

Institut für Organische Chemie und Biochemie  
der Technischen Universität München

**Konformationell eingeschränkte Peptide: Anwendung neuartiger  
Bausteine, Cyclisierungsmethoden und Funktionalisierungen für das  
Wirkstoffdesign von Zellrezeptor-Liganden**

Martin Sukopp

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

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

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

Die Dissertation wurde am 06.03.2003 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 08.04.2003  
angenommen.



Isopropilprophemilparbitussaueresphenildimenthildimentiminophirazon

So einfach – und man kann es sich doch nicht merken.

*Karl Valentin*



Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München in der Zeit von Mai 2000 bis April 2003 unter der Leitung von Prof. Dr. H. Kessler angefertigt.

Herrn Prof. Kessler danke ich für die interessante Aufgabenstellung und die Aufnahme in seinem Arbeitskreis als Grundlage für die Zulassung zur Promotion über das Sondereignungsverfahren für FH-Absolventen. Neben der Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen war es vor allem die große wissenschaftliche Freiheit, die Schaffung eines exzellenten Arbeitsklimas sowie die aufgeschlossene und konstruktive Kritikkultur, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Mein weiterer Dank gilt:

- meinen Laborkollegen Mona Wolff, Dr. Sibylle Gruner und Jörg Auernheimer für das ausgezeichnete Laborklima,
- Dr. Niko Schmiedeberg für die Einführung in das Urokinaseprojekt, sowie die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen,
- Sebastian Knör, Armin Modlinger und Jörg Auernheimer für das Korrekturlesen des Manuskripts dieser Arbeit,
- Dr. Gábor Sulyok, Ulrich Hersel und Dr. Elsa Locardi für die ständige Diskussionsbereitschaft und den wissenschaftlichen Austausch,
- Luciana Marinelli, Dr. Julian Furrer und Markus Heller für die Hilfe bei der Strukturbestimmung von Rezeptorliganden,
- Mona Wolff, sowie meinen Praktikanten Fritz Mühltau, Anne-Lore Mersier, Ingbert Braun, Sebastian Wistuba, Martin Fleck, Stefan Breitenlechner und Florian Opperer für die tatkräftige Unterstützung dieser Arbeit,
- Dr. Katja Wosikowski, Dr. Markus Bürgle und Nils Potthoff der Wilex AG sowie Dr. Richard Schwab und Prof. György Kéri der Semmelweis

Universität, Budapest für die gute Zusammenarbeit und die biologische Testung der Urokinase- bzw. Somatostatin-Peptide,

- der Klinischen Forschergruppe mit Prof. Dr. Manfred Schmitt, Dr. Viktor Magdolen, Dr. Christof Seidl, Dr. Ute Reuning und Elke Guthaus sowie Prof. R. W. Hoffmann, Dr. Matthias Wiesner und Dr. S. L. Goodman für die gute Zusammenarbeit bei einer Reihe von Kooperationsprojekten,
- Dr. Rainer Haeßner, Monika Goede und Alex Frenzel für die Hilfe bei allen NMR-, Hardware- und Softwarefragen,
- Maria Kranawetter für die zuverlässige Durchführung von HPLC-Trennungen und Burghard Cordes für die reibungslose und prompte Aufnahme der ESI-MS-Spektren,
- Evelyn Bruckmaier und Marianne Machule für die Unterstützung im Kampf gegen die Bürokratie,
- allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern für das hervorragende Arbeitsklima und das Ertragen meiner unerschöpflichen guten Laune.

Vor allem aber danke ich meiner Familie für die Freiheiten und die Unterstützung für all meine bisherigen Ziele und Unternehmungen.

## INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	CYCLISCHE PEPTIDE ALS UROKINASE-REZEPTORLIGANDEN IN DER KREBSTHERAPIE	5
<b>2.1</b>	<b>Molekulare Physiologie der Krebsentstehung und –ausbreitung</b>	<b>5</b>
2.1.1	Allgemeine Mechanismen	5
2.1.2	Die Rolle von Proteasen bei der Tumorprogression und Metastasierung	7
<b>2.2</b>	<b>Das Urokinase-Urokinaserezeptor-System und seine biologischen Mechanismen</b>	<b>10</b>
2.2.1	Die Serinprotease Urokinase (uPA)	10
2.2.2	Der uPA-Rezeptor	13
2.2.3	Die Bindung von uPA an uPAR	16
2.2.4	Bindung von uPAR an Vitronektin	18
2.2.5	Die Funktion der natürlichen uPA-Inhibitoren	19
2.2.6	Wechselwirkung von uPAR und Integrinen und Auswirkungen auf die Signaltransduktion	22
<b>2.3</b>	<b>Bedeutung des uPA/uPAR-Systems in der Krebsmedizin</b>	<b>27</b>
2.3.1	Tumorprognose mit Hilfe von uPA und PAI-1	27
2.3.2	Ansätze für die Tumorthherapie	28
2.3.3	Entwicklung von uPAR-Antagonisten	31
2.3.3.1	Entwicklung von <i>cyclo</i> [21,29][D-Cys <sup>21</sup> ,Cys <sup>29</sup> ]-uPA <sub>21-30</sub>	31
2.3.3.2	Entwicklung anderer Arbeitsgruppen	36
<b>2.4</b>	<b>Allgemeine Grundlagen der Peptidchemie</b>	<b>38</b>
2.4.1	Prinzipien der Peptidsynthese	38
2.4.2	Strukturelle Eigenschaften von Cyclopeptiden	43
<b>2.5</b>	<b>Synthese von <i>cyclo</i>[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>- Modifikationen</b>	<b>49</b>
2.5.1	Synthese von C-/N-terminal modifiziertem <i>cyclo</i> [21,29][D- Cys <sup>21</sup> ,Cys <sup>29</sup> ]-uPA <sub>21-30</sub>	50
2.5.2	Synthese von <i>cyclo</i> [21,29][D-Cys <sup>21</sup> ,Cys <sup>29</sup> ]-uPA <sub>21-30</sub> -Dimeren	52
2.5.3	Synthese von N-terminal funktionalisiertem <i>cyclo</i> [21,29][D- Cys <sup>21</sup> ,Cys <sup>29</sup> ]-uPA <sub>21-30</sub>	64
<b>2.6</b>	<b>Synthese von templatbasierten Hexapeptiden</b>	<b>72</b>
2.6.1	Templatkonzepte für uPAR-Antagonisten	72
2.6.2	Synthese von trifunktionellen Aminosäurebausteinen	79
2.6.3	Peptidcyclisierung am Harz	89

2.6.4	Fragmentkupplung von Cyclopeptiden an harzgebundene lineare Peptide	93
3	CYCLISCHE, PEPTIDISCHE REZEPTORLIGANDEN MIT KONFORMATIONELL EINGESCHRÄNKTEN AMINOSÄUREN	96
<b>3.1</b>	<b>Die cyclische <math>\beta</math>-Aminosäure c<math>\beta</math>AA</b>	<b>96</b>
3.1.1	Verwendung von cyclischen $\beta$ -Aminosäuren als Peptidbausteine	96
3.1.2	Synthese der cyclischen $\beta$ -Aminosäure c $\beta$ AA über eine Multikomponenten-Diels-Alder-Reaktion	98
3.1.3	Strukturanalyse des c $\beta$ AA-Bausteins	105
3.1.4	Synthese von Fmoc-c $\beta$ AA-OH	107
<b>3.2</b>	<b>Das <math>\beta</math>-turn-Mimetikum ATUA</b>	<b>109</b>
3.2.1	$\beta$ -turn-Mimetikum als Peptidbausteine	109
3.2.2	Design von ATUA	111
3.2.3	Synthese von Fmoc-ATUA-OH	112
<b>3.3</b>	<b>Das Peptidhormon Somatostatin</b>	<b>114</b>
3.3.1	Vorkommen und Funktion von Somatostatin	114
3.3.2	Die Somatostatin-Rezeptoren und ihre Funktion	115
3.3.3	Entwicklung von Somatostatin-Analoga	116
3.3.4	Struktur-Wirkungsbeziehungen von Somatostatin-Analoga	120
<b>3.4</b>	<b>Synthese von Somatostatin-Analoga mit c<math>\beta</math>AA als strukturinduzierendem Baustein</b>	<b>121</b>
3.4.1	Bisheriger Kenntnisstand und Aufgabenstellung	121
3.4.2	Synthese der cyclischen SST-Analoga mit c $\beta$ AA	123
3.4.3	Biologische Testergebnisse	124
3.4.4	NMR-Stuktur von <i>cyclo</i> (-D-Trp-Nle-Thr(OTrt)-c $\beta$ AA-Tyr-)	127
3.4.5	Struktur-Wirkungsbeziehung von <i>cyclo</i> (-D-Trp-Nle-Thr(OTrt)-c $\beta$ AA-Tyr-)	132
<b>3.5</b>	<b>Das Integrin und seine Liganden</b>	<b>135</b>
3.5.1	Allgemeine Grundlagen über Integrine und ihre biologische Relevanz	135
3.5.2	Struktur von Integrinen	137
3.5.3	Entwicklung von $\alpha$ v $\beta$ 3-selektiven Integrinliganden	141
3.5.4	Struktur-Wirkungs-Beziehung von $\alpha$ v $\beta$ 3-Integrinliganden	143
<b>3.6</b>	<b>Synthese von Integrinliganden mit c<math>\beta</math>AA und ATUA</b>	<b>146</b>
3.6.1	Vorarbeiten und Aufgabenstellung	146
3.6.2	Synthese der RGD-Peptide	148



3.6.3	Biologische Testergebnisse	149
3.6.4	Die NMR-Strukturen von <i>cyclo</i> (-RGD-c $\beta$ AA-) und <i>cyclo</i> (-RGD-ATUA-)	150
3.6.4.1	Die Struktur von <i>cyclo</i> (-RGD-c $\beta$ AA-)	151
3.6.4.2	Die Struktur von <i>cyclo</i> (-RGD-ATUA-)	154
4	ZUSAMMENFASSUNG	158
5	EXPERIMENTELLER TEIL	161
<b>5.1</b>	<b>Allgemeine Arbeitstechniken</b>	<b>161</b>
<b>5.2</b>	<b>Liste der synthetisierten Verbindungen</b>	<b>165</b>
5.2.1	Aminosäurederivate und Schutzgruppen	165
5.2.2	<i>cyclo</i> [21,29][D-Cys <sup>21</sup> ,Cys <sup>29</sup> ]-uPA <sub>21-30</sub> -Modifikationen	167
5.2.3	Cyclische Templatpeptide	170
5.2.4	Rezeptorliganden	177
<b>5.3</b>	<b>Allgemeine Arbeitsvorschriften und spezielle Peptidsynthesen</b>	<b>178</b>
<b>5.4</b>	<b>Synthesen der Aminosäurederivate und Schutzgruppen</b>	<b>187</b>
6	LITERATURVERZEICHNIS	239
7	ANHANG	258

## Abkürzungen

1D, 2D, 3D	eindimensional, zweidimensional, dreidimensional
Å	Ångström, $10^{-10}$ m
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
AAS	2-Aminoadipinsäure
abs.	absolutiert
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
AcO <sup>t</sup> Bu	<i>tert</i> -Butylacetat
ADME	<i>absorption, distribution, metabolism, excretion</i>
ADO	8-Amino-3,6-dioxooctansäure
Ahx	$\epsilon$ -Aminohexansäure
Aib	$\alpha$ -Aminoisobuttersäure
APS	2-Aminopimelinsäure
AS	Aminosäure
ATF	aminoterminales Fragment
ATUA	11-Amino-3,5,8,10-tetramethylundec-6-ensäure
All	Allyl
BHT	2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methyl-phenol
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bu	<i>n</i> -Butyl
$\beta$ SAA	<i>beta-sugar amino acid</i>
Bzl	Benzyl
°C	Grad Celsius
c $\beta$ AA	<i>cyclic beta-amino acid</i>
Cha	Cyclohexylalanin
CHO	<i>chinese hamster ovarian</i>
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
CSA	Camphersulfonsäure
CVFF	<i>consistent valence force field</i>
d	Dublett oder <i>days</i>
dd	Doppeldublett
$\delta$	chemische Verschiebung
DB	Doppelbindung

DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCG	Dicyclohexylguanidin
DCM	Dichlormethan
Ddv	2-(3-Methylbutyryl)-dimedon
DG	<i>distance geometry</i>
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
dest.	destilliert
DIPEA	Diisopropylethylamin
Dmab	4- {N-[1-(4,4-Dimethyl-2,6,dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl]amino}-benzyl
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethyl-4-aminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribosenucleic acid</i>
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecantetraessigsäure
DPPA	Diphenylazidophosphat
DQF-COSY	<i>double quantum filtered COSY</i>
d. Th.	der Theorie
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDA	2,2'-(Ethylendioxy)-diethylamin
EDCI	<i>N</i> -Ethyl- <i>N,N'</i> -(dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EE	Essigsäureethylester
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
eq.	Äquivalente
ER	endoplasmatisches Reticulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ESI	<i>electro spray ionization</i>
Et	Ethyl
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMD	<i>free molecular dynamics</i>

Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fmoc-ONSu	( <i>N</i> -Fluorenylmethoxycarbonyloxy)- <i>N</i> -succinimid
FN	Fibronektin
g	Gramm
ges.	gesättigt
GFD	<i>growthfactor-like Domaine</i>
GH	<i>growth hormone</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
G-Protein	GTP bindendes Protein
h	Stunde
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HEGAS	Hexaethylenglycol-Aminosäure
Hep	<i>human epidermoid carcinoma cell</i>
Hex	Hexan
HFIP	Hexafluorisopropanol
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HMW	<i>high molecular weight</i>
HOAc	Essigsäure
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOObt	3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
HTS	<i>high throughput screening</i>
HV	Hochvakuum (Ölpumpenvakuum)
Hz	Hertz
I	Peakintegral
IC	<i>inhibitory capacity</i>
IR	Infrarot
ivDde	(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)-3-methylbutyl
JAK	Januskinase
K	Kelvin
kat.	katalytisch

kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
L	Liter
LC-MS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LDLR	<i>low-density lipoprotein receptor</i>
LMW	<i>low molecular weight</i>
J	skalare Kopplungskonstante
m	Multipllett
M	Molar
MB	Methylenblau
Mek	MAP Kinase Kinase
Mac	<i>macrophage glycoprotein</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCR	Multikomponentenreaktion
MD	Moleküldynamik
Me	Methyl
MeOH	Methanol
mg	Milligram
MHz	Megahertz
MIDAS	<i>metal ion dependent adhesion site</i>
min	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mmbar	Millibar
mmol	Millimol
MMP	Metallomatrixproteinase
Mmt	Monomethoxytrityl
MR	Makroglobulinrezeptor
MS	Massenspektrometrie
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium-bromid
MW	Molgewicht
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
N	normal
NCA	<i>N</i> -Carboxyanhydrid, <i>Leuchs</i> Anhydrid

Nle	Norleucin, 2-Aminohexansäure
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>nuclear Overhauser enhancement</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
Orn	Ornithin
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-
PCI	Protein C Inhibitor
PEG	Polyethylenglycol
Pfp	Pentafluorphenol
Ph	Phenyl
PI	Phosphatidyl-Inositol
PI-PLC	PI-spezifische Phospholipase C
PI-PLD	PI-spezifische Phospholipase D
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMMA	Polymethylmethacrylat
PN-1	Protease-Nexin-1
ppb	<i>parts per billion</i>
ppm	<i>parts per million</i>
pro-uPA	proteolytisch inaktives Proenzym des Urokinasetyp Plasminogenaktivators
PS	Polystyrol
q	Quartett
r	Abstand
<i>rac</i>	racemisch
RCL	<i>reactive center loop</i>
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz
rMD	<i>restraint molecular dynamics</i>
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
ROESY	<i>rotating frame overhauser enhancement spectroscopy</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RP-HPLC	<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i>

R <sub>t</sub>	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Serpin	Serinprotease-Inhibitor
SG	Schutzgruppe
<i>shc</i>	<i>src-homology (domain) C</i>
Smp.	Schmelzpunkt
SomB	Somatomedin B
SPD	Serinproteasedomäne
SPPS	Festphasen-Peptidsynthese
<i>src</i>	<i>sarcoma</i>
SRIF	<i>somatropin release-inhibiting factor</i>
SST	Somatostatin
SSTR	Somatostatinrezeptor
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
suPAR	löslicher uPAR
t	Triplett
<sup>t</sup> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N'</i> , <i>N'</i> , <i>N'</i> , <i>N'</i> -tetramethyluronium-hexafluoroborat
TCP	Tritylchlorid-Polystyrol-Harz
TETA	1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecantetraessigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	1,1,1-Trifluorethanol
TFFH	Tetramethylfluoroformamidinium-hexafluorophosphat
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
TGF	<i>transforming growth factor</i>
THF	Tetrahydrofuran
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TIPS	Triisopropylsilan
THF	Tetrahydrofuran
TMG	Tetramethylguanidin
TOCSY	<i>total correlated spectroscopy</i>
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
Trt, Trityl	Triphenylmethyl
uPA	Urokinasetyp Plasminogenaktivator

uPAR	Urokinasetyp Plasminogenaktivator-Rezeptor
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
verd.	verdünnt
VLDLR	<i>very low density lipoprotein receptor</i>
VN	Vitronektin
Vol-%, v/v	Volumenprozent
Xaa	beliebige Aminosäure
Z	Benzyloxycarbonyl

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



## 1 Einleitung

Der weltweite Wandel in der Chemie, der sich durch die Verlagerung der Prioritäten - weg von der klassischen Chemie, hin zur Interdisziplinarität - äußert, steht außer Frage.<sup>[1]</sup> *Stephen Lippard* hat zur genaueren Analyse dieses Wandels und zum Aufzeigen neuer Perspektiven in der Chemie unter Mitwirkung zahlreicher Kollegen versucht, unter dem Titel „New frontiers in basic chemistry“ 22 Ziele zu formulieren.<sup>[2]</sup> Auch zum Anlass des 125-jährigen Bestehens der *American Chemical Society* erschienen Beiträge, die die Suche nach neuen Aufgabengebieten und Herausforderungen als Thema haben.<sup>[3]</sup> Im speziellen Fall der Medizinischen Chemie und in der Pharmaindustrie ist die Entwicklung der vergangenen Jahrzehnte keinesfalls anders zu bewerten. Angetrieben durch neue Erkenntnisse und Methoden hat sich die Gesamtheit des naturwissenschaftlichen Interesses in der Arzneimittelforschung kontinuierlich von der klassischen Chemie abgewandt.<sup>[4, 5]</sup> Demzufolge war die erste Epoche in der Gründungszeit der Medizinischen Chemie von der Organischen Chemie dominiert, die zweite dagegen vom rationalen Design aufgrund der Kenntnisse über Enzyme und Rezeptoren, in der auch der Dialog zwischen Chemikern und Biologen an Bedeutung zunahm. Ende der 80er Jahre schließlich wurden Hochdurchsatz-Technologien und die kombinatorische Chemie entwickelt, die lange Zeit als wesentliche Triebkraft in der Medizinischen Chemie angesehen wurden. Inzwischen weiß man aber, dass die in den 90er Jahren euphorisch gepriesene „Kombichem“ nicht ihre Erwartungen erfüllt hat.<sup>[6]</sup> Man hatte vernachlässigt, dass kombinatorische Bibliotheken nicht divers genug sind und häufig den chemischen Strukturraum einer biologischen Relevanz verfehlen. Man ist deswegen dazu übergegangen, einen Versuchs-und-Selektions-Weg zu beschreiten, der die beiden Konzepte des rationalen Designs und der kombinatorischen Chemie in sich vereint. Durch Kombination der Einzelkomponenten – Grundgerüste (*scaffolds*) und Bausteine (*building blocks*) – werden alle möglichen Moleküle einer

Substanzfamilie simultan/parallel synthetisiert. Anschließend werden die aktiven Vertreter selektiert, das Aktivitäts-Wirkungs-Prinzip analysiert und darauf aufbauend in einem kombinatorischen Selektionsprozess der Strukturraum mit hoher Dichte abgesucht.

Dieses Prinzip hat sich bereits in Hinblick auf Liganden wie Urotensin<sup>[7]</sup> und Serin-Protease-Inhibitoren<sup>[8]</sup> bewährt, deren *targets* (z. B. Rezeptoren, Enzyme) strukturell bisher nicht oder erst vor kurzem zugänglich waren. Probleme bei der Strukturaufklärung über NMR- oder Röntgenkristallografie-Techniken sind häufig die Größe der Enzymkomplexe oder die Membranständigkeit von Rezeptoren. Da in den nächsten Jahren eine Flut von potentiellen, neuen *targets* durch die Aufklärung des menschlichen Genoms<sup>[9, 10]</sup> zur Verfügung stehen werden, wird es kaum möglich sein, für jedes *target* problemlos und in kurzer Zeit die Strukturen zu ermitteln, um ein darauf aufbauendes Wirkstoffdesign zu ermöglichen. Das oben genannte Versuchs-und-Selektions-Prinzip wird also weiterhin seine Gültigkeit beibehalten.

Die in dieser Arbeit behandelten *targets* (Urokinase-, Somatostatinrezeptor und Integrine), die alle im Zusammenhang mit Krebs und dessen Ausbreitung im Körper stehen, gehören allesamt zur Klasse der Membranproteine, deren wichtigste Vertreter die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR),<sup>[11]</sup> die Ionenkanäle<sup>[12]</sup> und Zelladhäsionsrezeptoren<sup>[13]</sup> sind. Die in Vorarbeiten entwickelten, peptidischen Liganden, die von natürlichen Peptiden oder Proteinen abgeleitet wurden, dienen als Grundlage für weitere Modifikationen unter Berücksichtigung des oben erwähnten Versuchs-und-Selektions-Prinzips. Dabei werden entweder die *scaffolds* oder die *building blocks* variiert, um näheres über die Struktur-Wirkungsbeziehung der Liganden zu erfahren, und um neue chemische Strukturräume zu eröffnen. Besonders geeignet sind dazu rigide, cyclische Strukturen, da so der Konformationsraum der Liganden stark eingeschränkt ist. Dies bildet die Grundlage für die Ermittlung der Lösungsstruktur biologisch aktiver Peptide über NMR-Techniken, so dass man ohne Kenntnis über die Struktur des Rezeptors Aussagen über den

Bindungsmodus oder die optimale Orientierung der pharmakophoren Gruppen treffen kann. In der Medizinischen Chemie ist dieses Wissen häufig der Schlüsselschritt für die Entwicklung von niedermolekularen Wirksubstanzen.

