Influence of inhibitor configuration on enzyme selectivity*, *J. Mol. Biol.*, **2003**, 330, 761-770.
- [85] A. C. Wallace, R. A. Laskowski, J. M. Thornton, *LIGPLOT - a program to generate schematic diagrams of protein ligand interactions*, *Prot. Eng.*, **1995**, 8, 127-134.
- [86] C. Kalembe, *Untersuchungen zur antithrombotischen Wirkung neuer Hemmstoffe des Faktor Xa*, Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena, **2003**.
- [87] J. Hauptmann, T. Steinmetzer, H. Vieweg, P. Wikström, und J. Stürzebecher, *Influence of structural variations in peptidomimetic 4-amidinophenylalanine-derived thrombin inhibitors on plasma clearance and biliary excretion in rats*. *Pharm. Res.*, **2002**, 19, 1027-1033.
- [88] S. Wessler, L. Reiner, D. G. Freiman, S. M. Reimer, M. Lertzman, *Serum-induced thrombosis - studies of its induction and evolution under controlled conditions in vivo*, *Circulation*, **1959**, 20, 864-874.
- [89] A. Krüger, V. Schirmacher, P. Hoegen, *Scattered micrometastases visualized at the single-cell level: detection and re-isolation of lacZ-labeled metastasized lymphoma cells*, *Int. J. Canc.*, **1994**, 58, 275-284.
- [90] Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, *Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends*, Robert Koch Institut, **2002**.
- [91] A. F. Chambers, I. C. MacDonald, E. E. Schmidt, V. L. Morris, A. C. Groom, *Clinical targets for anti-metastasis therapy*, *Adv. Canc. Res.*, Vol 79, **2000**, 79, 91-121.
- [92] R. G. McKinnell, *The biological basis of cancer*, Cambridge University Press, **1998**.
- [93] J. E. Koblinski, M. Ahram, B. F. Sloane, *Unraveling the role of proteases in cancer*, *Clin. Chim. Acta*, **2000**, 291, 113-135.
- [94] S. Sperl, M. M. Mueller, O. G. Wilhelm, M. Schmitt, V. Magdolen, L. Moroder, *The uPA/uPA receptor system as a target for tumor therapy*, *DN&P*, **2001**, 14, 401-411.
- [95] S. Heymans, A. Luttun, D. Nuyens, G. Theilmeier, E. Creemers, L. Moons, G. D. Dyspersin, J. P. M. Cleutjens, M. Shipley, A. Angellilo, M. Levi, O. Nube, A. Baker, E. Keshet, F. Lupu, J. M. Herbert, J. F. M. Smits, S. D. Shapiro, M. Baes, M. Borgers, D. Collen, M. J. A. P. Daemen, P. Carmeliet, *Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure*, *Nat. Med.*, **1999**, 5, 1135-1142.

- [96] M. Schmitt, N. Harbeck, C. Thomssen, O. Wilhelm, V. Magdolen, U. Reuning, K. Ulm, H. Hofler, F. Janicke, H. Graeff, *Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: Prognostic relevance and target for therapy*, *Thromb. Haemost.*, **1997**, *78*, 285-296.
- [97] U. Reuning, V. Magdolen, O. Wilhelm, K. Fischer, V. Lutz, H. Graeff, M. Schmitt, *Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis (Review)*, *Int. J. Onc.*, **1998**, *13*, 893-906.
- [98] M. P. Look, J. A. Foekens, *Clinical relevance of the urokinase plasminogen activator system in breast cancer*, *APMIS*, **1999**, *107*, 150-159.
- [99] M. Schmitt, O. G. Wilhelm, U. Reuning, A. Kruger, N. Harbeck, E. Lengyel, H. Graeff, B. Gansbacher, H. Kessler, M. Bürgle, J. Stürzebecher, S. Sperl, V. Magdolen, *The urokinase plasminogen activator system as a novel target for tumour therapy*, *Fibrinolysis Proteolysis*, **2000**, *14*, 114-132.
- [100] M. J. Duffy, T. M. Maguire, E. W. McDermott, N. O' Higgins, *Urokinase plasminogen activator: A prognostic marker in multiple types of cancer*, *J. Surg. Onc.*, **1999**, *71*, 130-135.
- [101] H. Pappot, H. Gardsvoll, J. Romer, A. N. Pedersen, J. Grondahlansen, C. Pyke, N. Brunner, *Plasminogen-activator inhibitor type-1 in cancer - therapeutic and prognostic implications*, *Biol. Chem.*, **1995**, *376*, 259-267.
- [102] M. Bürgle, M. Koppitz, C. Riemer, H. Kessler, B. König, U. H. Weidle, J. Kellermann, F. Lottspeich, H. Graeff, M. Schmitt, L. Goretzki, U. Reuning, O. Wilhelm, V. Magdolen, *Inhibition of the interaction of urokinase-type plasminogen activator (uPA) with its receptor (uPAR) by synthetic peptides*, *Biol. Chem.*, **1997**, *378*, 231-237.
- [103] V. Magdolen, M. Bürgle, N. A. de Prada, N. Schmiedeberg, C. Riemer, F. Schroeck, J. Kellermann, K. Degitz, O. G. Wilhelm, M. Schmitt, H. Kessler, *Cyclo(19,31)[D-Cys(19)]-uPA(19-31) is a potent competitive antagonist of the interaction of urokinase-type plasminogen activator with its receptor (CD87)*, *Biol. Chem.*, **2001**, *382*, 1197-1205.
- [104] H. Kessler, H. Graeff, M. Schmitt, V. Magdolen, O. G. Wilhelm, C. Riemer, und M. Bürgle, *Inhibitors for urokinase receptor*, WO 9846632, **1998**.
- [105] R. J. Goodson, M. V. Doyle, S. E. Kaufman, S. Rosenberg, *High-affinity urokinase receptor antagonists identified with bacteriophage peptide display*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1994**, *91*, 7129-7133.
- [106] Y. J. Guo, A. A. Higazi, A. Arakelian, B. S. Sachais, D. Cines, R. H. Goldfarb, T. R. Jones, H. Kwaan, A. P. Mazar, S. A. Rabbani, *A peptide derived from the nonreceptor binding region of urokinase plasminogen activator (uPA) inhibits tumor progression and angiogenesis and induces tumor cell death in vivo*, *FASEB J.*, **2000**, *14*, 1400-1410.

- [107] S. Rosenberg, K. L. Spear, und E. J. Martin, *Urokinase receptor ligands*, WO 9640747, **1996**.
- [108] R. Di Domenico, G. De Cillis, B. König, und G. Zimmermann, *Oligothiophenes useful as antimetastatic agents, a preparation thereof and pharmaceutical compositions containing them*, WO 9906393, **1999**.
- [109] G. De Cillis, R. Di Domenico, B. König, und A. Oliva, *O-Substituted hydroxycumarone derivatives as antitumor and antimetastatic agents*, WO 9906387, **1999**.
- [110] N. Behrendt, K. Dano, *Effect of purified, soluble urokinase receptor on the plasminogen-prourokinase activation system*, FEBS Lett., **1996**, 393, 31-36.
- [111] D. Morrissey, J. O'Connell, D. Lynch, G. C. O'Sullivan, F. Shanahan, J. K. Collins, *Invasion by esophageal cancer cells: functional contribution of the urokinase plasminogen activation system, and inhibition by antisense oligonucleotides to urokinase or urokinase receptor*, Clin. Exp. Metastasis, **1999**, 17, 77-85.
- [112] J. R. B. Williams, *The fibrinolytic activity of urine*, Br. J. Exp. Pathol., **1951**, 32, 530-537.
- [113] G. W. Sobel, S. R. Mohler, N. W. Jones, A. B. C. Dowdy, M. M. Guest, *Urokinase - an activator of plasma profibrinolysin extracted from urine*, Am. J. Physiol., **1952**, 171, 768-769.
- [114] W. A. Günzler, G. J. Steffens, F. Otting, G. Buse, L. Flohe, *Structural relationship between human high and low-molecular mass urokinase*, Z. Physiol. Chem., **1982**, 363, 133-141.
- [115] T. C. Wun, W. D. Schleuning, E. Reich, *Isolation and characterization of urokinase from human-plasma*, J. Biol. Chem., **1982**, 257, 3276-3283.
- [116] V. Ellis, N. Behrendt, K. Dano, *Plasminogen activation by receptor-bound urokinase - a kinetic-study with both cell-associated and isolated receptor*, J. Biol. Chem., **1991**, 266, 12752-12758.