Im Fall der Serinprotease urokinaseartiger Plasminogenaktivator (uPA) ist bekannt, dass er mit hoher Selektivität und Affinität über einen exponierten Loop an den dazugehörigen Rezeptor (uPAR) bindet (siehe Kapitel 2.2) Es konnte gezeigt werden, dass dadurch eine Reihe von proteolytischen Prozessen und die Adhäsionseigenschaften von Tumorzellen beeinflusst werden, die im Endeffekt zu verstärkter Metastasenbildung führen. Die Inhibierung der uPA/uPAR-Wechselwirkung stellt somit ein interessantes *target* für die Tumorintervention dar. Ausgehend von der von *N. Schmiedeberg* in unserem Arbeitskreis entwickelten, peptidischen Leitstruktur *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>, die das Bindungsepitop des uPA in einem konformationell eingeschränkten Cyclus beinhaltet und im nanomolaren Bereich an den uPA-Rezeptor bindet, sollen unterschiedliche Modifikationen durchgeführt werden. Zum einen ist es Ziel, durch Anbringung von Funktionalitäten Derivate des *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> zu erhalten, mit denen man die Funktionsweise der uPA/uPAR-Wechselwirkung studieren kann. In Betracht kommen dabei z. B Dimere, sowie radio- und fluoreszenzmarkierte Peptide. Zum anderen sollen basierend auf der bekannten Raumstruktur von *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> und einem cyclischen Hexapeptid-Grundgerüst versucht werden, weitere Liganden für den uPA-Rezeptor zu finden. Dazu müssen neuartige Aminosäuren entwickelt und Synthesekonzepte erarbeitet werden.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit zwei neuen Bausteinen, deren Synthese und strukturinduzierende Eigenschaften in cyclischen Peptiden beleuchtet wird. Als Testsysteme sollen Liganden der  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrine und des Somatostatin-Rezeptors verwendet werden, die für ihre inhibierende Wirkung

auf die tumorinduzierte Angiogenese bzw. Zellproliferation von Krebszellen bekannt sind (Kapitel 3.5 und 3.3). Für die Synthese eines Bausteins wird eine enantioselektive Multikomponenten-Reaktion verwendet, die es erlauben sollte, eine rigide, cyclische  $\beta$ -Aminosäure in wenigen Stufen zu erhalten. Der andere Baustein ist ein 4-fach methylsubstituiertes, lineares  $\beta$ -turn-Mimetikum mit einer zentralen Doppelbindung, dessen Struktur und turn-induzierende Eigenschaft am Computer entworfen wurde. Nach Einbau der Bausteine in die entsprechenden Peptide werden biologische Testungen und Strukturuntersuchungen mittels NMR- und Computer-Techniken vorgenommen, um durch Vergleich mit bioaktiven Standardpeptiden die strukturinduzierenden Eigenschaften der Bausteine zu bewerten.

## **2 Cyclische Peptide als Urokinase-Rezeptorliganden in der Krebstherapie**

### **2.1 Molekulare Physiologie der Krebsentstehung und –ausbreitung**

#### **2.1.1 Allgemeine Mechanismen**

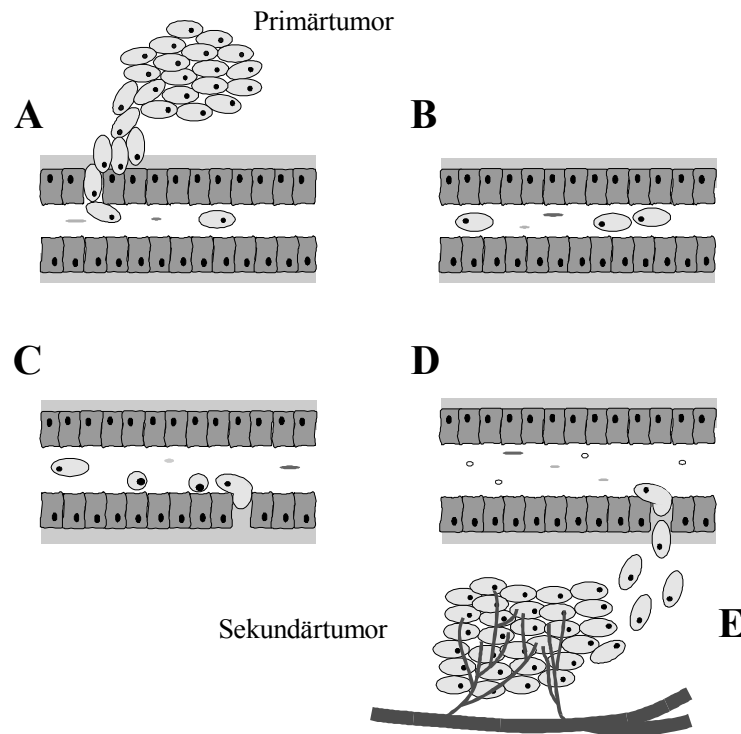
Die Zellen eines gesunden menschlichen Körpers leben in einem komplexen Verbund, der auf wechselseitigen Abhängigkeiten und gegenseitiger Beeinflussung beruht. Das Netzwerk der Zellen unterliegt dabei Cyclen des Auf- und Abbaus. Die Aufforderung zur Teilung erhält die Zelle normalerweise von den benachbarten Zellen. Diese gegenseitige Kontrolle gewährleistet, dass jedes Gewebe eine ihm angemessene Ausdehnung und Architektur beibehält.<sup>[14]</sup> Schädigung der Kontroll-Mechanismen in der Zelle führt jedoch zu verändertem Verhalten der Proliferations- und Migrationstätigkeit.

Man unterscheidet zwischen zwei Tumorarten, die für den Verlauf der Krankheit Krebs ausschlaggebend sind:<sup>[15, 16]</sup>

- Benigne oder gutartige Tumore durchbrechen die Kontrollen und Regulation des Zellwachstums. Es kommt zu ungebremsten Wucherungen, die allerdings durch das umgebende Gewebe eingekapselt sind.
- Maligne Tumore haben darüber hinaus die Fähigkeit, den normalen Aufenthaltsort zu verlassen und in benachbartes Gewebe einzudringen. Durch Neuansiedlung in weit entfernten Regionen des Körpers werden neue Tumorherde (Metastasen) gebildet.

Benigne Tumoren können durch chirurgische Eingriffe entfernt werden, womit eine große Chance der Heilung verbunden ist. Bösartige Tumoren werden im Verlauf ihrer Entwicklung immer gefährlicher für den Patienten, da durch

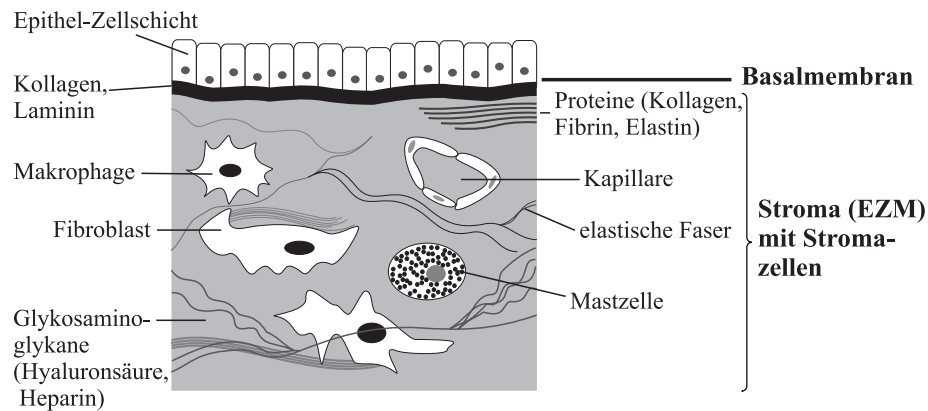
Streuung der Tochtergeschwüre eine punktuelle Behandlung zusehends schwieriger wird, und viele unterschiedliche, lebenswichtige Organe irreversibel geschädigt werden. Die einzelnen Schritte der Tumormetastasierung sind in Abbildung 2.1 dargestellt. Die entarteten Tumorzellen verlassen die extrazelluläre Matrix (ECM) ihres Gewebes, durchdringen die Basalmembran und setzen sich nach Extravasation in fremden Geweben fest. Nach Ausbildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) zur Nährstoffversorgung kann das Tochtergeschwür ungehindert wachsen.<sup>[17]</sup>



**Abbildung 2.1:** Schritte der Tumormetastasierung. A) Ablösen der Krebszellen vom Primärtumor und Invasion; B) Wanderung der Tumorzellen im Blut- oder Lymphsystem; C) Adhäsion im Kapillarsystem; D) Extravasation; E) Festsetzen in fremdem Gewebe und tumorinduzierte Angiogenese.

Die Basalmembran ist eine im Lichtmikroskop sichtbare, dicht gepackte Schicht, die hauptsächlich aus einem Geflecht des Faserproteins Kollagen IV besteht (siehe Abbildung 2.2). Auf der Oberfläche finden sich zahlreiche

heparinsulfathaltige Proteoglykane und die Glycoproteine Entactin und Laminin. Das Stroma besteht aus einem engen Netzwerk von Proteinen (z. B. Elastin, Fibrin und verschiedenen Kollagentypen), Glycoproteinen (z. B. Fibronectin), Glycosaminoglucanen (z. B. Hyaluronsäure) und Proteoglycanen (z. B. Heparin und Heparinsulfat).<sup>[18, 19]</sup>



**Abbildung 2.2:** *Aufbau der Extrazellulären Matrix (ECM) mit der Basalmembran und darunterliegende Stroma.*

Die Bindung der Zellen an die ECM erfolgt über Rezeptoren der Integrin-Superfamilie an adhäsive Proteine wie Laminin oder Fibronectin.<sup>[20]</sup> Die zahlreichen hygroskopischen Makromoleküle bilden eine kompakte Gelmatrix, in die die Zellen des Stromas eingelagert sind, wie z. B. Fibroblasten, Endothelzellen, Lymphozyten und Makrophagen.

### 2.1.2 Die Rolle von Proteasen bei der Tumorprogression und Metastasierung

Sowohl für den invasiven Prozess als auch für die Migration maligner Zellen ist der proteolytische Abbau von Teilen der Basalmembranen und ECM erforderlich. Normale Zellen regeln die Aktivität der zum Abbau der ECM befähigten Proteasen im Rahmen verschiedener physiologischer Wachstums-

und Modifikationsprozesse wie z. B. während der Embryogenese, der Morphogenese und der Wundheilung.<sup>[21]</sup> Proteasen, deren Substrate die ECM darstellen und die für den Abbau der ECM verantwortlich gemacht werden,<sup>[22]</sup> werden aufgrund der verschiedenen aktiven Zentren in vier verschiedene Klassen eingeteilt (siehe Tabelle 2.1).

**Tabelle 2.1:** Die extrazelluläre Matrix abbauende Enzyme und ihr aktives Zentrum.<sup>[23]</sup>

<i>Proteasefamilie</i>	<i>Aktives Zentrum</i>	<i>Beispiele</i>
Serinproteasen	Serin	Plasmin, uPA, tPA <sup>[19]</sup>
Matrixmetallo- Proteinasen (MMP's)	Zink	Kollagenasen, Metalloelastasen, Stromelysine, Gelatinasen <sup>[24]</sup>
Cysteinproteasen	Cystein	Cathepsine B, H und L <sup>[25]</sup>
Aspartatproteasen	Asparaginsäure	Cathepsin D <sup>[26]</sup>

Im Fall der Invasion und Metastasierung ist die Fähigkeit der Tumorzellen besonders darauf konzentriert, mit Hilfe exzessiver perizellulärer Proteaseaktivität Gewebestroma und Basalmembranen zu zersetzen. Obwohl es zahlreiche Proteasen gibt, die Elemente des Gewebestromas spalten können, scheinen vor allem die Familien der Metalloproteasen (MMPs)<sup>[27, 28]</sup> und die Serinproteasen des Plasminsystems<sup>[29-31]</sup> für die betreffenden Prozesse von Bedeutung zu sein. Ein zentrales Element der Aktivierungskaskade der perizellulären Proteolyse ist dabei die Serinprotease urokinaseartiger Plasminogen Aktivator (uPA), die bei der Aktivierung verschiedener ECM-abbauender Enzyme eine entscheidende Rolle spielt (Abbildung 2.3).<sup>[32]</sup>





zu einer Potenzierung der proteolytischen Aktivität, was zu einer Erhöhung der Umsatzgeschwindigkeit führt. Die Bindung der Proteasen an ihre Zellrezeptoren fokussiert dabei die Aktivität auf die Zelloberfläche.<sup>[34]</sup>

Wie aus Abbildung 2.3 ersichtlich, wurden für einige der anderen an der Proteolyse der ECM beteiligten Proteasen, ebenfalls einige natürliche Inhibitoren identifiziert, die entweder ubiquitär vorkommen oder wie die Proteasen selbst von Tumor- bzw. Stromazellen ausgeschieden werden. Zu diesen zählen neben dem bereits erwähnten  $\alpha_2$ -Antiplasmin noch das  $\alpha_2$ -Makroglobulin für Plasmin, sowie Cystatine, Steffine, Kininogene für die Cysteinproteasen und TIMP-1 und -2 für die Matrix-Metalloproteinasen, auf deren Funktion hier aber nicht näher eingegangen werden soll.

Der urokinaseartige Plasminogenaktivator besitzt über seine proteolytische Aktivität innerhalb der Plasminogenaktivierungskaskade hinaus noch die Eigenschaft, eine Reihe weiterer Wachstumsfaktoren zu aktivieren und dadurch die Proliferationsrate zu steigern. Dies konnte durch Zugabe von enzymatisch aktivem uPA und nachfolgender Stimulation der Proliferation von epidermalen Tumorzellen gezeigt werden.<sup>[35-37]</sup> Auf weitere Einzelheiten der unterschiedlichen Enzyme und ihrer Inhibitoren wird in den folgenden Kapiteln eingegangen.

## 2.2 Das Urokinase-Urokinaserezeptor-System und seine biologischen Mechanismen

### 2.2.1 Die Serinprotease Urokinase (uPA)

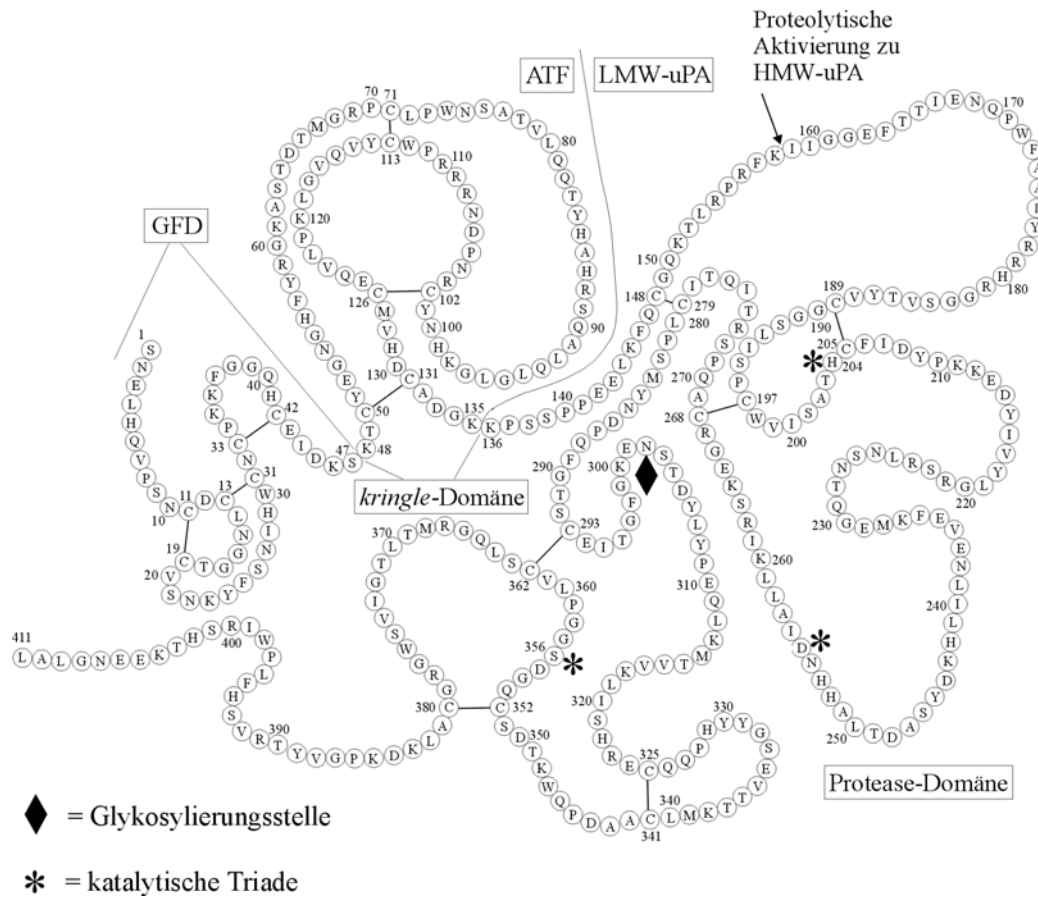
Der urokinaseartige Plasminogenaktivator (uPA) wurde bereits im Jahr 1956 von *Jorgen Ploug* aus menschlichem Urin isoliert und die Proteaseaktivität von uPA festgestellt.<sup>[38]</sup> Urokinase wird in Form des 52 kDa schweren Proenzym pro-uPA u. a. von Endothelzellen<sup>[39]</sup> als einkettiges und enzymatisch kaum aktives Protein exprimiert.<sup>[40, 41]</sup> Die räumliche Struktur des 411 Aminosäuren

langen Proteins wird durch zwölf Disulfidbrücken bestimmt und verfügt mit Asn<sup>302</sup> über eine Glycosylierungsstelle.<sup>[42, 43]</sup>

Das Proenzym lässt sich gemäß der Analyse des Proteins sowie seines zugehörigen Gens, in die drei in Abbildung 2.4 dargestellten Domänen unterteilen:

- Die *N*-terminale wachstumsfaktorähnliche Domäne GFD (*growth factor-like domain*) - bestehend aus den Aminosäuren uPA<sub>1-44</sub> - beinhaltet die Bindungsstelle für den uPA-Rezeptor und ist Teil des aminoterminalen Fragments uPA<sub>1-135</sub> (ATF).<sup>[44]</sup> Wie der Name schon andeutet, bestehen signifikante Sequenzhomologien zum epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) und zum transformierenden Wachstumsfaktor (*transforming growth factor*, TGF- $\alpha$ ).<sup>[42, 43]</sup> Trotz dieser Ähnlichkeit ist die Bindung des uPA-Rezeptors auf die GFD der Urokinase beschränkt; andere homologe Domänen zeigen keine Affinität zu uPAR.<sup>[18]</sup> Darüber hinaus ist die Wechselwirkung GFD/uPAR artspezifisch, d. h. es ist keine Wechselwirkung zwischen uPA und uPAR verschiedener Spezies zu beobachten.<sup>[45]</sup> Die NMR-Struktur des aminoterminalen Fragments von humanem uPA<sub>1-135</sub> wurde von Hansen *et al.* bestimmt.<sup>[46, 47]</sup>
- Der Bereich uPA<sub>45-135</sub> wird als *kringle*-Domäne bezeichnet, ein hoch konserviertes Strukturmotiv, das in einer Reihe an der Hämostase und der Fibrinolyse beteiligten Proteinen auftritt.<sup>[48]</sup> Im Gegensatz zu den *kringle*-Domänen von tPA und Plasminogen besitzt die *kringle*-Domäne der Urokinase allerdings keine Fibrin-Bindungsaffinität,<sup>[49]</sup> sondern bindet an das polyanionische Heparin.<sup>[50]</sup>
- Die *C*-terminale Region uPA<sub>136-411</sub> bildet die enzymatisch aktive Region des Proteins mit den Resten His<sup>204</sup>, Asp<sup>255</sup> und Ser<sup>356</sup> als bekanntem Strukturmotiv einer Serin-Protease mit der katalytischen Triade<sup>[51]</sup> und

wurde im Komplex mit mehreren Inhibitoren röntgenkristallographisch charakterisiert.<sup>[52, 53]</sup>



**Abbildung 2.4:** Primärstruktur und Domänenverteilung der Urokinase.

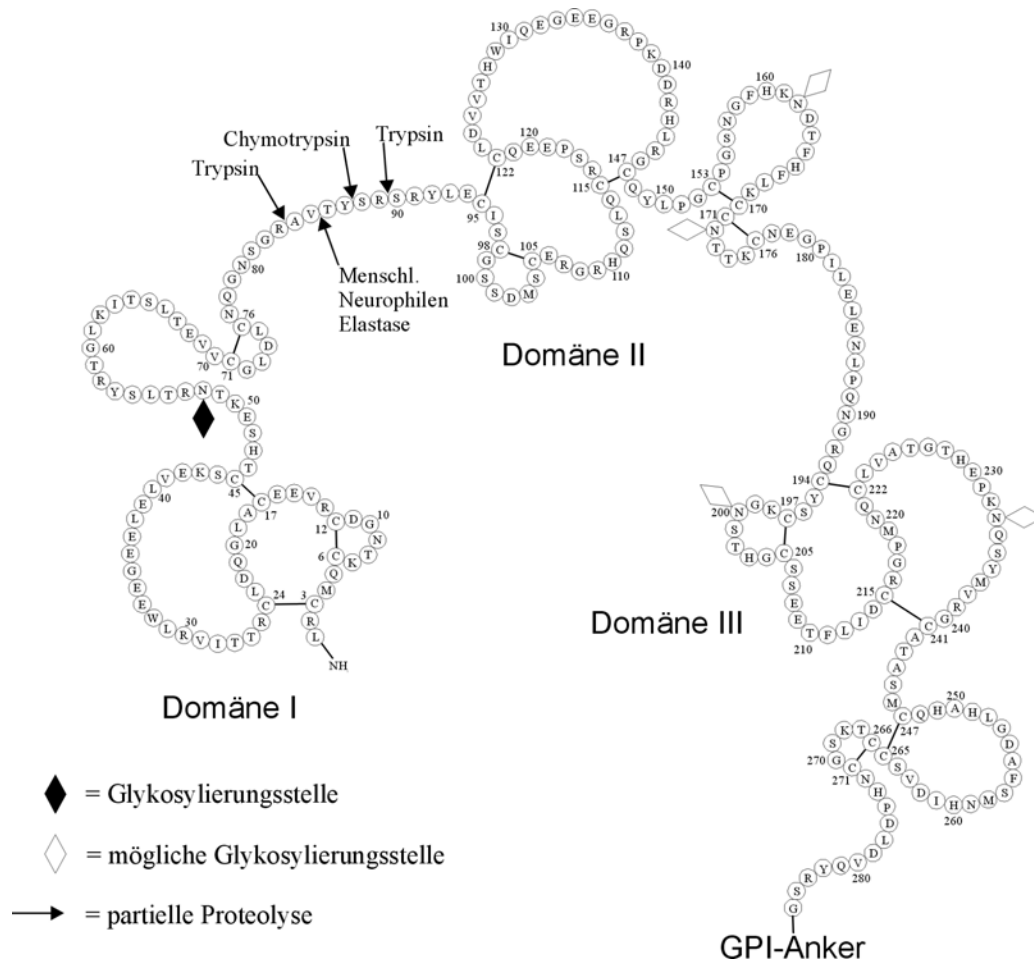
Das inaktive, einkettige pro-uPA wird durch proteolytische Spaltung der Peptidbindung zwischen Lys<sup>158</sup> und Ile<sup>159</sup> zum zweikettigen, enzymatisch aktiven HMW-uPA gespalten, dessen A- (uPA<sub>1-158</sub>) und B-Kette (uPA<sub>159-411</sub>) durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys<sup>148</sup> und Cys<sup>279</sup> verknüpft ist. Durch die mit der Spaltung verbundene Konformationsänderung wird das enzymatisch aktive Zentrum exponiert, wodurch die aktive Form des uPA generiert wird. Diese proteolytische Spaltung kann durch Kallikrein, Cathepsin B/L, den Nerven-Wachstumsfaktor- $\gamma$ , Thrombin oder Plasmin erfolgen, wobei durch letzteres die Aktivierung eine positive Rückkopplung erfährt.<sup>[54-57]</sup> Der so

entstandene HMW-uPA kann durch limitierte Proteolyse zu ATF (uPA<sub>1-135</sub>) und LMW-uPA (uPA<sub>136-411</sub>) hydrolysiert werden, wobei beide Fragmente vollständige biologische Aktivität (Bindung an uPAR bzw. proteolytische Aktivität) zeigen.<sup>[58]</sup> uPA selber besitzt eine hohe Substratspezifität mit Plasminogen als Hauptsubstrat.<sup>[59, 60]</sup>

### 2.2.2 Der uPA-Rezeptor

Der Urokinase-Rezeptor uPAR (CD87) wurde erstmals 1985 auf differenzierten U-937 Leukämiezellen von *Vassalli* und *Stoppelli*<sup>[44, 61]</sup> entdeckt. Nachfolgend wurde dessen Existenz auf einer großen Zahl von malignen und nicht-malignen Zelltypen belegt.<sup>[62, 63]</sup> 1988 wurde uPAR von *Nielsen*<sup>[64]</sup> aus U-937-Zellen isoliert und von *Behrendt* und *Ploug* charakterisiert.<sup>[65-67]</sup>

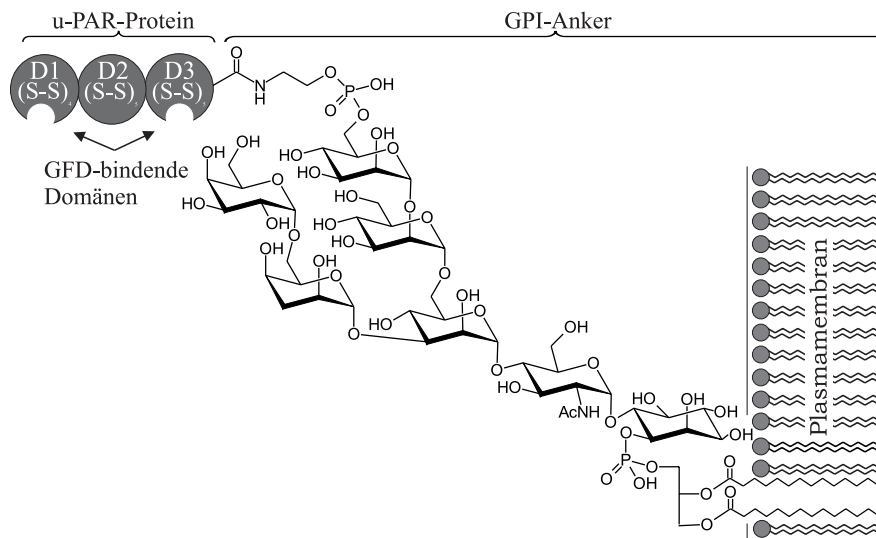
Der Urokinase-Rezeptor wird als ein 335 Aminosäuren enthaltendes Polypeptid sezerniert, das eine N-terminale Signalsequenz enthält und C-terminal einen 15-20 Aminosäuren langen hydrophoben Abschnitt besitzt, der über einen hydrophilen 5-10 Aminosäuren enthaltenden *spacer* mit dem Protein verknüpft ist.<sup>[68]</sup> Während des posttranslationalen *processing* wird zunächst im endoplasmatischen Reticulum die Signalsequenz entfernt und anschließend durch eine Transamidase der hydrophobe Teil abgespalten. Gleichzeitig wird der neu gebildete C-Terminus mit einer Glycolipidstruktur, dem GPI-Anker verbunden, wodurch der biologisch aktive Rezeptor mit 283 Aminosäuren entsteht (siehe Abbildung 2.5).<sup>[69, 70]</sup> Der biologisch aktive Rezeptor besteht aus drei extrazellulären Domänen mit jeweils ca. 90 Aminosäuren, die eine nur geringe Sequenz-Homologie aufweisen.<sup>[65]</sup>



**Abbildung 2.5:** Sequenz und Domänenverteilung des prozessierten uPAR.

Der GPI-Anker besteht aus einer *core*-Struktur, die Ethanolamin, eine variable Sequenz aus verschiedenen Mannosen, *N*-Acetylglucosamin, Phosphatidylinositol und Diacylglycerol enthält (siehe Abbildung 2.6).<sup>[67]</sup> Die Verknüpfung des GPI-Ankers erfolgt bevorzugt über Gly<sup>283</sup>, in geringerem Maß aber auch an Ala<sup>284</sup> oder Ser<sup>282</sup>. Eine Ablösung des Rezeptors von seiner Zellmembranverankerung kann durch Spaltung mittels der phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) bzw. D (PI-PLD) erreicht werden.<sup>[71, 72]</sup> Die dadurch erhaltene lösliche Form des Rezeptors (suPAR) bindet ebenfalls an uPA und kommt in verschiedenen Varianten in konditioniertem Medium verschiedener Zelllinien und in den Körperflüssigkeiten von Krebspatienten vor.<sup>[73]</sup> Für die Entstehung der

verschiedenen Formen löslichen uPARs werden *differential splicing*,<sup>[74-76]</sup> unspezifische Proteolyse und die oben beschriebene PI-PLC verantwortlich gemacht.



**Abbildung 2.6:** Molekulare Struktur des uPAR-GPI-Ankers.

Der Proteinanteil des Rezeptors ist in Abhängigkeit von der exprimierenden Zelllinie zu ca. 30% glycosyliert, wobei ein Molekulargewicht von 45-55 kDa erreicht wird.<sup>[77]</sup> Im Protein sind fünf potenzielle Glycosylierungstellen vorhanden (siehe Abbildung 2.5), von denen vier Verwendung finden.<sup>[68, 77, 78]</sup> Das am C-Terminus liegende Asn<sup>233</sup> wird nicht glycosyliert. Die Glycosylierung ist sowohl für den intrazellulären Transport als auch für die korrekte Faltung des Rezeptorproteins von großer Bedeutung und beeinflusst je nach Art und Ausmaß zusätzlich in einer Art Feinabstimmung die Affinität von uPAR zu uPA. So wird z. B. in einer Mutationsstudie nach Substitution von Asn<sup>52</sup> gegen Gln<sup>52</sup> ein deutlicher Verlust der Bindungsaffinität zu uPA beobachtet und nach vollständiger enzymatischer Deglycosylierung wird ein 35 kDa schweres Protein erhalten, das keinerlei Affinität mehr zu uPA aufweist.<sup>[79]</sup>

Eine weiteres Charakteristikum des uPA-Rezeptors ist der hohe Cysteingehalt von ca. 10% im Proteinanteil. Reduktion der Disulfidbrücken führt wie im Fall der enzymatischen Deglycosylierung zu einem vollständigen Verlust der uPA-Bindungsaffinität.<sup>[32]</sup> Aufgrund des charakteristischen Cysteinmusters der insgesamt 28 Cystein-Reste lässt sich der Rezeptor in drei strukturell homologe Domänen von jeweils ca. 90 Aminosäureresten einteilen. Die einzelnen Domänen zeigen untereinander aber keine Übereinstimmung (weniger als 20% Sequenzidentität) in der Primärstruktur.<sup>[65, 80, 81]</sup> Ein Sequenzvergleich zwischen menschlichem, murinem, bovinem und Ratten-uPAR zeigt allerdings, dass die einzelnen Domänen zwischen verschiedenen Spezies sehr stark konserviert sind<sup>[74, 75, 82]</sup> (mehr als 60% Sequenzidentität). Diese Bindungsdomänentheorie wird durch die Beobachtung gestützt, dass Chymotrypsin und andere Proteasen beim partiellen Verdau den Rezeptor bevorzugt an den Stellen in der Sequenz spalten, die die Domänen miteinander verbinden.<sup>[65, 81, 83]</sup>

Das postulierte Domänenmuster zeigt darüber hinaus Ähnlichkeiten mit dem der Ly-6-Superfamilie,<sup>[84, 85]</sup> zu denen auch die in Schlangengiften enthaltenen  $\alpha$ -Neurotoxine,<sup>[86, 87]</sup> die glycolipidverankerten Eindomänen- (z. B. CD59,<sup>[88, 89]</sup> E48<sup>[90]</sup> und Ly-6<sup>[91]</sup>) und Zweidomänen-Membranproteine (z. B. RoBo-1)<sup>[92]</sup> gehören. Die mutmaßliche Ly-6/ uPAR-Domänenfamilie ist durch ein zentrales sechssträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt charakterisiert, dessen Schleifenregionen eine Drei-Finger-Struktur ausbilden.<sup>[93-95]</sup>

### 2.2.3 Die Bindung von uPA an uPAR

uPA, pro-uPA und die N-terminalen uPA-Domänen binden mit hoher Selektivität und Affinität an uPAR ( $IC_{50} = 5 - 20$  nM, je nach Domäne und Testmethode).<sup>[96-98]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass dafür eine hydrophobe Bindungstasche des intakten uPA-Rezeptors notwendig ist. Wird allerdings durch Chymotrypsin die erste N-terminale Domäne (Aminosäuren 1-87) abgespalten, besitzt nur noch dieses Fragment Bindungsaffinität zu uPA, die



um das 1500-fache herabgesetzt ist.<sup>[65, 99]</sup> Ein weiterer Hinweis darauf, dass Domäne I nur in Kombination mit den anderen Domänen eine stabile Bindungstasche bildet und somit einen hochaffinen Rezeptor für uPA darstellt, ist, dass durch *photoaffinity-crosslinking* mit einem peptidischen Antagonist die Positionen Arg<sup>53</sup>, Leu<sup>66</sup> (beide Domäne I) und His<sup>251</sup> (Domäne III) mit dem Ligand verknüpft werden.<sup>[100, 101]</sup> Außerdem werden Tyr<sup>57</sup> des Rezeptors und Tyr<sup>24</sup> der uPA-GFD nur dann nicht durch Tetranitromethan nitriert, wenn uPA am uPAR gebunden ist; im Gegensatz zu den anderen exponierten Tyr<sup>87,92,149,195,236</sup>-Resten im uPAR.<sup>[102]</sup> In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigen verschiedene Alanin-Mutanten des uPAR in Domäne I einen kompletten Verlust der Bindungsaktivität. Punktmutationen zu Alanin an Arg<sup>53</sup>, Leu<sup>55</sup>, Tyr<sup>57</sup> und Leu<sup>66</sup>, welche sich im dritten Loop von Domäne I befinden, bewirken einen starken Abfall der Bindungsaffinität zu uPA.<sup>[103]</sup> Ähnliche Ergebnisse, dass unterschiedliche Regionen in Domäne I und III des uPAR für die Bindung von uPA verantwortlich sind, werden durch uPAR-Epitope beider Domänen aus einem *phage-display* belegt, die alleine in der Lage sind mit uPA Komplexe zu bilden.<sup>[104]</sup> Darüber hinaus konnten *Bdeir et al.* mit Hilfe von uPAR-Punktmutationen zeigen, dass die Arg<sup>137,142,145</sup> in Domäne II zumindest wichtig für die Interdomänstabilisierung sind.<sup>[105]</sup> Die dreidimensionale Struktur einer der sogenannten LU-Domäne, die sich in der Familie der Ly-6/ uPAR/  $\alpha$ -Neurotoxin-Proteine wiederfindet, wurde für mehrere Proteine bereits aufgeklärt.<sup>[88, 106]</sup> Jedoch besitzt der uPA-Rezeptor drei dieser Domänen, die im Zusammenspiel die Bindungstasche ergeben. Lediglich die Struktur des Proteins  $\kappa$ -Bungarotoxin, bestehend aus zwei der LU-Domänen,<sup>[94]</sup> könnte Aufschluss über die Interdomänen-Wechselwirkung geben.<sup>[107]</sup>

#### 2.2.4 Bindung von uPAR an Vitronektin

1994 wurde zum ersten Mal über die Bindung von uPAR an das extrazelluläre Matrixprotein Vitronektin (VN) des Gefäß-Endothelgewebes berichtet, welche durch Zugabe von ATF (nicht durch das kleinere GFD) oder Urokinase verstärkt wird.<sup>[108-110]</sup> Es wird angenommen, dass durch die Anbindung der uPA-Kringle-Domäne eine Konformationsänderung des uPAR stattfindet, was die Affinität zu Vitronektin erhöht.<sup>[111]</sup> Da die proteolytische Aktivität von Zellen entweder auf die fokalen Adhäsionspunkte oder auf den Apex der Zellen konzentriert ist,<sup>[112]</sup> und Vitronektin an eben diesen Stellen in hoher Konzentration nachgewiesen werden kann,<sup>[113]</sup> ist die Vermutung naheliegend, dass die Fokussierung und die fünffache Verstärkung der proteolytischen Aktivität des uPA-Plasmin-Systems über die Bindung von uPAR an Vitronektin stattfindet.<sup>[114, 115]</sup> Dieser Zusammenhang konnte ebenso mit unterschiedlichen Brustkrebszelllinien nachgewiesen werden.<sup>[116]</sup>

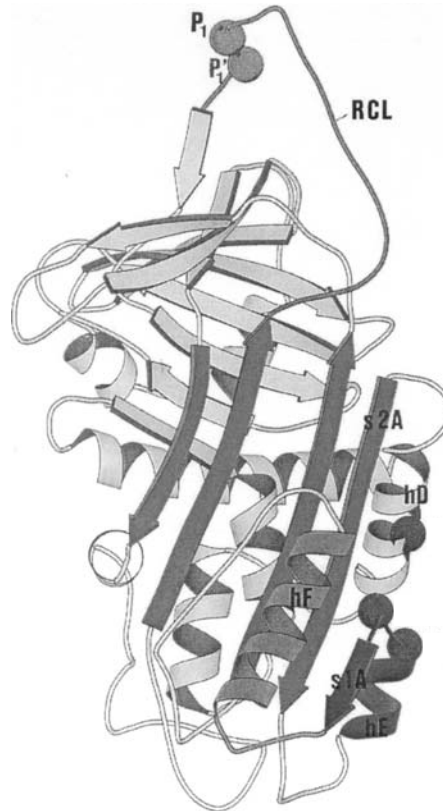
uPAR bindet mit hoher Affinität an die Somatomedin B Domäne des Vitronektins (Gly<sup>12</sup> – Tyr<sup>28</sup>),<sup>[117, 118]</sup> ebenfalls nachgewiesen durch die Bindung von VN-ähnlichen Peptiden, die mit Hilfe von *phage display*-Methoden generiert wurden.<sup>[119]</sup> Welche Region des uPAR umgekehrt für die VN-Bindung zuständig ist, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Sicher ist, dass nur der vollständige uPA-Rezeptor mit allen LU-Domänen an VN bindet,<sup>[120,121]</sup> und dass zwei Epitope der Domänen II und III (uPAR<sub>247-276</sub> und uPAR<sub>154-176</sub>) des uPAR einen Einfluss auf die VN-Adhäsion zeigen.<sup>[104]</sup> Auf jeden Fall ist die uPA-Bindungsstelle des uPAR nicht identisch mit der VN-Bindungsstelle.

Vor kurzem wurde weiterhin festgestellt, dass durch Ausbildung des uPAR-VN-Komplexes eine Oligomerisierung des uPA-Rezeptors initiiert wird, was durch Elektronenmikroskop-Untersuchungen und Biacore-Experimente belegt wurde.<sup>[111, 122]</sup>

### 2.2.5 Die Funktion der natürlichen uPA-Inhibitoren

Wie bereits erwähnt, spielt die Bindung von uPAR an uPA und VN eine wichtige Rolle für das Ausmaß der proteolytischen Aktivierung von Plasminogen und die Fokussierung der proteolytischen Aktivität auf die Zelloberfläche.<sup>[123]</sup> Die Aktivierung von Plasminogen durch uPA wird physiologisch durch die Inhibitoren PAI-1, PAI-2, Protease-Nexin-1 (PN-1) und Protein C Inhibitor (PCI oder PAI-3) kontrolliert.<sup>[124-127]</sup> Diese weisen untereinander starke Sequenzhomologien auf und gehören zur Familie der Serpine (Serinprotease-Inhibitoren),<sup>[128]</sup> wobei PAI-1 und -2 eine deutlich erhöhte Inhibition von uPA im Vergleich zu PN-1 und PCI aufweisen. PAI-1 und PAI-2 binden sowohl an freies als auch rezeptorgebundenes uPA.<sup>[129, 130]</sup> Bei PAI-1 handelt es sich um ein einkettiges Glycoprotein mit einer Masse von etwa 50 kDa, das in seiner biologisch aktiven Form von Endothelzellen, Blutplättchen und verschiedenen Tumorzellen sezerniert wird.<sup>[131, 132]</sup> Dieses ist metastabil und geht spontan in eine latente, inaktive Konformation über.<sup>[133-135]</sup>

Aktives PAI-1 inhibiert uPA (in geringerem Maß auch tPA, LMW-uPA, HMW-uPA, und Plasmin) indem es über einen dem Substrat entsprechenden (*bait* Sequenz), etwa 20 Aminosäuren langen Abschnitt (*RCL-loop*) einen 1:1 Komplex mit uPA bildet (siehe Abbildung 2.7). Dabei wird der Peptidstrang gespalten und der C-Terminus als Ester auf das Serin der katalytischen Triade übertragen.<sup>[136, 137]</sup> Der entstandene freie N-terminale Strang fügt sich als Teil eines  $\beta$ -Faltblattes in das Protein ein und stabilisiert so zusammen mit anderen konformationellen Änderungen (*flexible-joints* Regionen an den Enden der Helices D und E) den Protease-Inhibitor Komplex.<sup>[138]</sup> Die Kristallstruktur von latentem PAI-1 stützt diesen postulierten Reaktionsmechanismus, da im Fall des inaktiven Inhibitors der reaktive *RCL-loop* im Inneren des Moleküls verborgen ist.<sup>[139-141]</sup>



**Abbildung 2.7:** Modell der dreidimensionalen Struktur des aktiven PAI-1 von Aertgeerts et al.<sup>[142]</sup> P1 und P'1 markieren die Spaltstellen durch uPA. Der freiwerdende RCL-loop lagert sich als vierter Strang an die Region von  $\beta$ -Strang s2 an, während die Regionen um Helix D (hD) und Helix E (hE) weitere Umorientierung erfahren. An der Bindung von Vitronektin sind Helix E (hE), Helix F (hF) und  $\beta$ -Strang 1A beteiligt.

PAI-1 bindet ebenso wie uPAR an Vitronektin.<sup>[143]</sup> Dadurch wird *in vivo* die biologisch aktive Form von PAI-1 stabilisiert, bzw. die latente Form in die aktive überführt.<sup>[144, 145]</sup> Umgekehrt beeinflusst die Bindung von PAI-1 an Matrix- oder Plasma-Vitronektin aber nicht dessen Adhäsionseigenschaften für uPA.<sup>[143]</sup> Der daraus resultierende desaktivierte uPA/ PAI-1-Komplex löst daraufhin von der ECM ab und kann an den uPAR binden.<sup>[117]</sup>

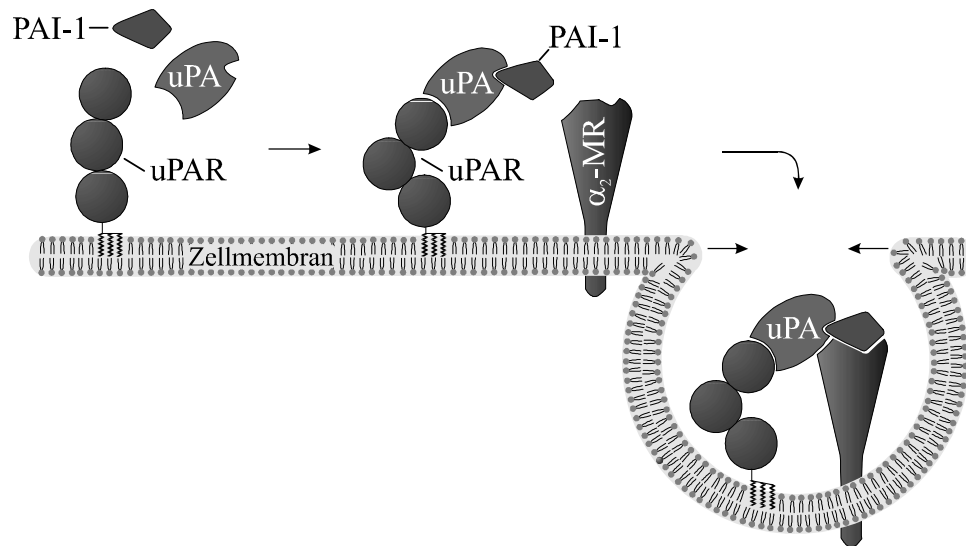
Da PAI-1 und uPAR beide an die Somatomedin B Domäne des Vitronektins binden, die Bindung zwischen PAI-1 und VN aber um das 30-fache stärker ist,

kommt es durch hohe PAI-1-Konzentrationen zur Verringerung der Zelladhäsion an der ECM um ca. 80%.<sup>[110, 117, 146, 147]</sup> Darüber hinaus steht das  $\alpha\beta 3$ -Integrin (siehe Kapitel 3.5) auch mit PAI-1 in Konkurrenz um die Bindung an VN, da die RGD-Sequenz des VN für die Bindung an das Integrin in Nachbarschaft zur Somatomedin B Domäne liegt, und diese somit bei Bindung von PAI-1 an VN blockiert wird.<sup>[118, 148]</sup> Über diesen Mechanismus kann auch die Antiangiogeneseeigenschaft von PAI-1 erklärt werden.<sup>[149]</sup> Es bestehen somit zwei Einflussmöglichkeiten für PAI-1, die Zell-Migration und Adhäsion auf VN lokal zu unterbinden. Man kann sich gut vorstellen, dass die Zelle dadurch zu Bereichen der ECM wandert, in denen noch hohe Konzentrationen an uPA und VN vorherrschen, um dort proteolytisch aktiv zu werden.

PAI-2 kommt in Form eines 47 kDa schweren intrazellulären Proteins und als glykosyliertes, extrazelluläres, 60 kDa schweres Glycoprotein vor, das von Phagozyten und in Tumorzellen produziert wird.<sup>[124, 150]</sup> PAI-2 zeichnet sich gegenüber PAI-1 durch eine deutlich größere Stabilität aus und bindet ebenfalls überwiegend uPA in Form eines 1:1 Inhibitor-Protease-Komplexes.<sup>[151]</sup> PN-1 dagegen ist ein unspezifischer Proteaseinhibitor, der uPA, Plasmin, Thrombin und Trypsin inhibiert, wobei die Proteasespezifität über extrazelluläre Matrixkomponenten wie Kollagene reguliert wird.<sup>[152]</sup>

Im Anschluss an die Bildung der ternären Komplexe aus uPA/uPAR/PAI-1, uPA/uPAR/PAI-2 oder uPA/uPAR/PN-1 erfolgt die Anlagerung z. B. an den  $\alpha_2$ -Makroglobulin-Rezeptor ( $\alpha_2$ -MR) oder das epithelische Glycoprotein gp330.<sup>[153-155]</sup> Diese gehören zu einer Familie sogenannter *low-density lipoprotein receptors* (LDLR) von denen in Säugetieren sechs Mitglieder bekannt sind und die allgemein an der Internalisierung von Lipoproteinen und anderer Proteinase/Inhibitor-Komplexe beteiligt sind. Sowohl uPA als auch uPAR besitzen Bindungsstellen für beide Rezeptoren.<sup>[156, 157]</sup> Diese

Komplexbildung aus z. B. uPA/uPAR/PAI-1/ $\alpha_2$ -MR und sieben bis acht weiteren Einheiten der Endocytoserezeptoren LDLR, VLDLR, apoER2, LR8B,  $\alpha_2$ -MR und gp330 führt zur Internalisierung (siehe Abbildung 2.8) des supramolekularen Komplexes<sup>[158, 159]</sup> und anschließendem Abbau im Cytoplasma, wobei die freien Rezeptoren nach der Exocytose wieder auf der Oberfläche an den fokalen Adhäsionspunkten präsentiert werden.<sup>[160]</sup> Es kommt somit durch erhöhte Konzentration an uPA zum verstärkten proteolytischen Abbau der ECM in der direkten Umgebung der Tumorzelle unter Verbrauch von PAI-1 und uPA.