- [117] G. Spraggon, C. Phillips, U. K. Nowak, C. P. Ponting, D. Saunders, C. M. Dobson, D. I. Stuart, E. Y. Jones, *The crystal-structure of the catalytic domain of human urokinase-type plasminogen-activator*, Structure, **1995**, 3, 681-691.
- [118] A. M. Sharp, P. E. Stein, N. S. Pannu, R. W. Carrell, M. B. Berkenpas, D. Ginsburg, D. A. Lawrence, R. J. Read, *The active conformation of plasminogen activator inhibitor 1, a target for drugs to control fibrinolysis and cell adhesion*, Struc. Fold. Design, **1999**, 7, 111-118.

- [119] S. J. Harrop, L. Jankova, M. Coles, D. Jardine, J. S. Whittaker, A. R. Gould, A. Meister, G. C. King, B. C. Mabbutt, P. M. G. Curmi, *The crystal structure of plasminogen activator inhibitor 2 at 2.0 angstrom resolution: implications for serpin function*, *Structure with Folding & Design*, **1999**, *7*, 43-54.
- [120] P. A. Andreasen, R. Egelund, H. H. Petersen, *The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis*, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2000**, *57*, 25-40.
- [121] M. B. Berkenpas, D. A. Lawrence, D. Ginsburg, *Molecular evolution of plasminogen-activator inhibitor-1 functional stability*, *EMBO J.*, **1995**, *14*, 2969-2977.
- [122] S. M. Kanse, C. Kost, O. G. Wilhelm, P. A. Andreasen, K. T. Preissner, *The urokinase receptor is a major vitronectin-binding protein on endothelial cells*, *Exp. Cell. Res.*, **1996**, *224*, 344-353.
- [123] T. Ny, P. Mikus, *Plasminogen activator inhibitor type-2 - A spontaneously polymerizing serpin that exists in two topological forms*, *Chem. Biol. Serpins*, **1997**, *425*, 123-130.
- [124] E. D. Sprengers, C. Kluft, *Plasminogen-activator inhibitors*, *Blood*, **1987**, *69*, 381-387.
- [125] P. A. Andreasen, L. Kjoller, L. Christensen, M. J. Duffy, *The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review*, *Int. J. Canc.*, **1997**, *72*, 1-22.
- [126] S. Thorsen, M. Philips, J. Selmer, I. Lecander, B. Astedt, *Kinetics of inhibition of tissue-type and urokinase-type plasminogen-activator by plasminogen-activator inhibitor type-1 and type-2*, *Eur. J. Biochem.*, **1988**, *175*, 33-39.
- [127] U. Turpeinen, E. Koivunen, U. H. Stenman, *Reaction of a tumor-associated trypsin-inhibitor with serine proteinases associated with coagulation and tumor invasion*, *Biochem. J.*, **1988**, *254*, 911-914.
- [128] R. Lottenberg, N. Sjakshie, A. T. Fazleabas, R. M. Roberts, *Aprotinin inhibits urokinase but not tissue-type plasminogen-activator*, *Thromb. Res.*, **1988**, *49*, 549-556.
- [129] T. W. Rockway, V. L. Giranda, *Inhibitors of the proteolytic activity of urokinase type plasminogen activator*, *Curr. Pharm. Design*, **2003**, *9*, 1483-1498.
- [130] J. Stürzebecher, F. Markwardt, *Synthetic inhibitors of serine proteinases. 17. Effect of benzaminidine derivatives on urokinase activity and fibinolysis*, *Pharmazie*, **1978**, *33*, 599-602.

- [131] M. J. Towle, A. Lee, E. C. Maduakor, C. E. Schwartz, A. J. Bridges, B. A. Littlefield, *Inhibition of urokinase by 4-substituted benzo[b]thiophene-2-carboxamidines - an important new class of selective synthetic urokinase inhibitor*, *Canc. Res.*, **1993**, *53*, 2553-2559.
- [132] J. D. Vassalli, D. Belin, *Amiloride selectively inhibits the urokinase-type plasminogen-activator*, *FEBS Lett.*, **1987**, *214*, 187-191.
- [133] R. P. Dickenson, P. V. Fish, und C. G. Barber, *Isoquinolines*, US 6093713, **2000**.