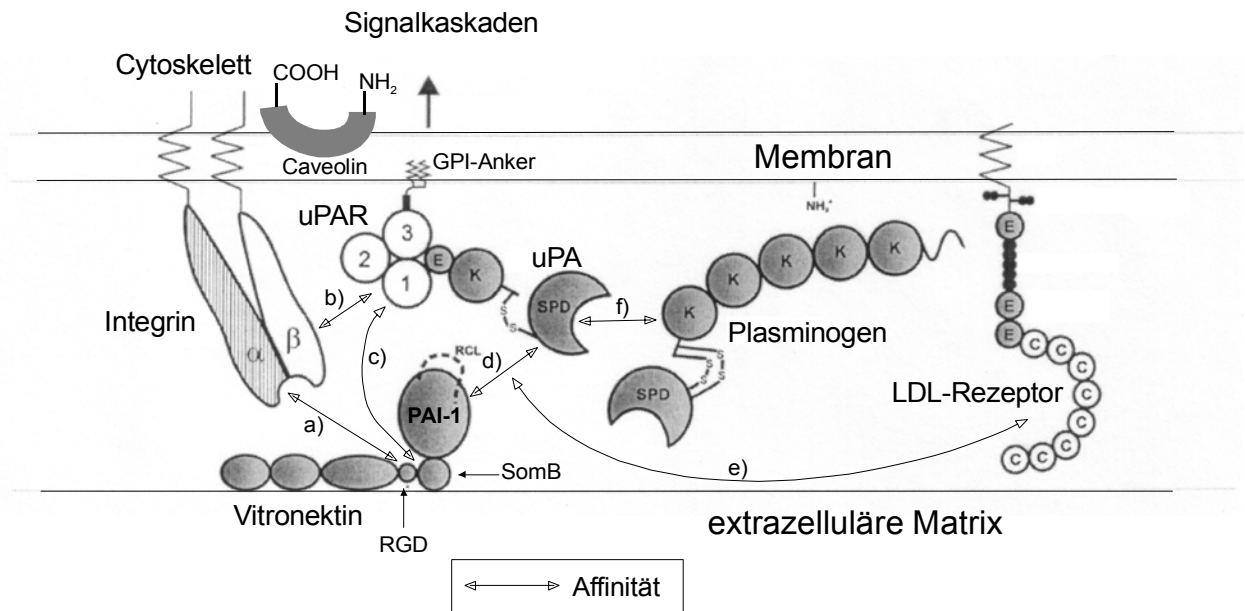


**Abbildung 2.8:** Internalisierung des PAI-1/uPA/uPAR-Komplexes.

### 2.2.6 Wechselwirkung von uPAR und Integrinen und Auswirkungen auf die Signaltransduktion

Wie im vorherigen Kapitel bereits erläutert, steht der Urokinase-Rezeptor und PAI-1 in Konkurrenz mit den  $\alpha\beta_3$ -Integrinen um die Bindung an Vitronektin (siehe Abbildung 2.9). In den letzten Jahren jedoch wurden auch direkte Wechselwirkungen zwischen uPAR und Integrinen entdeckt, die

Auswirkungen auf Zell-Proliferation, Migration und Adhäsion haben.<sup>[161-163]</sup> Besonders auffällig war, dass durch Bindung von uPA oder ATF an membrangebundenem uPAR Zellmigration ausgelöst wurde, obwohl für diesen Prozess transmembrane Stimulation der Signaltransduktionskaskade notwendig ist und dies von einem GPI-verankerten Protein ohne Kontakt zum Zellinneren nicht erwartet wird.<sup>[164, 165]</sup>



- a) bei  $\alpha\beta 3$ -Integrin, durch PAI-1 inhibiert, da RGD-Sequenz blockiert
- b) direkte Bindung bei Mac-1-Integrin
- c) verstärkte Bindung an VN bei uPA/uPAR-Komplex, durch PAI-1 inhibiert, da SomB blockiert
- d) irreversible Bindung, Blockierung der uPA-Aktivität, Loslösen von uPA/PAI-1 von VN
- e) anschließend Internalisierung von uPA/uPAR/PAI-1-Komplex
- f) Aktivierung der ECM-Proteolyse

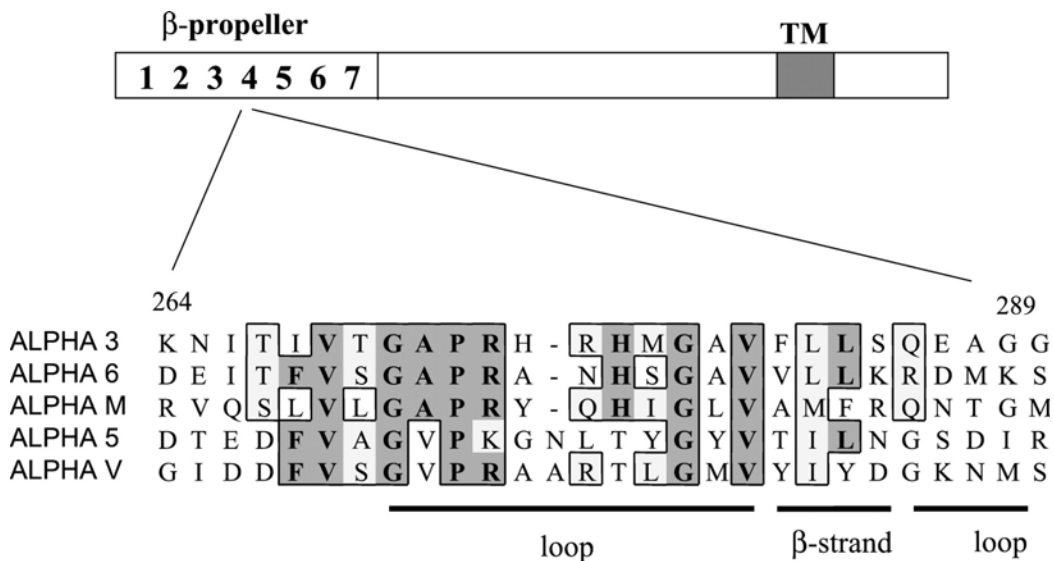
**Abbildung 2.9:** Schematische Zusammenfassung der mit dem uPA/uPAR-System in Verbindung stehenden Hauptmechanismen. Die Urokinase besteht aus einer Serinproteasedomäne (SPD), einer kringle-Domäne (K) und einer epidermal growth factor-Domäne (E) und bindet an die drei Domänen des uPA-Rezeptors. Dieser wiederum steht in Konkurrenz mit dem uPA-Inhibitor PAI-1 um die Bindung an die Somatomedin B Domäne (SomB) des Vitronektins (VN).

Da uPAR die Funktion des Leukozytenintegrins Mac-1 ( $\alpha$ M $\beta$ 2) beeinflusst, wurde bereits 1995 vermutet, dass uPAR über direkten Kontakt mit Integrinen Signale in der Zelle stimuliert.<sup>[114, 163, 166-168]</sup> *Chapman et al.* konnte nachweisen, dass bei Überexpression von uPAR auf embryonalen 293-Nierenzellen die natürliche Zelladhäsion an Fibronectin unterdrückt wird, während gleichzeitig eine verstärkte Affinität für Vitronectin auftritt.<sup>[169]</sup> Unter Verwendung einer *phage display* Bibliothek mit uPAR als Zielstruktur konnte das Peptid „Clone 25“ (AESTYHHLSLGYMYTLN) gewonnen werden, das die Affinität zwischen isoliertem Mac-1 und suPAR inhibiert,<sup>[169]</sup> und dadurch die oben genannte Zellaffinitätswechsel von Fibronectin auf VN wieder aufhebt. Das heißt, dass durch Aufhebung der uPA/Mac-1-Wechselwirkung durch ein Peptid die ursprüngliche Funktion von Mac-1 wieder hergestellt wird. Durch Sequenzvergleich des an uPAR bindenden Peptids 25 mit den  $\alpha$ -Untereinheiten von Integrinen wurden Epitope gefunden, die alle an der selben Position in  $\alpha$ M,  $\alpha$ 3 und  $\alpha$ 6-Integrinen im vierten Faltblatt des  $\beta$ -Propellers liegen, und die ebenfalls an uPAR binden (Abbildung **2.10**).<sup>[119, 170]</sup> Durch die Assoziation der entsprechenden  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Integrinepitope (z. B. von  $\alpha$ 3 $\beta$ 1) mit uPAR konnten Verhaltensänderungen in Adhäsion und Migration erzielt werden.<sup>[171]</sup> Die entsprechenden Epitope aus  $\alpha$ v oder  $\alpha$ 5 zeigten dagegen keine Affinität zum uPA-Rezeptor.

Besonderen Stellenwert erlangt diese Sequenzhomologie durch die Aufklärung der 3D-Struktur des  $\alpha$ v $\beta$ 3-Integrins<sup>[172]</sup> und die damit verbundene Lokalisierung der Bindungsstelle in einem dem Lösungsmittel zugänglichen Loop am Rand des  $\beta$ -Propellers der  $\alpha$ -Untereinheit. Daraus lassen sich Rückschlüsse auf die Lage der an uPAR bindenden  $\alpha$ M,  $\alpha$ 3 und  $\alpha$ 6-Epitope ziehen und evtl. sogar Mechanismen der Integrinaktivierung ableiten.<sup>[173, 174]</sup> Die Bindungsstelle im uPAR für diese Peptide wurde auf Domäne II und III lokalisiert, da suPAR auch nach proteolytischer Abspaltung der Domäne I ohne Aktivitätsverlust an Integrine bindet.<sup>[175]</sup> An die selben zwei Domänen des



uPAR bindet auch das Protein Kininogen, welches durch Affinität zu Integrinen und Vitronektin die Leukozytenadhäsion auf Fibrinogen moduliert.<sup>[176, 177]</sup>



**Abbildung 2.10:** Aminosäuresequenzen des W4-Faltblattes aus dem  $\beta$ -Propeller von  $\alpha$ -Integrinen. Die für die Bindung an uPAR minimale Sequenz liegt zwischen den Aminosäuren 274-285. Auffällig ist, dass die nicht an uPAR-bindenden Epitope von  $\alpha 5$  und  $\alpha v$  um eine Aminosäure verlängert sind und in Position 277 ein Thr statt eines für die Bindung wichtiges His tragen.<sup>[119]</sup>

Aber auch andere Integrine (u.a.  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 9\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ), die anscheinend keine direkte Wechselwirkung mit uPAR eingehen, sind für uPAR-vermittelte Zell-Migration oder Proliferation verantwortlich.<sup>[175, 178-183]</sup> So werden zum Beispiel durch Störung von uPA/uPAR/ $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Komplexen auf Zellmembranen *in vivo* Hep3-Tumorzellen in der  $G_0/G_1$ -Phase des Zellzyklus festgehalten und somit in den Schlafzustand versetzt. Im umgekehrten Fall kommt es gerade bei erhöhter uPAR-Konzentration zu starker Proliferation der Hep-3-Zellen<sup>[184-186]</sup> Fernerhin hat der Einfluss von uPAR auf  $\alpha v\beta 5$  eine Umstrukturierung des Cytoskeletts und damit der Zellmigration von

Brustkrebszellen (HT1080 und MCF-7) auf VN zur Folge.<sup>[187-189]</sup> Als letztes sei die über  $\alpha 4\beta 1$ -vermittelte Zell-Zell-Adhäsion von Leukozyten in Entzündungsprozessen genannt, die durch das Zusammenspiel von  $\beta 2$ -Integrinen und uPAR ausgelöst wird.<sup>[180, 181]</sup>

Für die Weiterleitung von Signalen ins Zellinnere über den uPA-Rezeptor<sup>[190]</sup> wurden neben den Integrinen Adaptermoleküle wie die integrinassoziierten Membranproteinen CD47, CD98 und CD59<sup>[191-193]</sup> und das cholesterolbindende Protein Caveolin identifiziert. Caveolin ist kein transmembranes Protein, da sich N- und C-Terminus im Cytosol befinden und der mittlere Teil des Proteins unter Ausbildung eines Loops in der Membran verankert ist.<sup>[194]</sup> Trotzdem können zusammen mit uPAR und  $\beta 1$ -Integrinen für die Signaltransduktion wichtige Komplexe gebildet werden, welche Auswirkungen z. B. auf das Zellwachstum haben.<sup>[195, 196]</sup> In einem anderen Fall wird die Adhäsion von menschlichen Nierenzellen auf Fibronectin durch vermehrte Expression von uPAR unterbunden; im Gegenzug aber durch erhöhte Konzentration von Caveolin in der Zellmembran die Adhäsion zu FN wieder hergestellt.<sup>[197]</sup> Die Signaltransduktion bedient sich dabei der Familie der Src-Tyrosinkinasen und der *focal adhesion kinase* (FAK). Andere Signalkaskaden wie im Fall des Nierenepitheltumors bedienen sich dagegen des JAK-/STAT-Weges (zuständig für Transkription und DNA-STAT-Anbindung) in Kombination mit dem Transmembranglycoprotein gp130.<sup>[198, 199]</sup> Auch der Raf-Mek-ERK-Signalweg, der für Adhäsion und Migration zuständig ist, wird in Brustkrebszellen durch uPAR-Integrin-Wechselwirkungen moduliert.<sup>[184, 200, 201]</sup> In allen Fällen ist ein intakter uPA-Rezeptor auf der Zelloberfläche notwendig, da durch Blockierung (Antikörper, Antagonisten) oder PI-PLC-Abspaltung des Rezeptors die uPA-vermittelte Signalkaskade ins Zellinnere blockiert wird. Es ist zwar noch nicht vollständig geklärt auf welche Weise, aber es ist sicher, dass die Integrin-uPAR-Wechselwirkung dem GPI-verankerten uPAR trotz seiner fehlenden Transmembrandomäne eine Teilnahme an der Regulation von Adhäsion, Migration und Proliferation in bestimmten Zelltypen erlaubt.

## 2.3 Bedeutung des uPA/uPAR-Systems in der Krebsmedizin

### 2.3.1 Tumorprognose mit Hilfe von uPA und PAI-1

Im Rahmen einer Tumorthherapie kommt der Risikoabschätzung einer Neuerkrankung nach einer chirurgischen Entfernung eines Karzinoms große Bedeutung zu. Auf ihrer Grundlage findet die Entscheidung für eine weitere Nachbehandlung statt (Chemotherapie oder Bestrahlung) und dient so zur Minimierung der Belastung für den Patienten bei größtmöglichem therapeutischen Erfolg. Um das Risiko einer Fehleinschätzung und den damit verbundenen negativen Folgen für den Patienten zu minimieren, bedarf es eines möglichst zuverlässigen Testsystems mit dessen Hilfe die Rezidivwahrscheinlichkeit möglichst genau und einfach zu ermitteln ist.

Nach der Entdeckung des Enzyms uPA durch *White et al.* 1966<sup>[202]</sup> stieg das Interesse an diesem Enzymsystem 1976 stark an, nachdem *Åstedt et al.* beobachteten, dass uPA von Zellen des menschlichen Ovarialkarzinoms stark überexprimiert wird.<sup>[203]</sup> In einem *in vitro*-Versuch wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass die Fähigkeit humaner Kolonkarzinomzellen eine Matrigelmatrix zu durchwandern vom Sättigungsgrad der Oberflächen-uPAR mit uPA abhängt.<sup>[204]</sup> Genauere Untersuchungen am Menschen haben ergeben, dass nach der operativen Entfernung von verschiedenen Tumorarten hohe Werte von uPA mit einer geringen Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert sind, was aufgrund der bereits ausführlich geschilderten Bedeutung des proteolytischen Systems uPA/uPAR durchaus verständlich ist.<sup>[205-207]</sup> Aber auch der uPA-Rezeptor wird im Fall von Krebs (Brust-, Leber- und Darmkrebs, Leukämie) verstärkt auf Zelloberflächen präsentiert,<sup>[208-210]</sup> was dazu führt, dass z. B. erhöhte Konzentrationen von uPAR-Bruchstücken im Urin von Leukämiepatienten detektiert werden; die sich durch chemotherapeutische Behandlung wieder absenken lassen.<sup>[211]</sup> Eine ähnliche prognostische Aussagekraft findet sich überraschenderweise auch für den natürlichen Urokinaseinhibitor PAI-1, wobei dieser zusammen mit uPA den größten

prognostischen Wert aufweist.<sup>[212]</sup> Erklärt werden kann dies durch die Funktionen des PAI-1 in Bezug auf Internalisierung und verringerte Zelladhäsion (siehe Kapitel **2.2.5**).

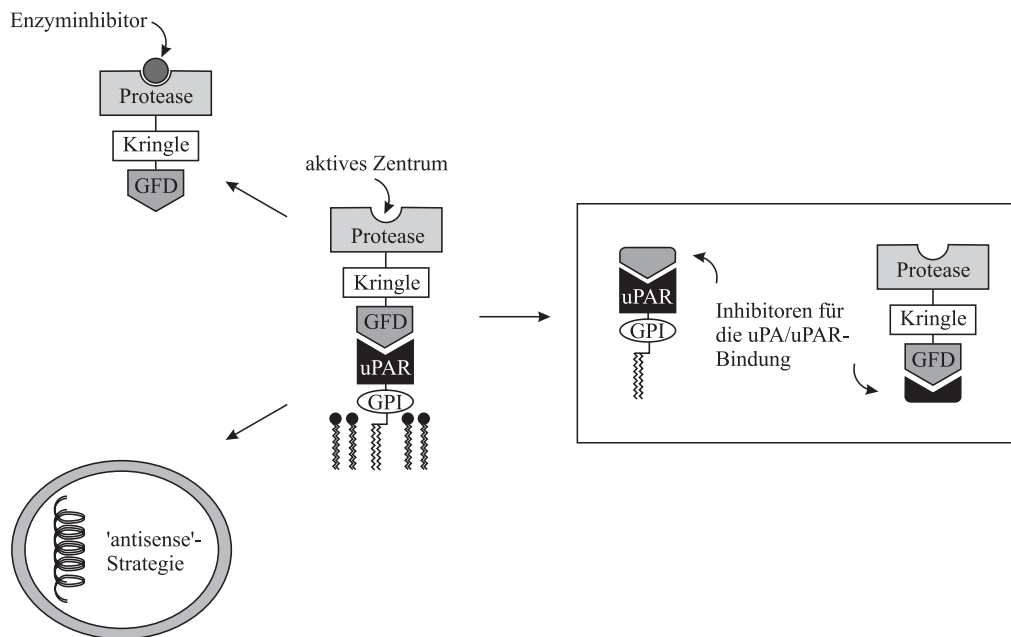
Durch Entwicklung eines grundlegenden Modells, das Informationen wie Alter, menopausalen Status, Tumorgroße(n) und -grad, Lymphknotenstatus, unterstützende Therapie, Steroidhormon-Rezeptorstatus und andere Faktoren berücksichtigt, konnten uPA, PAI-1 und PAI-2 als voneinander unabhängige Marker für die individuelle Überlebens- und Rezidivwahrscheinlichkeit im Fall von Brustkrebs etabliert werden.<sup>[213]</sup> In einer aktuellen Studie von *Foekens et al.* konnte in einer Gruppe von 2780 Brustkrebspatientinnen der prognostische Wert von uPA und PAI-1 eindrucksvoll belegt werden.<sup>[214]</sup> Patientinnen mit hohen uPA- und PAI-1-Konzentrationen im Blut haben demnach eine stark verringerte Überlebenschance.

Diese Ergebnisse belegen, dass die Bemühungen der letzten Jahre, neue Marker für die Prognose der rezidivfreien, bzw. Gesamtüberlebenszeit von Patienten mit soliden Tumoren zu identifizieren, erfolgreich durchgeführt werden konnte und die entsprechenden FACS-, ELISA- und immunohistochemischen Testsysteme schon in naher Zukunft zum Standardarsenal bei der Entwicklung individueller Tumortherapien gehören werden.

### **2.3.2 Ansätze für die Tumortherapie**

Das uPA/uPAR-System hat - wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben - im Tumorgeschehen enorme Auswirkung auf Metastasierung und Zellwachstum, da gleich mehrere regulatorische Prozesse im negativen Sinn beeinflusst werden. Um darauf Einfluss zu nehmen, werden mehrere Konzepte der Tumorintervention in bezug auf das uPA/uPAR-System untersucht und bereits im geringen Maße z. B. für diagnostische Zwecke angewandt. Dazu gehören folgende Strategien (Abbildung **2.11**):

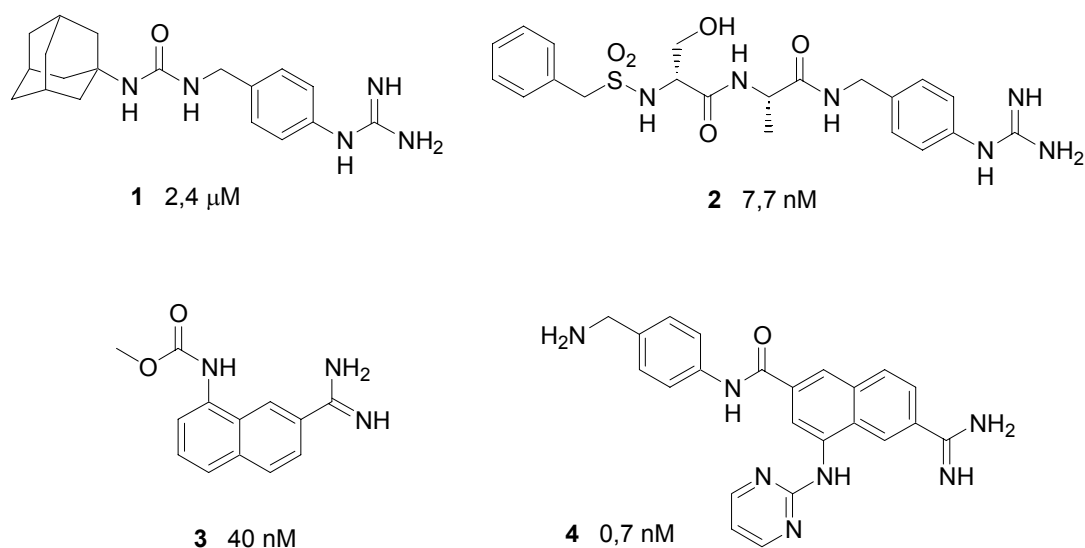
- Selektive Inhibierung des enzymatischen Zentrums der Serinprotease uPA durch niedermolekulare Proteaseinhibitoren.
- Unterdrückung der Expression der an dem proteolytischen System beteiligten Proteine durch *antisense*-Strategie bzw. individuelle Gentherapie zur Eliminierung der an der Expression der proteolytischen Faktoren beteiligten Gene.
- Einsatz von uPAR-Antagonisten und Antikörpern, die die Bindung von uPA an uPAR verhindern.



**Abbildung 2.11:** Grundsätzliche Strategien für die Entwicklung von Therapeutika im uPA/uPAR-System.

Neben den natürlichen vorkommenden uPA-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 wurden in den letzten Jahren eine Reihe von bioaktiven niedermolekularen Serinproteaseinhibitoren entwickelt.<sup>[215, 216]</sup> Die Inhibition des katalytischen Zentrums scheint zwar der schnellste Weg zu einem oral bioverfügbaren Wirkstoff zu sein, allerdings ist die Frage der *target*-Spezifität von sehr großer Bedeutung. Da eine große Zahl von Serinproteasen essentielle Aufgaben im Körper übernehmen (z. B. Blutgerinnung und andere Aktivierungskaskaden), kann die ungewollte Blockierung des enzymatischen Zentrums einer anderen

Serinprotease als uPA dramatische Auswirkungen auf den Organismus haben. Die Schwierigkeit besteht darin, durch chemische Modifikationen eines für Serinproteasen typischen Grundgerüsts (z. B. Arginin oder Argininmimik) die Selektivität zu steuern. Im Fall der Urokinase muss eine Abgrenzung der biologischen Aktivität in Bezug auf tPA, Plasmin, Trypsin, Thrombin und Faktor Xa vorhanden sein. Besonders hilfreich für das Verständnis des Bindungsmodus und das Design von selektiven Inhibitoren war die Kristallisation von uPA mit niedermolekularen Liganden und die darauf folgende Strukturaufklärung der Komplexe mittels Röntgenbeugung.<sup>[52, 53, 217-219]</sup> Einige ausgewählte uPA-Inhibitoren sind in Abbildung 2.12 dargestellt:



**Abbildung 2.12:** *Niedermolekulare Proteaseinhibitoren für uPA mit Angabe von IC<sub>50</sub>-Werten.<sup>[53, 218, 220, 221]</sup> Die geringen Selektivitäten gegenüber anderen Proteasen schränkt bisher die Anwendung der Inhibitoren als Medikament stark ein.*

Die Unterdrückung der uPA- bzw. uPAR-Expression mittels *antisense*-Strategie oder Gentherapie wurde bereits in präklinischen Studien untersucht. Die dabei erzielten Effekte im Mausversuch waren ein verringertes Tumorwachstum, Inhibition von Angiogenese und längere

Überlebensdauer.<sup>[184, 222-226]</sup> Obwohl einigermaßen erfolgreich, sind diese Nukleotid-basierenden Methoden in ihrer Anwendung begrenzt, da der Transport zum Wirkort und potenzielle immunologische Komplikationen gravierende Probleme darstellen.

Die Entwicklung von uPAR-Antagonisten - als die wohl aussichtsreichste Methode - wird im nächsten Kapitel ausführlich behandelt. Die Verwendung von monoklonalen Antikörpern zur Unterdrückung der uPA/uPAR-Wechselwirkung findet noch keine Anwendung in der Therapie. Jedoch in *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass durch Gabe von Antikörpern gegen uPAR die Bildung von Brustkrebs in Ratten unterdrückt werden konnte.<sup>[227]</sup> Noch zu erwähnen ist die von der Firma *Ångstrom Pharmaceuticals* gefundene nicht-GFD Peptidsequenz Å6 (Sequenz: Ac-K-P-S-S-P-P-E-E-NH<sub>2</sub>), die die Bindung von uPA an uPAR im nanomolaren Bereich inhibiert.<sup>[228]</sup>

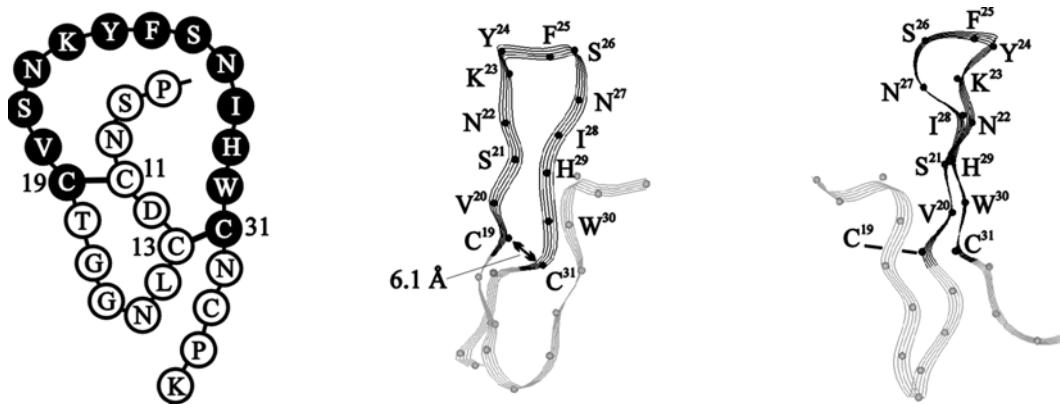
### 2.3.3 Entwicklung von uPAR-Antagonisten

#### 2.3.3.1 Entwicklung von *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>

Da die Anbindung von uPA an uPAR hochspezifisch verläuft, wäre die Unterbindung dieser Wechselwirkung eine wirksame Maßnahme, um einerseits Zellwachstum und Migration von Tumorzellen und andererseits die für die Metastasierung wichtige Proteolyse der ECM zu blockieren.

Der Ausgangspunkt für die diesbezüglichen Entwicklungen in unserem Arbeitskreis war die von *Appella et al.* 1987 gefundene Proteinsequenz [Ala<sup>19</sup>]uPA<sub>12-32</sub>, die die Anbindung von uPA an uPAR inhibiert.<sup>[97]</sup> Dieses Epitop stammt aus der GFD-Domäne der Urokinase, von der bekannt war, dass es für die Rezeptoranbindung des uPA verantwortlich ist.<sup>[44]</sup> Ausgehend von dieser Sequenz gelang es *M. Koppitz* durch N- bzw. C-terminale Verkürzung des Peptids den Inhibitor uPA<sub>16-32</sub> zu entwickeln (IC<sub>50</sub> = 4 µM), wobei sich durch einen *Ala-scan* (einzelner Austausch von Aminosäuren gegen Alanin)

die Aminosäuren Cys<sup>19</sup>, Tyr<sup>24</sup>, Phe<sup>25</sup>, Ile<sup>28</sup>, Trp<sup>30</sup> und Cys<sup>31</sup> für die Bindung als wichtig erwiesen haben.<sup>[229]</sup> Ausgehend von diesen Arbeiten konnte *M. Bürgle* dieses Peptid weiter zu dem cyclischen Peptid *cyclo*[19,31]-uPA<sub>19-31</sub> **5** verkürzen, das bereits einen IC<sub>50</sub>-Wert von 300 nM aufweist.<sup>[230, 231]</sup> Im Vergleich mit der von *Fesik et al.* ermittelten ATF-Struktur<sup>[46, 47]</sup> wird deutlich, dass die künstlich geschaffene Cysteinbrücke Cys<sup>19</sup>-Cys<sup>31</sup> mit einem Abstand von 5.2 Å die beiden β-Stränge (Cys<sup>19</sup>-Ser<sup>21</sup> und His<sup>29</sup>-Cys<sup>31</sup>) zwischen Cys<sup>19</sup> und Cys<sup>31</sup> überbrückt. Der an dieser Stelle in der ursprünglichen Struktur der Urokinase vorhandene Abstand beträgt 6.1 Å (Abbildung 2.13). Wird dieser Abstand jedoch weiter verkürzt (z. B. durch Einbau einer Lanthionin-Brücke, d. h. ein Schwefelatom weniger), sinkt die Aktivität des Peptids wieder ab,<sup>[232, 233]</sup> was darauf hindeutet, dass nur geringfügige Abstandsänderungen toleriert werden.



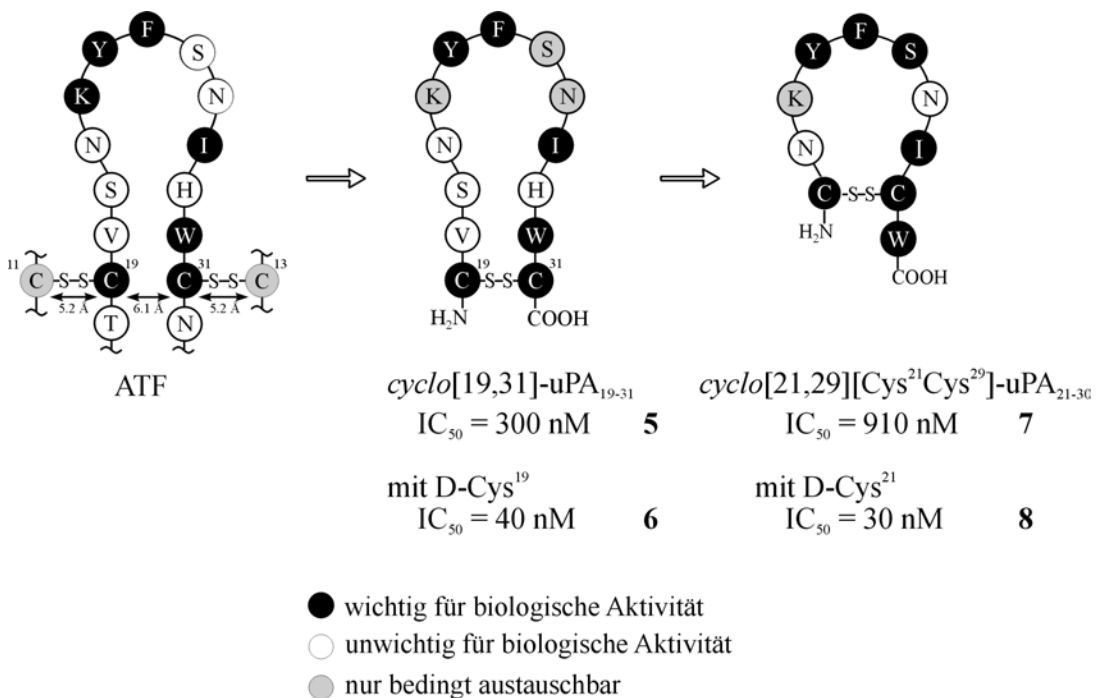
**Abbildung 2.13:** Sequenz und NMR-Struktur der uPAR-bindenden Domäne von uPA. Die Sequenz des Bindungssepitops ist dunkel hervorgehoben.

Dass die Cysteinbrücke hauptsächlich über die Steuerung der Peptidkonformation Einfluss auf die Aktivität von *cyclo*[19,31]-uPA<sub>19-31</sub> nimmt, wird dadurch belegt, dass bei Ersatz des Cys<sup>19</sup> gegen D-Cys<sup>19</sup> die Aktivität auf einen IC<sub>50</sub>-Wert von 40 nM gesteigert werden kann. Das daraus resultierende Peptid *cyclo*[19,31][D-Cys<sup>19</sup>]-uPA<sub>19-31</sub> **6** kann anscheinend die für die Bindung an uPAR nötige Konformation des ω-loops der Bindungsregion



besser stabilieren als das Vorläuferpeptid *cyclo*[19,31]-uPA<sub>19-31</sub> **5**. Wahrscheinlich muss bei Verlagerung der Disulfidbrücke die Chiralität des Cys<sup>19</sup> umgedreht werden, um die räumliche Orientierung der Aminosäuren im Ring zu erhalten.

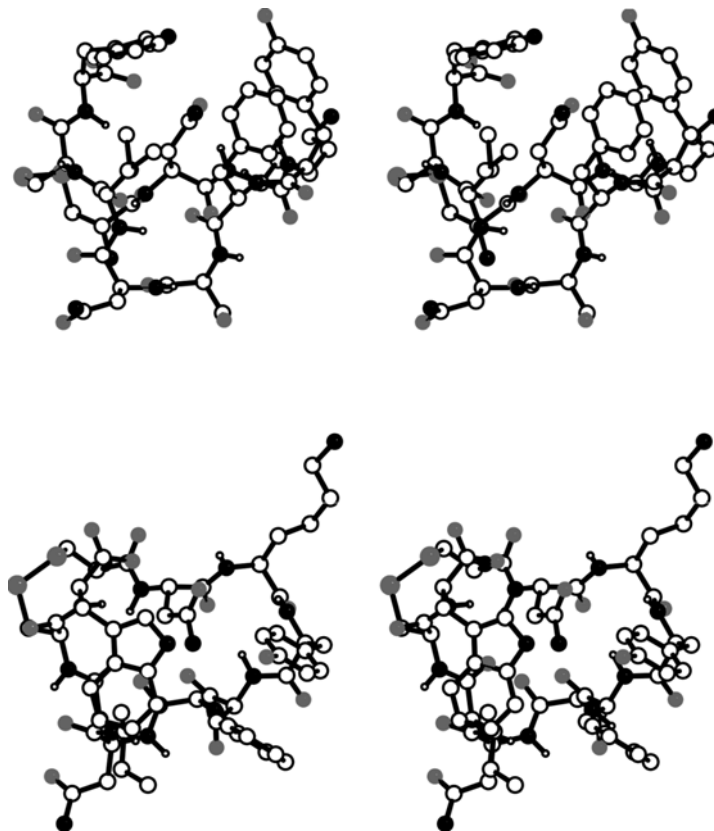
In einem weiteren Ala-scan von *cyclo*[19,31]-uPA<sub>19-31</sub> **5** wurde wiederum die Bedeutung der Reste Tyr<sup>24</sup>, Phe<sup>25</sup>, Ile<sup>28</sup> und Trp<sup>30</sup> für die biologische Aktivität deutlich; in einem D-scan (Austausch der Aminosäuren gegen die entsprechenden D-Aminosäuren) die Bedeutung der Seitenkettenorientierung für die Konformation des Cyclopeptids. Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde die Disulfidbrücke unter Deletion der nicht-essentiellen Aminosäuren (Val<sup>20</sup>, Ser<sup>21</sup> und His<sup>29</sup>) in Richtung des  $\omega$ -loops verschoben unter Erhalt des Peptids *cyclo*[21,29][Cys<sup>21,29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> **7** mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 910 nM.<sup>[231]</sup>



**Abbildung 2.14:** Entwicklung von Urokinase-Antagonisten ausgehend vom ATF der Urokinase mit Angabe von IC<sub>50</sub>-Werte der Peptide.

Durch Untersuchungen von N. Schmiedeberg konnte gezeigt werden, dass sich nur die beiden Reste Asn<sup>22</sup> und Asn<sup>27</sup> des *cyclo*[21,29][Cys<sup>21,29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> **7**

ohne Aktivitätsverlust gegen Alanin austauschen lassen, da bei Modifikation der anderen Aminosäuren entweder die für die Bindung an uPAR wichtige Seitenketten entfernt werden (z. B. Trp<sup>30</sup>) oder negativer Einfluss auf die Konformation des Peptids genommen wird (z. B. Ser<sup>26</sup> oder Cys<sup>29</sup>).<sup>[234, 235]</sup> Wie auch im Fall von *cyclo*[19,31]-uPA<sub>19-31</sub> **5** kommt es bei *cyclo*[21,29][Cys<sup>21,29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> **7** zu einer enormen Aktivitätssteigerung auf IC<sub>50</sub> = 30 nM beim Austausch des N-terminalen Cys<sup>21</sup> gegen D-Cys<sup>21</sup> (Abbildung 2.14). Auch hier scheint das D-Cys einen Beitrag zur Stabilisierung der bioaktiven Konformation zu leisten. Eine Beteiligung der Cysteinbrücke des *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> **8** an der Rezeptorbindung ist wenig plausibel, da im Vergleich zum ATF die Lage dieser stark verändert wurde.



**Abbildung 2.15:** Stereodarstellung der Struktur in Lösung von *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> **8** (unten: 90° gedreht). Darstellung der Atome als Kugeln: C (weiß, groß), H (weiß, klein), N (schwarz), O (grau), S (grau, groß).

Die über NMR-Techniken ermittelte 3D-Struktur von *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> **8** zeigt, dass die für die Aktivität verantwortlichen Aminosäureseitenketten (laut *Ala-scan*) einen hydrophoben *cluster* bilden, und dass zwei  $\beta$ I-*turns* mit Lys<sup>23</sup>/Tyr<sup>24</sup> bzw. Ser<sup>26</sup>/Asn<sup>27</sup> in i+1/i+2-Position und die Cysteinbrücke die Gesamtgeometrie der Verbindung bestimmen. Die Überlagerung der Struktur von **8** mit der Struktur des ATF zeigt eine große Übereinstimmung in der Ausrichtung der Seitenketten der fast linear angeordneten Aminosäuren Tyr<sup>24</sup>, Phe<sup>25</sup>, Ile<sup>28</sup> und Trp<sup>30</sup>, was im Einklang mit den vergleichbaren biologischen Aktivitäten von *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> und ATF steht. Der C-Terminus befindet sich im Gegensatz zum N-Terminus weit entfernt vom hydrophoben *cluster* und frei drehbar im Bereich der Cysteinbrücke.

Die Leitstruktur *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> **8** besitzt hohe proteolytische Stabilität in Bezug auf Vollblut, Serum und uPA. Stabilität gegenüber Plasmin wird erst erreicht bei isosterer Substitution von Lys<sup>23</sup> gegen die unnatürliche Aminosäure Nle<sup>23</sup>. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass **8** nur bei hohen Peptidkonzentrationen (>1 mM) zelltoxisch auf verschiedene Tumorzelllinien (z. B. U-937, HL-1080) wirkt<sup>[235]</sup> und im Mausversuch das Tumorwachstum und die Ausbreitung von menschlichen Ovarialkrebszellen reduziert.<sup>[236]</sup>

Die Messung der IC<sub>50</sub>-Werte von oben genannten und im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten uPAR-Antagonisten wird mit Hilfe der Laser FACS Analyse<sup>[32]</sup> ermittelt. Bei dieser Methode wird die Bindung eines synthetischen Liganden in Konkurrenz zu FITC-modifizierten (Fluoreszeinisothiocyanat-Konjugat) pro-uPA gemessen. Dazu werden humane U-937 Leukämiezellen 72 h mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) stimuliert, wobei die uPAR-Dichte erhöht wird. Die mit Peptid und natürlichem Ligand inkubierten Zellen werden anschließend einzeln mit Hilfe eines Laserstrahls vermessen und über die

Menge an zellgebundenem FITC die konzentrationsabhängige Verdrängung des FITC-pro-uPA ermittelt.

### 2.3.3.2 Entwicklungen anderer Arbeitsgruppen

Eine andere Klasse von uPAR-Antagonisten wurde mit Hilfe von *phage-display*-Methoden generiert.<sup>[237, 238]</sup> Das von *Rosenberg et al.* dabei isolierte Peptid „Clone 20“ mit der Sequenz AEPMPHSLNFSQYLWYT bindet an den uPA-Rezeptor im unteren nanomolaren Bereich. Durch das Entfernen C- und N-terminaler Aminosäuren gelang es *Ploug et al.* unter Beibehaltung der Affinität das Decapeptid AE68 (SLNFSQYLWS) zu entwickeln, dessen Reste Leu<sup>2</sup>, Phe<sup>4</sup>, Leu<sup>8</sup> und Trp<sup>9</sup> laut *Ala-scan* einen Großteil zur Bindung an den uPA-Rezeptor beitragen.<sup>[100, 101]</sup> Mit Hilfe der *one-bead-one-compound*-Methode<sup>[239]</sup> wurden darauffolgend eine Bibliothek von Peptiden erstellt, die an den vom *Ala-scan* tolerierten Positionen mit einer Vielzahl von natürlichen bzw. unnatürlichen Aminosäuren versehen wurden. Der uPAR-Antagonist AE105 (Sequenz: D-Cha-F-s-r-Y-L-W-S) mit dem besten Bindungsprofil zeigt eine verbesserte Aktivität im Vergleich zu AE68, wird jedoch im Gegensatz zu ATF und zu *cyclo*[19,31][D-Cys<sup>19</sup>]-uPA<sub>19-31</sub> **6** nur vom humanen und nicht vom Affen-uPA-Rezeptor als Ligand erkannt.<sup>[240]</sup> Erklärt werden kann dies durch Mutationen in der Domäne III des uPA-Rezeptors unterschiedlicher Spezies. Besonders wichtig scheinen dabei die Positionen Leu<sup>55</sup>, His<sup>249</sup> und Asp<sup>262</sup> des menschlichen uPAR zu sein, die im Affen durch Met, Arg und Asn ersetzt sind, und die laut Mutationstudien an der Bindung uPA/uPAR direkt beteiligt sind.<sup>[241]</sup> Die Autoren schließen daraus, dass AE105 zwar an die selbe hydrophobe Tasche wie ATF oder *cyclo*[19,31][D-Cys<sup>19</sup>]-uPA<sub>19-31</sub> **6** bindet, jedoch einen abgeänderten Bindungsmodus aufweist. Deutlich wird dies auch durch den direkten Vergleich der Sequenzen vom ATF, *cyclo*[19,31][D-Cys<sup>19</sup>]-uPA<sub>19-31</sub>, AE68 und AE105 (Abbildung **2.16**). Dabei fällt auf, dass der Abstand zwischen den konservierten Resten Phe und Trp jeweils bei 6 Aminosäuren

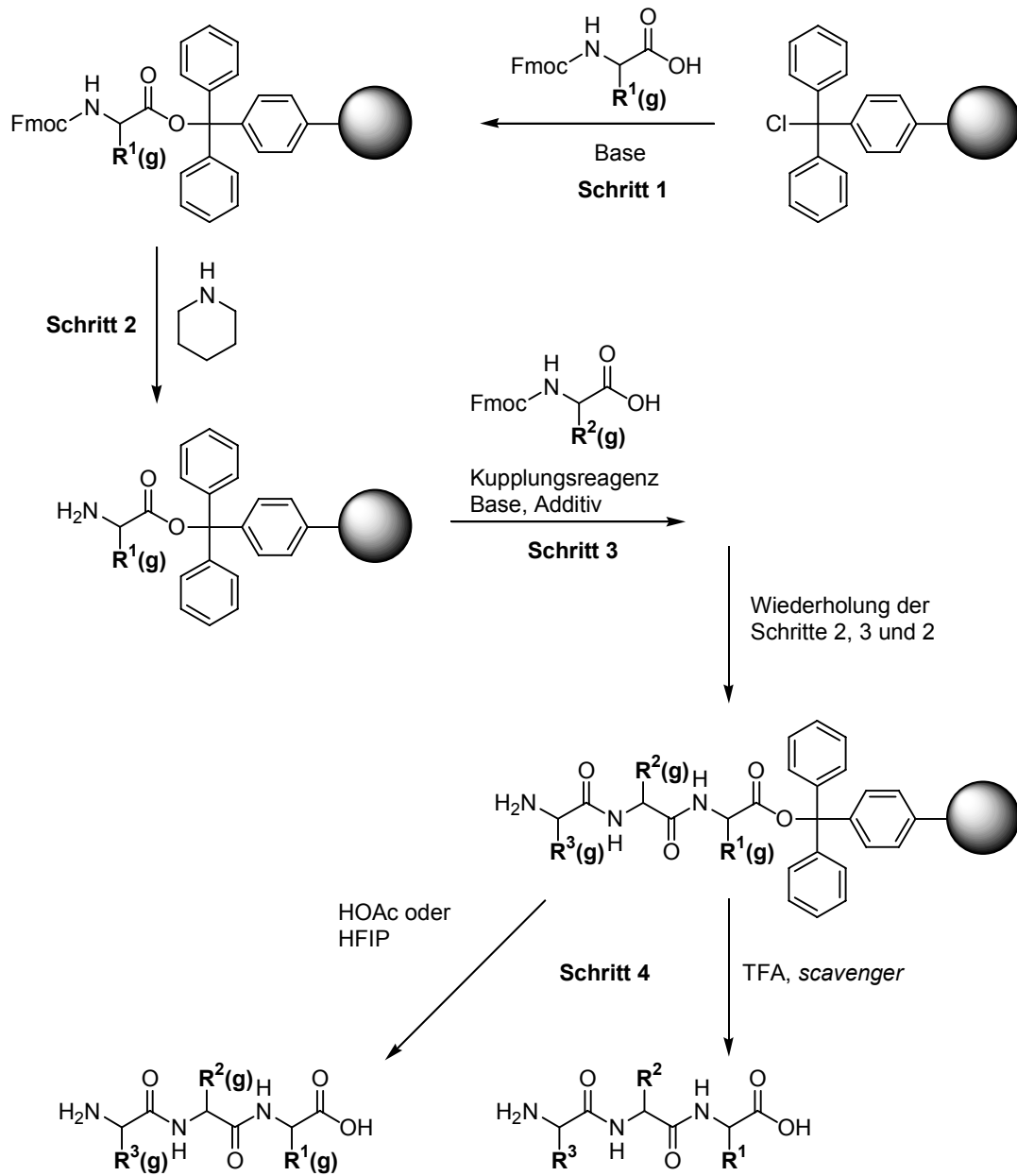


## 2.4 Allgemeine Grundlagen der Peptidchemie

### 2.4.1 Prinzipien der Peptidsynthese

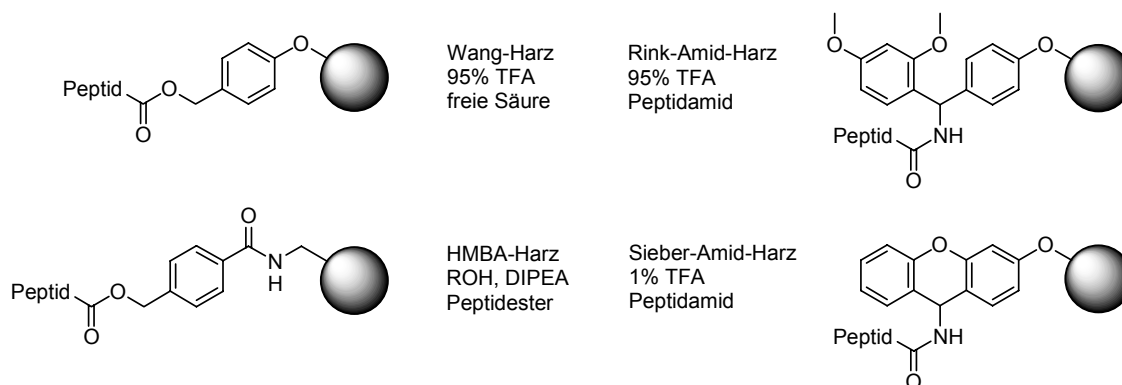
Die Bedeutung von Peptiden für die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Biopolymeren wurde bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts erkannt. Entsprechend früh wurden dann auch von *Emil Fischer* und *Theodor Curtius* die Grundlagen für eine chemische Synthese von Peptiden in Lösung erarbeitet.<sup>[242, 243]</sup> Erst durch die Einführung urethanischer Schutzgruppen durch *Bergmann* konnte das Problem der Racemisierung überwunden werden und führte zum Durchbruch in der Peptidsynthese.<sup>[244]</sup> Für die Synthese der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Peptide wird die von *Merrifield* entwickelte Strategie der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) verwendet.<sup>[245, 246]</sup> Bei dieser Technik wird die Peptidkette sequenziell an einem festen Träger aufgebaut, indem eine mit einer temporären Schutzgruppe für die Aminogruppe und einer permanenten Schutzgruppe für die Seitenkette geschützte Aminosäure an eine N-terminal entschützte, festphasengebundene Aminosäure gekuppelt wird. Die Vorteile dieser Methode bestehen im Wesentlichen darin, dass durch hohe Reagenzienüberschüsse die Kupplungsreaktion fast quantitativ verläuft und dass die überschüssigen Reagenzien von dem jeweiligen harzgebundenen Zielmolekül durch einfache Filtration entfernt werden können.