- [134] C. G. Barber und R. P. Dickenson, *2-Pyridinylguanidine urokinase inhibitors*, EP 1044967A3, **2000**.
- [135] C. G. Barber, R. P. Dickinson, V. A. Horne, *Selective urokinase-type plasminogen activator (uPA) inhibitors. Part 1: 2-pyridinylguanidines*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, 181-184.
- [136] C. G. Barber, R. P. Dickinson, *Selective urokinase-type plasminogen activator (uPA) inhibitors. Part 2: (3-Substituted-5-halo-2-pyridinyl)guanidines*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, 185-187.
- [137] K. J. Wilson, C. R. Illig, N. Subasinghe, J. B. Hoffman, M. J. Rudolph, R. Soll, C. J. Molloy, R. Bone, D. Green, T. Randall, M. Zhang, F. A. Lewandowski, Z. Zhou, C. Sharp, D. Maguire, B. Grasberger, R. L. DesJarlais, J. Spurlino, *Synthesis of thiophene-2-carboxamidines containing 2-amino-thiazoles and their biological evaluation as urokinase inhibitors*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 915-918.
- [138] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR*, *Science*, **1996**, *274*, 1531-1534.
- [139] V. L. Nienaber, P. L. Richardson, V. Klinghofer, J. J. Bouska, V. L. Giranda, J. Greer, *Discovering novel ligands for macromolecules using X-ray crystallographic screening*, *Nat. Biotechnol.*, **2000**, *18*, 1105-1108.
- [140] S. Sperl, *Selective urokinase inhibitors*, WO 03053999, **2003**.
- [141] V. L. Nienaber, D. Davidson, R. Edalji, V. L. Giranda, V. Klinghofer, J. Henkin, P. Magdalinos, R. Mantei, S. Merrick, J. M. Severin, R. A. Smith, K. Stewart, K. Walter, J. Y. Wang, M. Wendt, M. Weitzberg, X. M. Zhao, T. Rockway, *Structure-directed discovery of potent non-peptidic inhibitors of human urokinase that access a novel binding subsite*, *Structure*, **2000**, *8*, 553-563.
- [142] E. Zeslawska, A. Schweinitz, A. Karcher, P. Sondermann, S. Sperl, J. Stürzebecher, U. Jacob, *Crystals of the urokinase type plasminogen activator variant β c-uPA in complex with small molecule inhibitors open the way towards structure-based drug design*, *J. Mol. Biol.*, **2000**, *301*, 465-475.

- [143] E. Zeslawska, U. Jacob, A. Schweinitz, G. Coombs, W. Bode, E. Madison, *Crystals of urokinase type plasminogen activator complexes reveal the binding mode of peptidomimetic inhibitors*, J. Mol. Biol., **2003**, 328, 109-118.
- [144] J. F. Elsworth, L. N. Msimang, G. E. Jackson, *Novel acyclic ligands. I. Synthesis of some dicarboxamide derivatives*, South African Journal of Chemistry-Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Chemie, **1996**, 49, 31-34.
- [145] M. S. Bernatowicz, Y. L. Wu, G. R. Matsueda, *Urethane protected derivatives of 1-guanylpiperazine for the mild and efficient preparation of guanidines*, Tetrahedron Lett., **1993**, 34, 3389-3392.
- [146] Y. L. Wu, G. R. Matsueda, M. S. Bernatowicz, *An efficient method for the preparation of omega,omega(')-bis-urethane protected arginine derivatives*, Synth. Comm., **1993**, 23, 3055-3060.
- [147] B. Drake, M. Patek, M. Lebl, *A convenient preparation of monosubstituted N,N'-di(boc)-protected guanidines*, Synthesis, **1994**, 579-582.
- [148] E. G. von Roedern, F. Grams, H. Brandstetter, L. Moroder, *Design and synthesis of malonic acid-based inhibitors of human neutrophil collagenase (MMP8)*, J. Med. Chem., **1998**, 41, 339-345.
- [149] S. Niwayama, *Highly efficient selective monohydrolysis of symmetric diesters*, J. Org. Chem., **2000**, 65, 5834-5836.
- [150] R. D. Bach, T. H. Taafee, S. J. Rajan, *Reactions of nitrosonium tetrafluoroborate in acetonitrile with organic-molecules containing non-bonding electrons - synthesis of acetamides*, J. Org. Chem., **1980**, 45, 165-167.