Dabei kommt die von *Carpino et al.* entwickelte Fmoc/<sup>t</sup>Bu-Schutzgruppenstrategie zum Einsatz, wie sie in Abbildung **2.17** dargestellt ist.<sup>[247-249]</sup> Vorteil dieser Methode ist, dass die Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe unter milden Bedingungen mit einer 20%igen Piperidinlösung in NMP (**Schritt 2**) orthogonal zu den säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen und der Peptidverankerung ist.



**Abbildung 2.17:** Darstellung der Synthesestrategie von Peptiden an fester Phase nach Merrifield und Carpino unter Verwendung des Trityllinkers. Die Abspaltung des Peptids vom festen Träger in **Schritt 4** erfolgt entweder unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen (g) unter schwach sauren Bedingungen (z. B. AcOH oder HFIP) oder durch simultane Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen mittels TFA.

Die Verankerung der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure am Harz (**Schritt 1**) erfolgt über ein zu den Kupplungsbedingungen orthogonales Linkermolekül, dessen Bindung zum immobilisierten Peptid erst bei der Peptidabspaltung vom Harz gebrochen wird. Dabei haben sich neben dem in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Trityllinker,<sup>[250, 251]</sup> die in Abbildung 2.18 dargestellten Linker in der chemischen Festphasensynthese als besonders verlässlich für die Synthese modifizierter Peptide herausgestellt.<sup>[252, 253]</sup>

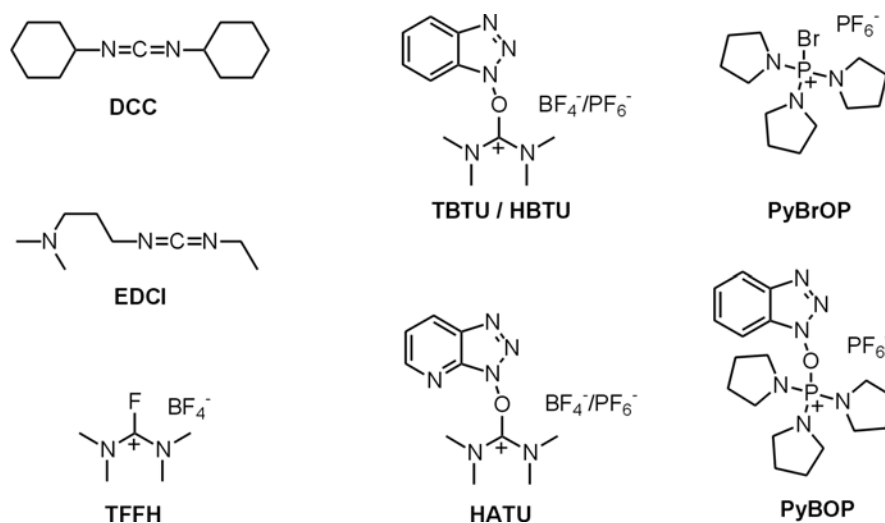


**Abbildung 2.18:** Ausgewählte Linker, die sich in der Festphasensynthese von Peptidderivaten bewährt haben, mit Angabe der Abspaltbedingungen und des zu erwartenden Peptidderivats.

Die Aktivierung der zu kuppelnden Fmoc- und seitenkettengeschützten Aminosäure erfolgt mittels schwacher organischer Basen (z. B. durch *N,N,N*-Diisopropylethylamin) und Aktivierungsreagenzien (siehe Abbildung 2.19),<sup>[254-256]</sup> die *in situ* im ersten Schritt der Reaktion eine hochreaktive Acyluronium- oder -phosphonium-Spezies erzeugen. Im zweiten Schritt wird diese dann durch den nucleophilen Angriff von Fluorid, Bromid, HOBt oder HOAt in das Säurehalogenid bzw. in den Aktivester umgewandelt, welches/r dann letztendlich mit dem entschützten N-Terminus des harzgebundenen Peptids zum Amid reagiert (**Schritt 3**). Neben den *in situ* Reagenzien, die überwiegend in der automatisierten Peptidsynthese verwendet werden, werden auch bereits

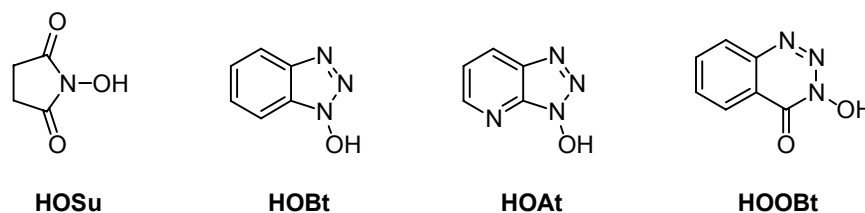


voraktivierte Aminosäurederivate eingesetzt, wie z. B. symmetrische Anhydride, N-Carboxyanhydride (NCA), Pentafluorphenolester oder Säurehalogenide.<sup>[248, 257, 258]</sup> Die Kupplungsreaktionen betreffend weisen OAt-Aktivester, symmetrischen Anhydride und Aminosäurehalogenide die größte Reaktivität auf, während die Aminosäurefluoride ganz besonders für sterisch gehinderte Kupplungen, wie z. B. zwischen  $\alpha$ -disubstituierten Aminosäuren (z. B. Aib) geeignet sind.<sup>[259-261]</sup>



**Abbildung 2.19:** Kupplungsreagenzien für die *in situ* Aktivierung von Aminosäuren.

Die in den ersten Reaktionsschritten der Aktivierung gebildeten Acyl-Onium-Verbindungen racemisieren leicht, sodass diese durch den Zusatz von Additiven (siehe Abbildung 2.20) in die entsprechenden, stabileren Aktivester überführt werden müssen, bzw. das Reaktionsgleichgewicht zu diesen verschoben werden muss.<sup>[262, 263]</sup> Gleichzeitig müssen sterisch gehinderte bzw. sehr schwache Basen wie Collidin eingesetzt werden, um unerwünschte Racemisierungen z. B. von Cystein zu vermeiden.<sup>[264-267]</sup>



**Abbildung 2.20:** Gebräuchliche Additive für die Kupplung von in situ aktivierten Aminosäurederivaten. Die Effizienz in der Unterdrückung der Racemisierung nimmt von links nach rechts zu.

Als permanente Seitenkettenschutzgruppen für die Fmoc-Aminosäuren kommen folgende Schutzgruppen zum Einsatz, die allesamt TFA-labil sind:

**Tabelle 2.2:** Seitenkettenschutzgruppen für Aminosäuren.

Aminosäure	Schutzgruppe
Serin, Threonin	<sup>t</sup> Butyl-Ether ( <sup>t</sup> Bu)
Aspartat, Glutamat	<sup>t</sup> Bu-Ester (O <sup>t</sup> Bu)
Cystein, Asparagin, Glutamin, Histidin	Triphenylmethyl- (Trt)
Lysin, Tryptophan	<sup>t</sup> Butyloxycarbonyl- (Boc)
Arginin	<i>N</i> <sup>α</sup> -(2,2,4,6,7)-Pentamethyl- dihydrobenzofuran-5-sulfonyl- (Pbf) <sup>[268]</sup>

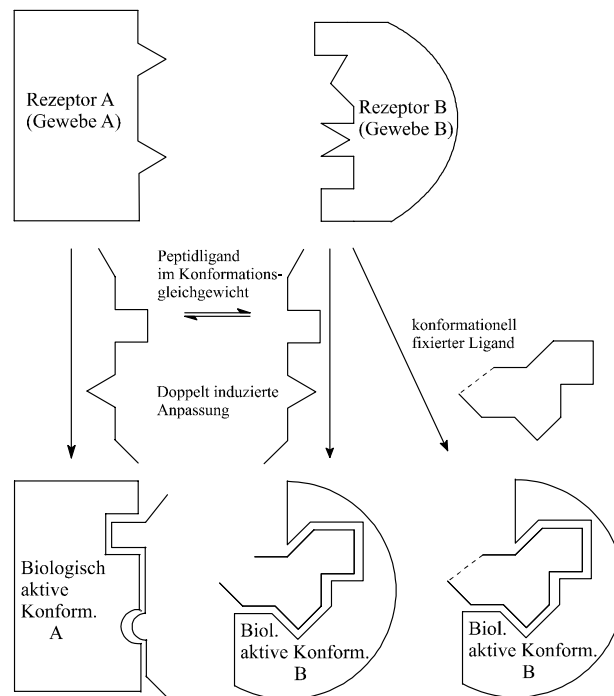
Die Peptidabspaltung vom Harz (**Schritt 4**) erfolgt im Fall des Trityllinkers durch Behandlung mit schwachen Säuren wie Hexafluorisopropanol (HFIP)<sup>[269]</sup> oder Essigsäure in Dichlormethan; wenn die Seitenkettenschutzgruppen erhalten bleiben sollen. Zur Harzabspaltung unter gleichzeitiger, vollständiger Entschützung des Peptids verwendet man Trifluoressigsäure. Die bei der sauren Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen entstehenden Carbokationen müssen dabei mittels geeigneter *scavenger* abgefangen werden, um die

irreversible Alkylierung nucleophiler Aminosäureseitenketten zu unterdrücken. Als Abspaltmischung kommen dabei Mischungen aus TFA und unterschiedlichen Anteilen an *scavengern* wie Wasser, Thioanisol, Ethandithiol oder Phenol zum Einsatz.<sup>[270]</sup> Mittlerweile hat sich Triisopropylsilan (TIPS) zusammen mit geringen Mengen an Wasser in TFA als Abspaltmischung der Wahl etabliert, da es geruchlos ist und Carbokationen sehr effektiv abfängt.<sup>[271]</sup> Für die Cyclisierung von seitenkettengeschützten Peptiden wird im Normalfall die Azidmethode verwendet, nach der der Ringschluß über eine Amidbildung mit Hilfe von Diphenylphosphorsäureazid (DPPA) und Natriumhydrogencarbonat in DMF erfolgt.<sup>[272]</sup> In diesem Fall wird die Reaktion unter Anwendung des Verdünnungsprinzips durchgeführt, wobei durch Konzentrationen von  $10^{-3}$  M die Bildung von Dimeren unterdrückt werden soll. Für die intramolekulare Peptidcyclisierung mittels Cysteinbrücke wird häufig die von *Tam et al.* entwickelte Oxidationsmethode verwendet. Das dabei verwendete DMSO ist gleichzeitig Lösungs- und Oxidationsmittel.<sup>[273-275]</sup> Nebenreaktion sind keine bekannt; Oligomerisierungen werden durch Verdünnung der Peptidlösung erreicht (Konzentration  $10^{-3}$  M). Die Disulfidbrückencyclisierung verläuft besonders schnell bei N-terminalen Cysteinresten und in pH-neutralen bis schwach basischen Lösungen.<sup>[276, 277]</sup> Peptide in sauren Lösungen (z. B. TFA/ACN-Gemische) bilden keine Cysteinbrücken aus, weil ein für die Reaktion nötiges Thiolat nicht gebildet wird.

#### 2.4.2 Strukturelle Eigenschaften von Cyclopeptiden

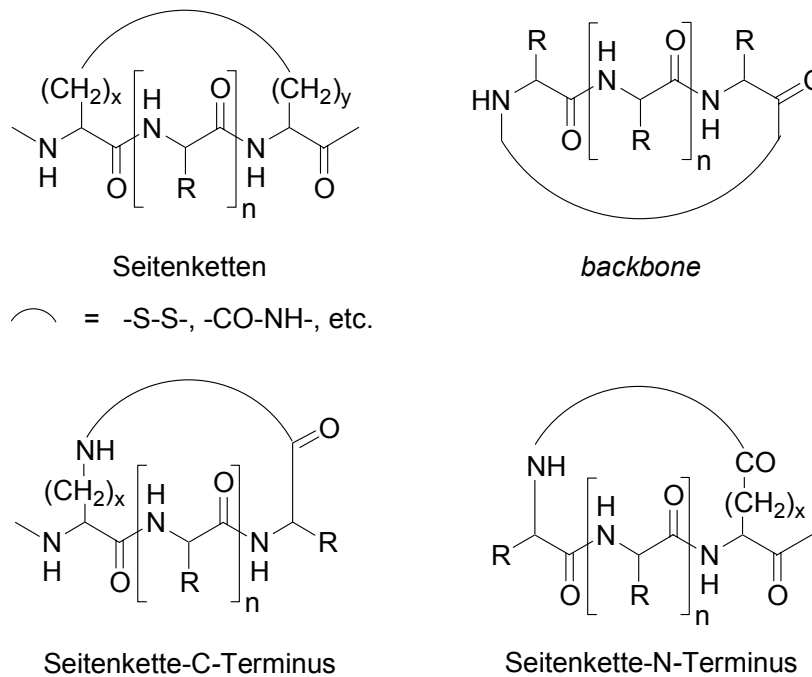
Kurze, lineare Peptide zeigen kaum Tendenz zur Ausbildung von Sekundärstrukturen, da nur wenig Strukturelemente vorhanden sind (z. B. Planarität der Amidbindung, Konfiguration der Aminosäuren), um die Anzahl der Freiheitsgrade des Systems zu verringern.<sup>[278]</sup> Cyclische Peptide dagegen – besonders bei Ringgrößen bis zu 9 Aminosäuren – besitzen genügend

strukturelle Einschränkungen, um Stabilisierung einer oder weniger Vorzugskonformationen zu erzielen.<sup>[279, 280]</sup> Das von *E. Fischer* 1894 eingeführte Schlüssel-Schloss-Prinzip,<sup>[281, 282]</sup> das später durch das Konzept des *induced fit*<sup>[283-285]</sup> erweitert wurde, besagt, dass Liganden unter Einnahme einer bestimmten biologisch aktiven Konformation an ihren Rezeptor binden, der sich umgekehrt auch durch Konformationsänderung an den Liganden anpassen kann. (Abbildung 2.21) Dieser Sachverhalt erklärt, warum konformationell eingeschränkte, biologisch relevante Cyclopeptide eine höhere Aktivität und Rezeptor-Selektivität als ihre linearen Analoga besitzen können. Im günstigsten Fall wird durch die Cyclisierung genau die Konformation stabilisiert, die für die biologische Aktivität wichtig ist.<sup>[286]</sup> Hinzu kommt eine erhöhte metabolische Stabilität, da cyclisierte Peptide weniger Angriffsfläche für Peptidasen bieten.<sup>[287-289]</sup>



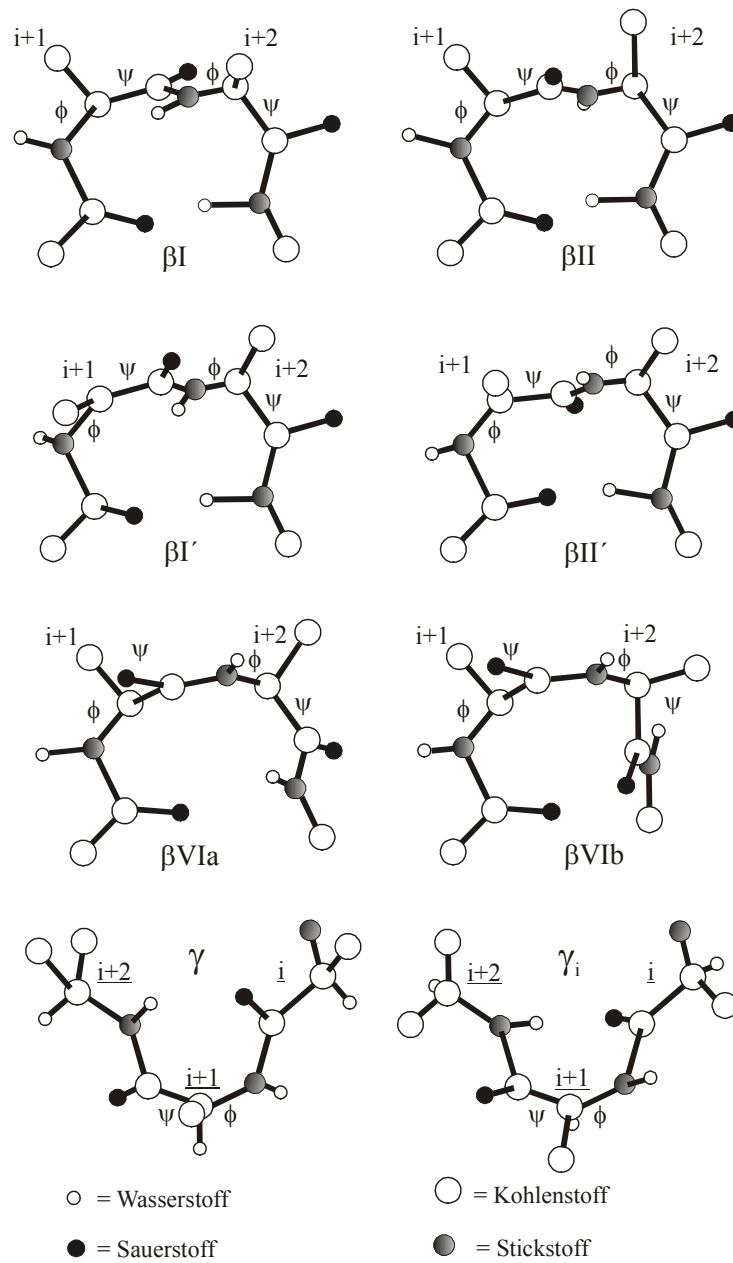
**Abbildung 2.21:** Darstellung des Schlüssel-Schloss-Prinzips und des induced fit-Konzepts. Ligand und Rezeptor passen sich gegenseitig für die Bindung an.

Cyclisierungen können über sehr unterschiedliche Wege erzielt werden. Neben der häufig vorkommenden Cysteinbrücke<sup>[290, 291]</sup> wird vor allem die Amidbindung zur Cyclisierung verwendet.<sup>[280, 292]</sup> Je nach Position der Cysteinbrücke oder Amidbindung in der Primärstruktur unterscheidet man zwischen Seitenketten-, *backbone*- oder Seitenketten-*backbone*-Cyclisierung mit den zwei Varianten der Verknüpfung des N- oder C-Terminus mit einer Seitenkette. Zum Einsatz kommen dabei die Amino- und Carbonsäuregruppen der Lys-, Asp- und Glu-Seitenketten, sowie die von unnatürlichen Aminosäuren (z. B. Orn). Weitere Variationsmöglichkeiten bestehen in der Verwendung von D-Aminosäuren, Peptoidaminosäuren und  $\alpha$ -disubstituierten Aminosäure mit jeweils einer Amino- oder Säurefunktion.



**Abbildung 2.22:** „Klassische“ Cyclisierungsarten unter Verwendung von Amid- bzw. Cysteinbrücken.

Das Vorhandensein einer Sekundärstruktur bei Cyclopeptiden ermöglicht die Konformationsanalyse; auch in Hinblick auf häufig auftretende Struktureinheiten und Beeinflussung dieser.<sup>[279, 293]</sup> Besonders ausführlich wurden *backbone*-cyclisierte (Verknüpfung von N- und C-Terminus) Penta- und Hexacyclen untersucht. Die von *J. S. Richardson* beschriebenen  $\beta$ - und  $\gamma$ -turns, die in den Sekundärstrukturen von Proteinen beobachtet werden, stellen auch die wesentlichen Strukturmerkmale der *backbone*-Konformation von cyclischen Peptiden dar.<sup>[294, 295]</sup> Der  $\beta$ -turn setzt sich aus vier Aminosäuren zusammen ( $i - i+3$ ), während der  $\gamma$ -turn drei Aminosäuren umfaßt ( $i - i+2$ ). Demgemäß sind die  $\beta$ -turns strukturell durch die Diederwinkel  $\phi$  und  $\psi$  der Aminosäuren  $i+1$  und  $i+2$  bestimmt, während zur Beschreibung des  $\gamma$ -turns  $\phi$  und  $\psi$  der Aminosäure  $i+1$  ausreichend ist.<sup>[296]</sup> Als Grundmotive für  $\beta$ -turns sind u. a. die Varianten I, II, I', II', VIa, VIb bekannt, die sich in den  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkeln unterscheiden.



**Abbildung 2.23:**  $\beta$ - und  $\gamma$ -Schleifentypen aus *L*-konfigurierten Aminosäuren als charakteristische Strukturmerkmale von Cyclopeptiden.

Bei der Betrachtung der *backbone*-Strukturen fällt auf, dass jeweils  $\beta$ I und  $\beta$ I' sowie  $\beta$ II und  $\beta$ II' spiegelsymmetrisch (bei *L*-Aminosäuren) zueinander sind. Der  $\beta$ VI-*turn* nimmt in dieser Familie eine Sonderstellung ein. Während die anderen  $\beta$ -Varianten jeweils eine charakteristische Wasserstoffbrücke zwischen

den Aminosäuren  $i$  und  $i+3$  ausbilden und die  $\gamma$ -turns diese Brücke zwischen  $i$  und  $i+2$  aufweisen, fehlt dieses Strukturelement in der  $\beta$ VI-Konformation. Dagegen findet man in  $\beta$ VI-turns eine charakteristische *cis*-Amidbindung zwischen den Resten  $i+1$  und  $i+2$ . Die Diederwinkel, die in den Rückgratkonformationen idealer *turn*-Motiven vorgefunden werden, sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

**Tabelle 2.3:**  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel idealer  $\beta$ - und  $\gamma$ -Schleifen.

Konformations-Typ	$\phi$ (i+1) [°]	$\psi$ (i+1) [°]	$\phi$ (i+2) [°]	$\psi$ (i+2) [°]
$\beta$ I	-60	-30	-90	0
$\beta$ I'	60	30	90	0
$\beta$ II	-60	120	80	0
$\beta$ II'	60	-120	-80	0
$\beta$ VIa	-60	120	-90	0
$\beta$ VIb	-120	120	-60	150
$\gamma$	70 - 85	-60 - (-70)		
$\gamma$	-70 - (-85)	60 - 70		

Aus den Ergebnissen zahlreicher Konformationsanalysen und *ab initio* Rechnungen geht als ein strukturelles Grundprinzip hervor, dass D-Aminosäuren (speziell D-Pro) und Gly bevorzugt die  $i+1$ -Position in  $\beta$ II'- und  $\beta$ I-turns einnehmen.<sup>[279, 297-300]</sup>

Für **Cyclopentapeptide** sind folgenden Strukturregularitäten beobachtet worden:<sup>[301, 302]</sup>

- Bevorzugte Konformationen sind Strukturen, die zwei Wasserstoffbrücken enthalten und entweder  $\beta/\gamma$ - oder  $\gamma/\gamma$ -turn-Motive ausbilden.
- D-Aminosäuren und Glycin nehmen innerhalb eines  $\gamma$ -turns bevorzugt die  $i$ -Position ein.



- Die  $i+1$ -Position eines  $\gamma$ -turns wird häufig von sterisch anspruchsvollen Aminosäuren wie Pro, Val, Phe oder Aib besetzt.
- Pro bevorzugt auch in  $\beta$ -turns die  $i+1$ -Position.

Liegen in einem Cyclopentapeptid sowohl eine D-Aminosäure als auch Gly vor, geht die dominierende Strukturinduktion von der D-Aminosäure aus.

Von **Cyclohexapeptiden** ist vor allem bekannt, dass sie bevorzugt Konformationen mit zwei gegenüberliegenden  $\beta$ -turns ausgebildet, bei denen ebenfalls D-Aminosäuren (insbesondere D-Pro) die  $i+1$ -Position eines  $\beta$ II'-turns besetzen (Abbildung 2.23).<sup>[293, 303]</sup>

## 2.5 Synthese von *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>- Modifikationen

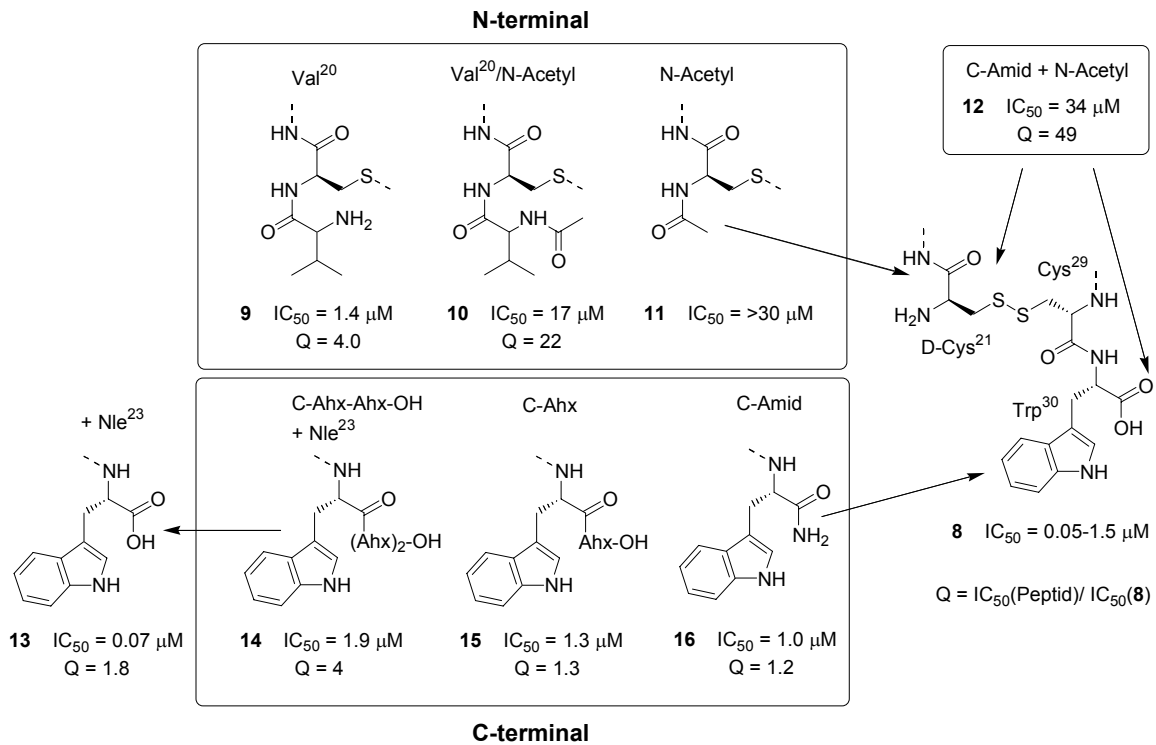
Um die Eigenschaft von bioaktiven, peptidischen Liganden in Bezug auf unterschiedliche Anwendungsgebiete und Testsysteme hin untersuchen zu können, müssen physikalisch messbare Eigenschaften des Liganden (z. B. Radioaktivität, UV-Aktivität, Fluoreszenz) vorhanden sein. Häufig erlangen die Liganden erst durch chemische Verknüpfung mit zusätzlichen Markierungsmolekülen, die „physikalisch“ aktiv sind, genügend Signalintensität, damit aussagekräftige Messungen ermöglicht werden.<sup>[304, 305]</sup>

Da aber die Aktivität von Peptiden durch zusätzliche Anbringung von Moleküleinheiten (z. B. Fluoreszenzlabel, Linker, Lipidanker, Chelatliganden für radioaktive Metalle usw.) stark beeinträchtigt werden kann, muss nach Verknüpfungsstellen am Liganden gesucht werden, die von der Wechselwirkung mit dem Rezeptor nicht betroffen sind. Generell kommen drei unterschiedliche Stellen für die Anbringung von Funktionalitäten in Frage: Seitenketten oder N- bzw. C-Terminus des Peptids. *N. Schmiedeberg* konnte im Fall von *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> **8** bereits zeigen, dass

Modifikationen der Seitenketten (siehe Ala-Scan in Kapitel 2.3.3) zum Teil erheblichen Aktivitätsverlust zur Folge haben. Diese Möglichkeit scheidet somit aus. Weiterhin wurde von N. Schmiedeberg festgestellt, dass der C-Terminus keinerlei Bedeutung für die Bindung an den uPAR besitzt, da ein C-terminales Amid bzw. das Abschneiden des C-Terminus ohne Affinitätsverlust toleriert wird. Dagegen führt die Acetylierung des N-Terminus zum einem fast inaktiven Peptid **11** (Abbildung 2.24), obwohl im natürlichen Liganden uPA an dieser Stelle eine der Acetylgruppe ähnliche Amidbindung zur nächsten Aminosäure Val<sup>20</sup> vorliegt. Daraus wurde postuliert, dass der N-Terminus oder eine im Bereich des N-Terminus liegende positive Ladung (von His<sup>29</sup>) wichtig für die Anbindung an den uPA-Rezeptor ist.<sup>[234]</sup>

### 2.5.1 Synthese von C-/N-terminal modifiziertem *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>

Um die zuvor geäußerten Sachverhalte für die Anbringung von Funktionalitäten auszunutzen, wurden systematisch weitere N- und C-terminale Modifikationen von *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> mittels Fmoc-Festphasensynthese (Kapitel 2.4.1) hergestellt. Für Peptide mit freiem C-Terminus wurde TCP-Harz verwendet, für Peptide mit C-Amid das Sieber-Amid-Harz. Zur Acetylierung des N-Terminus wird das harzgebundene, seitenkettengeschützte Peptid nach Fmoc-Entschützung mit einer Lösung aus Ac<sub>2</sub>O/Collidin/NMP behandelt. Nach Abspaltung der Peptide vom Harz und vollständiger Entschützung mit TFA erfolgte die oxidative Cysteinbrückencyclisierung durch Behandlung mit DMSO. In Abbildung 2.24 sind die entsprechenden Peptide mit ihren im FACS-Test ermittelten Aktivitäten aufgeführt. Es ist zu beachten, dass die gemessenen IC<sub>50</sub>-Werte nur in Relation zum Standardpeptid **8** Aussagekraft ( $Q = IC_{50}(\text{Peptid}) / IC_{50}(\mathbf{8})$ ) besitzen, da je nach Testreihe die Expression von uPAR auf den Zellen sehr unterschiedlich sein kann.



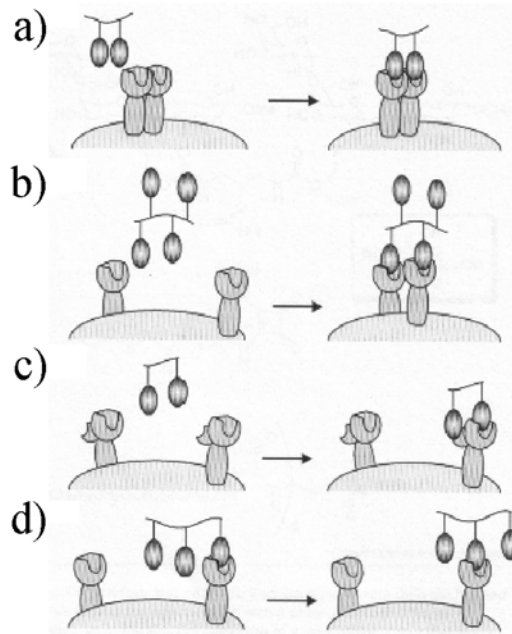
**Abbildung 2.24:** Biologische Aktivität von N-/C-terminal modifiziertem cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>. Der IC<sub>50</sub>-Wert gibt die Peptidkonzentration an, die nötig ist, um den natürlichen Liganden uPA um 50% vom uPAR zu verdrängen. Der Q-Wert ist der Aktivitätsquotient relativ zum Standardpeptid **8**. Ahx = ε-Aminohexansäure.

Am C-terminalen Ende von **8** wird laut Aktivitätsstudie nicht nur das C-Amid (Peptid **16**, von N. Schmiedeberg synthetisiert) toleriert, sondern auch die Verknüpfung mit spacer-Aminosäuren wie ε-Aminohexansäure (Ahx). Die Aktivität des Ahx-Peptids **15** ist nur geringfügig kleiner als von cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> **8**. Dies trifft auch für das Nle<sup>23</sup>-Derivat **14** zu, das zwei Ahx-Moleküle am C-Terminus trägt. Der C-Terminus von **8**, der anscheinend keinerlei Einfluss auf die Aktivität besitzt, ist somit sehr gut geeignet, um Funktionalitäten einzuführen, die mit dem Peptid **8** über spacer unterschiedlicher Länge verknüpft sind.

Die Verlängerung des Standardpeptids **8** am N-Terminus um die Aminosäure Val<sup>20</sup> ergibt wider Erwartung ein nur um den Faktor vier weniger aktives Peptid **9**, obwohl es wie das inaktive N-Acetyl-Peptid **11** (von *N. Schmiedeberg* synthetisiert) an der selben Stelle eine Amidbindung statt eines Amins trägt. Wird das Val<sup>20</sup>-Peptid aber ebenfalls N-terminal acetyliert, ist das daraus resultierende Peptid **10** inaktiv. Auch das ansonsten aktive Peptid mit C-Amid **16** verliert seine bindende Eigenschaft durch N-Acetylierung (Peptid **12**). Eine Erklärung für die geschilderten Phänomene könnte sein, dass - wie bereits vermutet - eine Aminofunktion bzw. eine positive Ladung, welche im Fall des Val<sup>20</sup>-Peptids **9** erhalten bleibt, in der Region des N-terminalen Endes eine für die Bindung wichtige Rolle einnimmt. Diese Erkenntnis kann ausgenutzt werden, indem man statt des Val<sup>20</sup> eine andere Aminosäure (z. B. Lys oder Glu) an das Peptid **8** anhängt und die zusätzliche, für die uPAR-Affinität unwichtige Seitenkette dazu verwendet, um Funktionalitäten kovalent anzubinden (siehe Kapitel **2.5.3**).

### **2.5.2 Synthese von *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>-Dimeren**

Der Großteil der Forschung auf dem Gebiet der Zellrezeptor-Liganden-Wechselwirkung befasst sich mit monovalenten Liganden, die durch nur ein Bindungsepitop gekennzeichnet sind. Liganden, die mehrere Erkennungselemente enthalten, werden als multivalent bezeichnet. Multivalente Liganden besitzen oft eine erhöhte Aktivität gegenüber ihren Zellrezeptoren als die monovalenten Analoga, wofür unterschiedliche in Abbildung **2.25** aufgeführte Mechanismen verantwortlich sein können.<sup>[306-311]</sup>

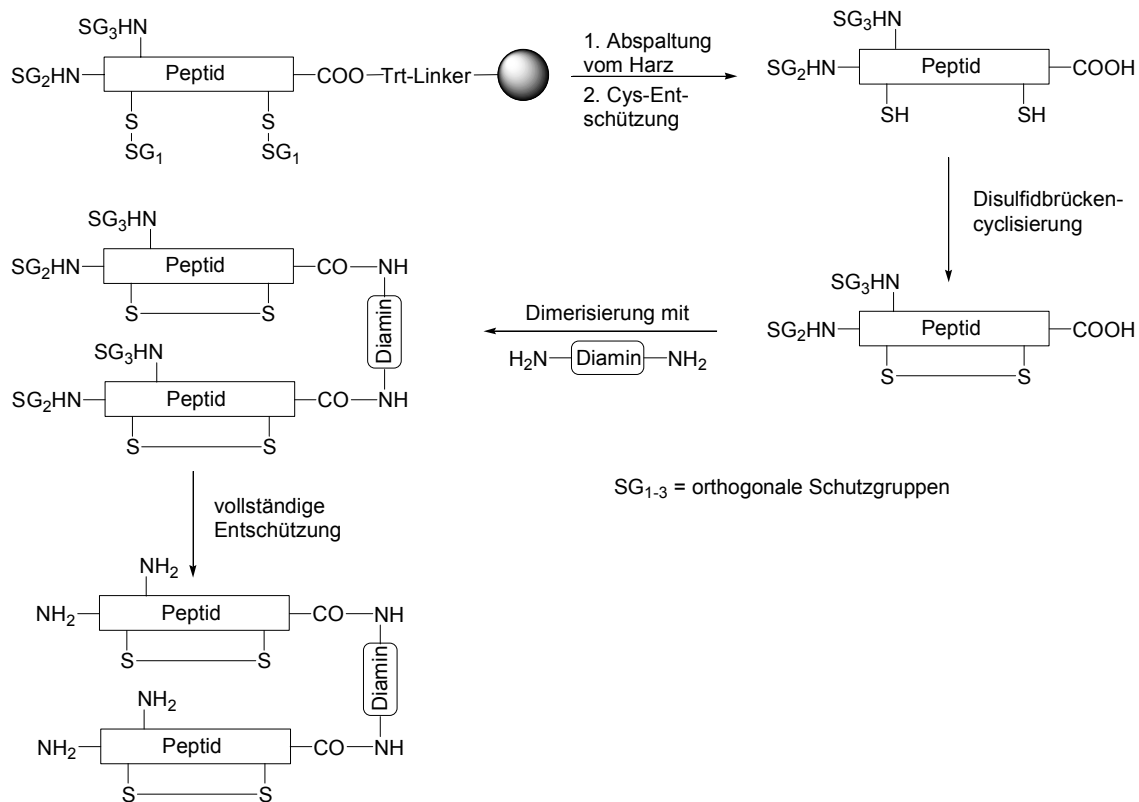


**Abbildung 2.25:** Wechselwirkung multivalenter Liganden mit Zelloberflächenrezeptoren: a) Bindung an oligomerisierte Rezeptoren über „Chelat-Effekt“; b) clustering von Rezeptoren durch Ligandenbindung; c) gleichzeitige Bindung an primäre und sekundäre Rezeptortaschen; d) Konzentrationserhöhung von Bindungsepitopen in der Umgebung eines Rezeptors.

Es wird angenommen, dass multimere Liganden im Durchschnitt fester an Rezeptoren gebunden sind, da sich die Bindungs- und Ablöseprozesse der einzelnen Epitope ergänzen. Zurückführen lässt sich die kooperative Aktivitätssteigerung auf Entropie- und lokale Konzentrationseffekte. Dabei spielt die Architektur der Liganden eine große Rolle, wie z. B. Anzahl<sup>[312-314]</sup> und Dichte<sup>[315, 316]</sup> der Bindungsepitope und die Art ihrer Verknüpfung.<sup>[317-319]</sup> Um zu untersuchen, ob der uPAR-Antagonist *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> im Falle der Dimerisierung ebenso einen Aktivitätsanstieg zeigt, musste nach einem geeigneten Synthesekonzept gesucht werden, das es ermöglicht, zwei Epitope unter Erhalt der Aktivität miteinander zu verknüpfen. Dabei gab es folgende Sachverhalte zu berücksichtigen:

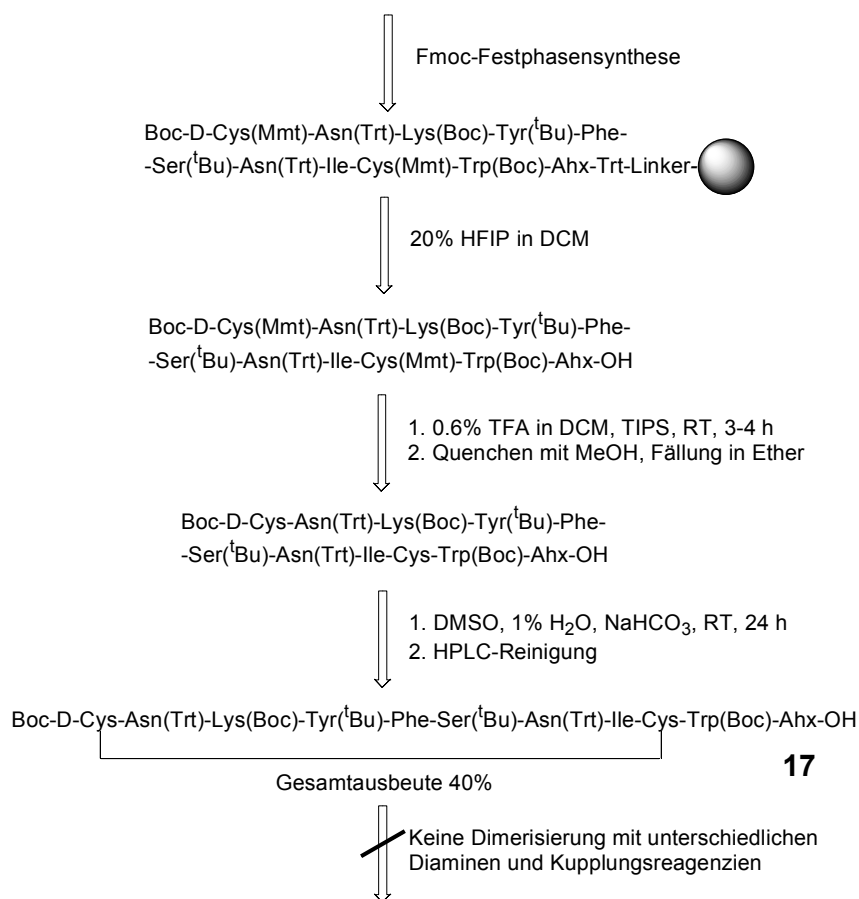
- Die Länge der Verknüpfungseinheiten soll variiert werden, damit der Abstand zwischen zwei Rezeptoren überbrückt werden kann.
- Die Art der Verknüpfungseinheiten soll variiert werden, damit die Löslichkeit der Dimere gewährleistet ist und es zu keiner Ausbildung störender Sekundärstrukturen kommt (z. B. hydrophobe Wechselwirkung mit dem Bindungsepitop).
- Die für die Bindung wichtigen Cysteinbrücken beider Epitope müssen unabhängig voneinander gebildet werden, damit es zu keiner statistischen Disulfid-Verknüpfung der Epitope untereinander kommt (drei mögliche Produkte mit gleicher Masse).
- Symmetrischer Aufbau des Dimers, damit beide Bindungsepitope gleichen Anteil zur Aktivität beitragen können.
- Dimerisierung über den C-Terminus von *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>, da so nur geringer Einfluss des *spacers* auf die Aktivität zu erwarten ist (siehe Kapitel 2.5.1).

Es bietet sich somit an, C-terminal verlängerte Monomere an der festen Phase zu synthetisieren, die selektiv über eine Disulfidbrücke cyclisiert und dann im Anschluß in Lösung über einen Diamin als *linker* dimerisiert werden (Abbildung 2.26). Dies erfordert eine besondere Schutzgruppenstrategie, weil zur Cysteinbrückencyclisierung die Thiolgruppen entschützt sein müssen; andererseits aber müssen die Aminofunktionen des N-Terminus und des Lys<sup>23</sup> für die Fragmentkupplung beider Monomer geschützt bleiben, da ansonsten unkontrollierbare Oligomerisierung auftreten kann. Diese Orthogonalität kann entweder über selektiv abspaltbare Cystein- oder Aminoschutzgruppen eingeführt werden. Mehrere dieser Ansätze wurden verfolgt.



**Abbildung 2.26:** Allgemeines Konzept zur Dimerisierung von cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>, Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>.

Im ersten Ansatz wurde die Monomethoxytritylgruppe (Mmt) als orthogonaler Schutz für das D- und L-Cystein verwendet.<sup>[320]</sup> Das N-terminale Ende ist dabei Boc geschützt. Ziel war es, die Mmt-Gruppe nach Abspaltung vom Harz (HFIP-Methode) durch Behandlung mit einer schwach sauren TFA-Lösung selektiv zu entfernen, ohne dass dabei die anderen säurelabilen Schutzgruppen Trt, Boc und <sup>t</sup>Bu auf den Seitenketten und am N-Terminus davon betroffen sind. Die Cyclisierung erfolgt dann mit Hilfe von DMSO in Lösung. Man erhält dadurch ein nur am C-Terminus ungeschütztes Peptid, das für eine Dimerisierung geeignet wäre.

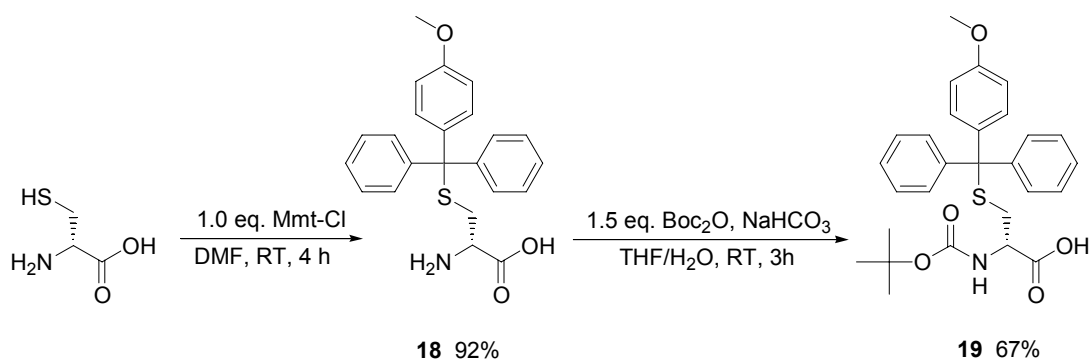


**Abbildung 2.27:** Dimersynthese über mit Mmt orthogonal geschützten Cysteinen.

In Abbildung 2.27 ist gezeigt, dass die Synthese des Monomers **17** mit guten Ausbeuten verläuft. Die Mmt-Gruppe lässt sich innerhalb von 4 h mit 0.6% TFA in DCM selektiv abspalten,<sup>[321]</sup> die Disulfidbrückencyclisierung in DMSO erfolgt innerhalb von 24 h. Eine Dimerisierung findet allerdings nicht statt. Man beobachtet nur in geringem Umfang die Kupplung des Diaminlinkers an ein Monomermolekül. Die weitere Reaktion mit dem zweiten Monomer bleibt aus, da wahrscheinlich das vollgeschützte Peptid sterisch zu anspruchsvoll ist oder der C-Terminus in das hydrophobe Peptid hinein gefaltet wird. In beiden Fällen wirken sich die hohe Anzahl an Seitenkettenschutzgruppen des Monomers negativ auf die Dimerbildung aus.