- [151] A. G. Martinez, R. M. Alvarez, E. T. Vilar, A. G. Fraile, M. Hanack, L. R. Subramanian, *An improved modification of ritter reaction*, Tetrahedron Lett., **1989**, 30, 581-582.
- [152] C. Schotten, *Ueber die Oxydation des Piperidins*, Ber. Deutsch. Chem. Gesell., **1884**, 2544-2547.
- [153] E. Baumann, *Ueber eine einfache Methode der Darstellung von Benzoesaureestern*, Ber. Deutsch. Chem. Gesell., **1886**, 3218-3222.
- [154] M. M. Shemyakin, Angew. Chem., **1960**, 72.
- [155] D. R. Bolin, I. I. Sytwu, F. Humiec, J. Meienhofer, *Preparation of oligomer-free N- α -Fmoc and N- α -urethane amino-acids*, Int. J. Pept. Prot. Res., **1989**, 33, 353-359.
- [156] L. H. Zhang, G. S. Kauffman, J. A. Pesti, J. G. Yin, *Rearrangement of N- α -protected L-asparagines with iodosobenzene diacetate. A practical route to β -amino-L-alanine derivatives*, J. Org. Chem., **1997**, 62, 6918-6920.

- [157] C. W. Zapf, M. Goodman, *It's not magic: It's a novel traceless resin-bound guanidinylation reagent*, Abstr. Am. Chem. Soc., **2001**, 221, 119-119.
- [158] C. W. Zapf, C. J. Creighton, M. Tomioka, M. Goodman, *A novel traceless resin-bound guanidinylation reagent for secondary amines to prepare N,N-disubstituted guanidines*, Org. Lett., **2001**, 3, 1133-1136.
- [159] K. Feichtinger, C. Zapf, H. L. Sings, M. Goodman, *Diprotected triflylguanidines: A new class of guanidinylation reagents*, J. Org. Chem., **1998**, 63, 3804-3805.
- [160] K. Feichtinger, H. L. Sings, T. J. Baker, K. Matthews, M. Goodman, *Triurethane-protected guanidines and triflyldiurethane-protected guanidines: New reagents for guanidinylation reactions*, J. Org. Chem., **1998**, 63, 8432-8439.
- [161] H. J. Musiol, L. Moroder, *N,N'-Di-tert-butoxycarbonyl-1H-benzotriazole-1-carboxamide derivatives are highly reactive guanidinylation reagents*, Org. Lett., **2001**, 3, 3859-3861.
- [162] M. Patek, M. Smrcina, E. Nakanishi, H. Izawa, *Solid-phase synthesis of substituted guanidines using a novel acid labile linker*, J. Comb. Chem., **2000**, 2, 370-377.
- [163] H. Miel, S. Rault, *Conversion of N,N'-bis(tert-butoxycarbonyl)guanidines to N-(N'-tert-butoxycarbonylamidino)ureas*, Tetrahedron Lett., **1998**, 39, 1565-1568.
- [164] C. M. Sun, J. Y. Shey, *High-throughput synthesis of Boc-substituted amidinoureas by liquid-phase approach*, J. Comb. Chem., **1999**, 1, 361-363.
- [165] S. Sakaguchi, *A new method for the colorimetric determination of arginine*, J. Biochem., **1950**, 37, 231-236.
- [166] *The determination of enzyme inhibitor constants*, Biochem. J., **1953**, 55, 170-171.
- [167] A. G. W. Leslie, *MOSFLM*, Version 6.0, Cambridge, UK. **1998**.
- [168] J. Navaza, *AMORE-An automated package for molecular replacement*, Acta Crystallo., **1994**, A50, 157-163.
- [169] T. A. Jones, *O-the manual*, Version 5.10.3, Uppsala, Sweden. **1995**.
- [170] A. T. Brünger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. Delano, P. Gros, R. W. Grossekunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nigles, N. S. Pannu, *Crystallography and NMR system - A new software suite for macromolecular structure determination*, Acta Crystallo., **1998**, D54, 905-921.

- [171] R. A. Engh, R. Huber, *Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement*, Acta Crystallographica Section A, **1991**, 47, 392-400.