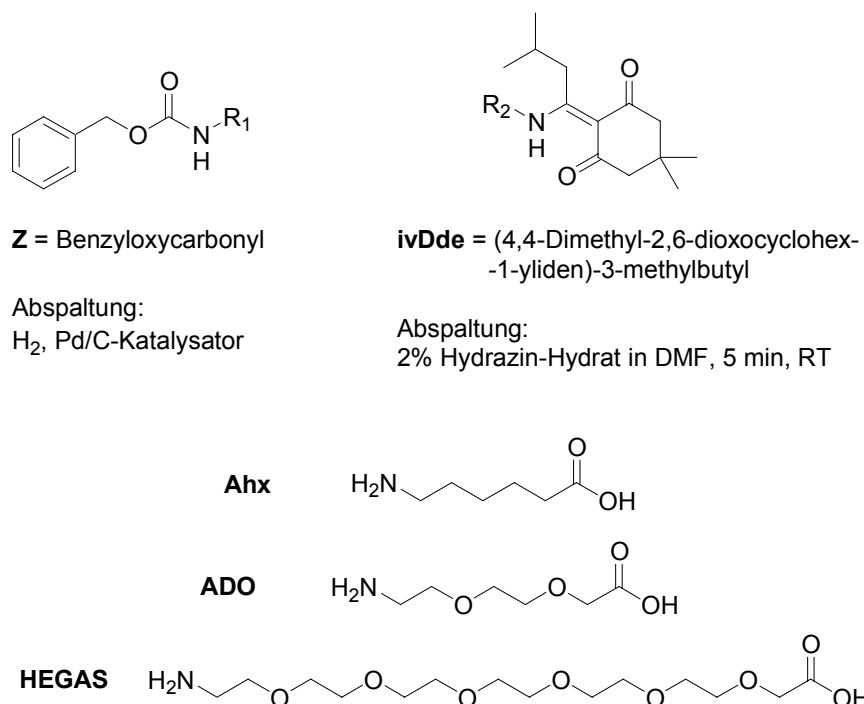


Die Synthese des Boc-D-Cys(Mmt)-OH **19**, welches nicht kommerziell erhältlich ist, ist in Abbildung 2.28 dargestellt. Das Thiol des D-Cysteins wird zuerst mit Methoxytritylchlorid in DMF geschützt. Das Zwischenprodukt **18** wird anschließend mit Boc-Anhydrid und NaHCO<sub>3</sub> als Base in einem THF/H<sub>2</sub>O-Gemisch weiter zur N-Boc- und S-Mmt-geschützten Aminosäure **19** umgesetzt.



**Abbildung 2.28:** Synthese von Boc-D-Cys(Mmt)-OH **19**

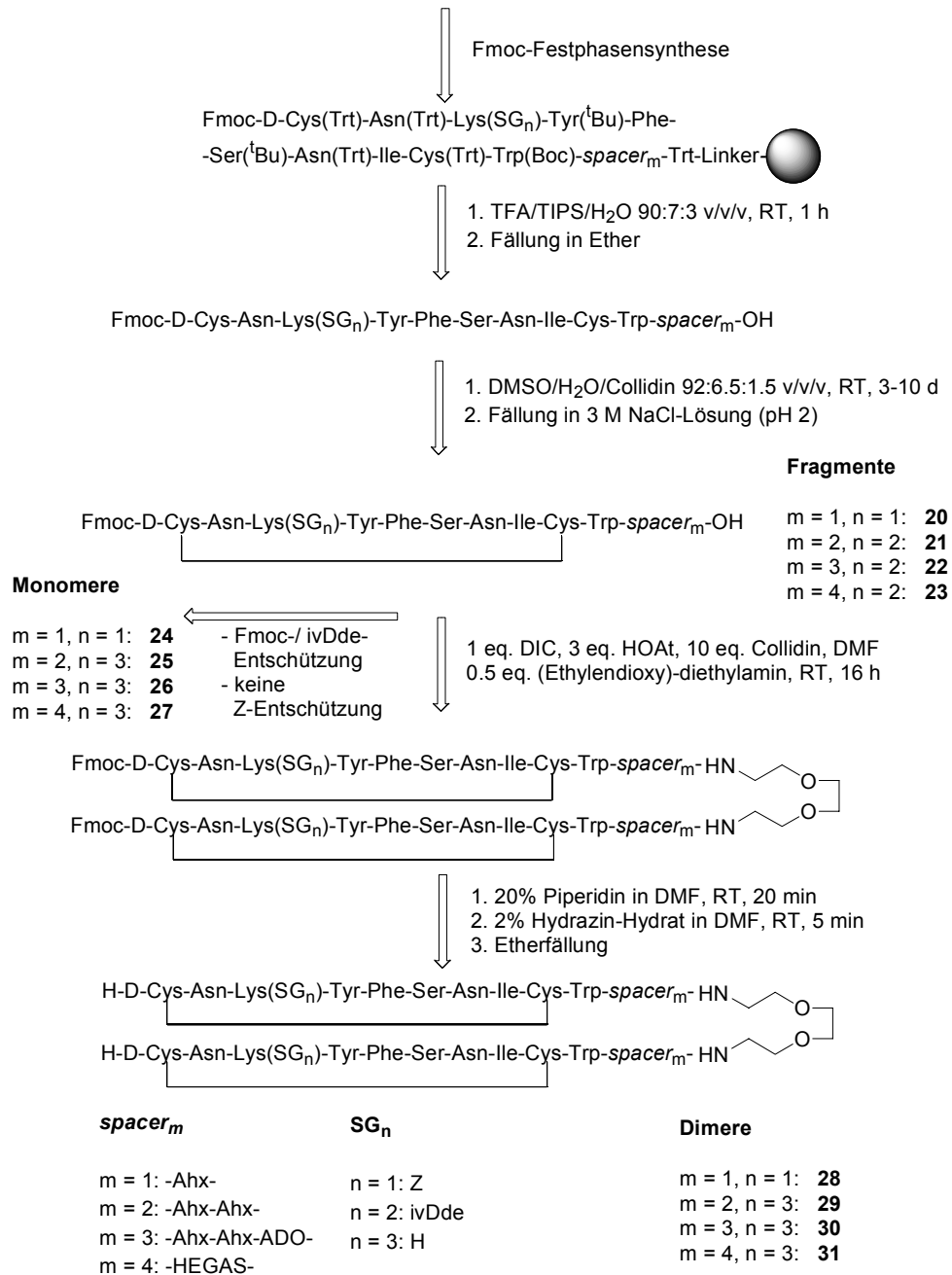
Von anderen Beispielen ist bekannt, dass Peptidkupplungen auch mit teilweise ungeschützten Aminosäuren funktionieren.<sup>[322, 323]</sup> Voraussetzung ist allerdings, dass mindestens die primären Amine der Fragmente geschützt vorliegen, da diese sonst während der Kupplungsreaktion unkontrollierbare Nebenreaktionen (z. B. Oligomerisierung) eingehen. Wendet man diese Tatsache auf die Dimerisierung vom *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> an, bedeutet dies, dass nur der N-Terminus und das ε-NH<sub>2</sub> des Lys<sup>23</sup> im Monomer mit Schutzgruppen versehen sein müssen, die erst nach der Dimerisierung entfernt werden. Die anderen Aminosäuren liegen nach TFA- und DMSO-Behandlung entweder ungeschützt vor (Asn<sup>22</sup>, Tyr<sup>24</sup>, Ser<sup>26</sup>, Asn<sup>27</sup> und Trp<sup>30</sup>) oder sind Teil der Cysteinbrücke (D-Cys<sup>21</sup> und Cys<sup>29</sup>). Die aus der Festphasensynthese stammende, säurestabile Fmoc-Schutzgruppe am N-Terminus kann für die Fragmentkupplung in Lösung beibehalten werden. Für die Lys-Seitenkette wird jedoch eine Schutzgruppe benötigt, die während der Fmoc- und Boc/Trt/<sup>t</sup>Bu-Entschützung nicht entfernt wird, d. h. die basen- und säurestabil ist.



**Abbildung 2.29:** *Z* und *ivDde* als basen- und säurestabile Schutzgruppen mit ihren Abspaltbedingungen und die spacer-Moleküle *Ahx*, *ADO* und *HEGAS*.

Die Dimersynthese mit teilentschützten Peptidfragmenten wurden mit *Z*- oder *ivDde*-geschütztem Lysin durchgeführt (Abbildung 2.29). *Z* (Benzyloxycarbonyl- oder Cbz)<sup>[324]</sup> wird mit 90%igen TFA-Lösungen nur sehr langsam hydrolysiert,<sup>[325]</sup> ist stabil gegenüber schwachen organischen Basen und kann mit Wasserstoff und Pd<sup>0</sup> auf Kohle als Katalysator hydrogenolytisch abgespalten werden. Die *ivDde*-Schutzgruppe ist ebenfalls stabil gegenüber TFA- und Piperidin-Lösungen und kann selektiv - ähnlich wie die *Dmab*-Gruppe (siehe Kapitel 2.6.2) - mit 2% Hydrazin-Hydrat in NMP abgespalten werden.<sup>[326, 327]</sup> Als *spacer* wurden die unpolare ε-Aminohexansäure (*Ahx*) und die gut wasserlöslichen Polyethylenglycol-Aminosäuren *HEGAS*<sup>[328]</sup> und *ADO*<sup>[329]</sup> verwendet (Abbildung 2.29). Durch unterschiedliche Kombination dieser kann nicht nur die Länge zwischen den Bindungsepitopen im Dimer variiert werden, sondern es wird auch Einfluss auf Löslichkeit und Polarität der Monomere ausgeübt. Das zur Dimerisierung verwendete *linker*-Molekül 2,2'-

(Ethyldioxy)-diethylamin (EDA) besitzt durch seine Ethylenglycoleinheit die selbe löslichkeitssteigernde Eigenschaft wie HEGAS oder ADO. Die Synthese der Dimere **28-31** ist in Abbildung 2.30 dargestellt.



**Abbildung 2.30:** Dimersynthese mit Z- oder ivDde geschütztem Lys<sup>23</sup> (n = 1,2). Die Buchstaben m bezeichnen das jeweilig verwendete spacer-System am C-Terminus des Monomers.

Nach Festphasenaufbau der linearen Peptidsequenz am TCP-Harz wird vom Harz abgespalten und gleichzeitig die Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen durch Behandlung mit 90%iger TFA durchgeführt. Die Disulfidbrückencyclisierung erfolgt in DMSO mit niedriger Peptidkonzentration ( $< 10^{-3}$  M) unter Zusatz von Collidin, weil im leicht basischem Milieu die Reaktion bedeutend schneller verläuft.<sup>[276, 277]</sup> Wie beabsichtigt reicht die Basenstärke von Collidin nicht aus, um die Fmoc-Schutzgruppe vom N-Terminus abzuspalten.

Die teilgeschützten, disulfidverbrückten Fragmente **20-23** lassen sich mit den Kupplungsreagenzien DIC/HOAt über EDA als Diamin-*linker* in DMF C-terminal dimerisieren. DMF wird deswegen verwendet, weil die Fragmente **20-23** darin gut löslich sind und das Lösungsmittel nach Vervollständigung der Reaktion (16 h) destillativ gut abgetrennt werden kann (im Gegensatz zu NMP). Das Dimer wird anschließend mit Hilfe von Piperidin- bzw. Hydrazin-Lösungen vollständig entschützt und nach Etherfällung über präparative HPLC gereinigt. Die Monomere **24-27** erhält man nach ähnlicher Behandlung der teilgeschützten, cyclisierten Fragmente **20-23**.

Es hat sich herausgestellt, dass die Fmoc/ivDde-Entschützung in Lösung ohne Probleme verläuft, jedoch ist die Z-Entschützung mit H<sub>2</sub> und Pd/C als Katalysator im Fall von **24** und **28** nicht möglich. Selbst bei höheren Temperaturen und langen Reaktionszeiten ist kein Umsatz erkennbar. Wahrscheinlich erlaubt die Sekundärstruktur der cyclisierten Peptide keine für die Hydrierung wichtige Anlagerung an den Pd-Katalysator. Vom Monomer **24** konnte zusätzlich noch das am C-Terminus mit einem EDA-*linker* verknüpfte Zwischenprodukt **32** isoliert werden. In Tabelle **2.4** sind die IC<sub>50</sub>- und Q-Werte aus dem FACS-Test der Mono- und Dimere aufgelistet.

**Tabelle 2.4:**  $IC_{50}$ - und  $Q$ -Werte von cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>-Monomeren und -Dimeren.

	Bezeichnung	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	$Q = IC_{50}(\text{Peptid})/IC_{50}(\mathbf{8})$
<b>24</b>	Monomer Lys(Z) <sup>23</sup> -Ahx	0.9	1.2
<b>32</b>	Monomer Lys(Z) <sup>23</sup> -Ahx+linker	0.4	1.9
<b>28</b>	Dimer Lys(Z)-Ahx	12	60
<b>25</b>	Monomer Ahx-Ahx	1.2	3.0
<b>29</b>	Dimer Ahx-Ahx	0.6	1.5
<b>26</b>	Monomer Ahx-Ahx-ADO	2.2	3.1
<b>30</b>	Dimer Ahx-Ahx-ADO	2.6	1.7
<b>27</b>	Monomer HEGAS	2.4	1.5
<b>31</b>	Dimer HEGAS	3.9	2.4 <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> Bei hohen Konzentrationen >10  $\mu$ M besitzt das Peptid zelltoxischen Charakter.

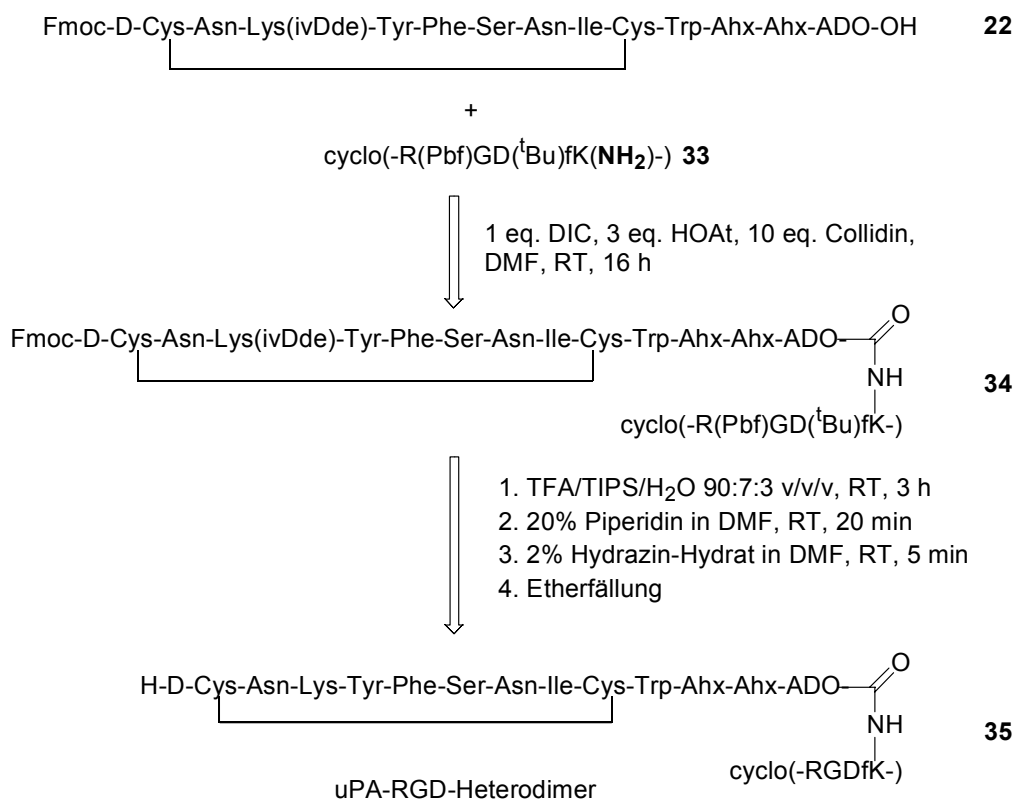
Aus den  $Q$ -Werten der Peptide **29** und **30** lässt sich deutlich erkennen, dass die Dimerisierung im Vergleich zu den Monomeren **25** und **26** eine Aktivitätssteigerung um den Faktor 2 zur Folge hat. Zurückzuführen ist dies wahrscheinlich auf den in Abbildung **2.25d** gezeigten Fall der lokalen Konzentrationserhöhung. Das *clustering* von uPA-Rezeptoren durch die multimeren Liganden (Abbildung **2.25a** und **2.25b**) ist dagegen wenig plausibel, da ein Aktivitätsanstieg um mehr als den Faktor 2 durch weitere kooperative Effekte nicht erzielt werden konnte.

Im Fall des Dimers **31** ist dagegen ein leichter Abfall der Aktivität im Gegensatz zum Monomer zu beobachten. Ein Grund dafür könnte der hohe Anteil an Ethylenglycol-Einheiten des HEGAS sein, der eine zelltoxische Wirkung des Peptids hervorruft. Auch in anderen Untersuchungen konnte deutlich gezeigt werden, dass eine hohe Polyethylenglycol-Konzentration bei

unterschiedlichen Zelllinien und Bakterien zum unkontrollierten Zelltod (Nekrose) führt.<sup>[330-332]</sup>

Das Monomer **24** mit dem Z-geschützten Lys<sup>23</sup> behält seine Aktivität weitgehend nach Verknüpfung mit dem EDA-*linker* (Peptid **32**), ist aber vollständig inaktiv im dimerisierten Fall (Peptid **28**). Das mag entweder an der schlechten Wasserlöslichkeit der zwei hydrophoben Z-Schutzgruppen im Peptid oder am kurzen *spacer*-System von nur einer Ahx pro Molekülhälfte liegen. Das beste *spacer-linker*-System besteht anscheinend aus einer Mischung aus Ahx und kurzen Ethylenglycoleinheiten, da so gute Wasserlöslichkeit auf der einen Seite und kaum Zelltoxizität auf der anderen Seite gewährleistet ist. In jedem Fall sollten die Bindungsepitope ungeschützt vorliegen.

Das am C-Terminus verlängerte *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> kann auch verwendet werden, um durch Verknüpfung mit anderen peptidischen Wirkstoffen Heterodimere herzustellen. Das Prinzip wurde anhand des Fragments **22** mit dem Linkersystem Ahx-Ahx-ADO und des  $\alpha\beta$ 3-Integrinliganden *cyclo*(-RGDfK-) (siehe Kapitel **3.5.3**) exemplarisch durchgeführt. Wie in Abbildung **2.31** gezeigt, wurde das teilgeschützte, cyclische RGD-Peptid **33** über seine Lys-Seitenkette mit dem C-Terminus des Urokinase-Peptids verknüpft. Die Kupplung wurde wie im Fall der Dimerisierung mit den Reagenzien DIC, HOAt und Collidin in DMF durchgeführt. Entscheidend dabei ist, dass nur ein Äquivalent des Kupplungsreagenzes DIC verwendet wird, damit keine unerwünschten Nebenreaktionen (Ser/Tyr-Ester, DIC-Addukt am zu kuppelnden Amin) entstehen. Die Schutzgruppen <sup>t</sup>Bu, Pbf, Fmoc und ivDde werden im Anschluss nacheinander in drei Schritten mit TFA, Piperidin und Hydrazin entfernt.



**Abbildung 2.31:** *Synthese eines uPA-RGD-Heterodimers*

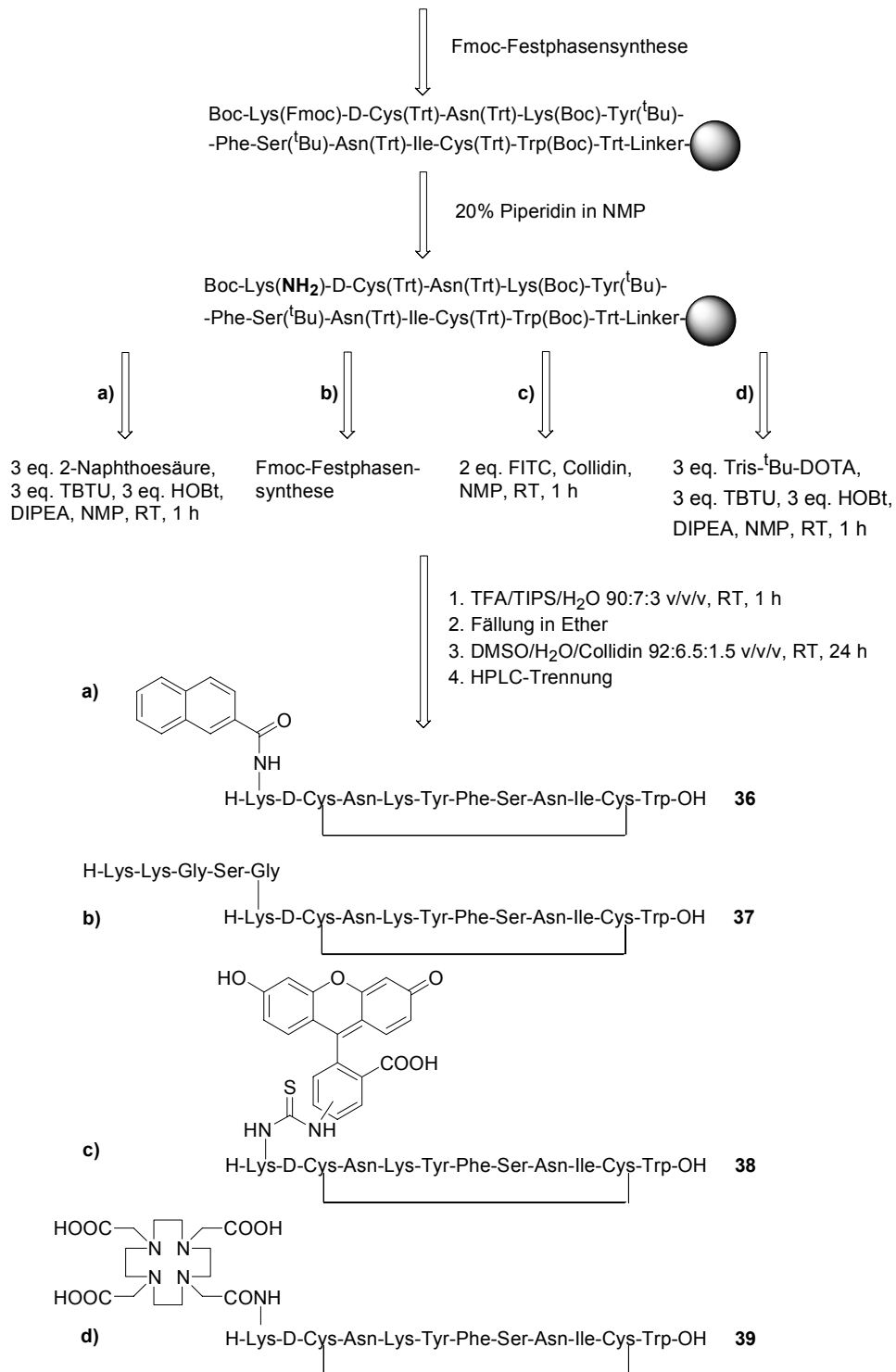
Laut FACS-Aktivitätsmessungen besitzt das Heterodimer **35** eine 2.6-fach niedrigere Aktivität für den Urokinase-Rezeptor als  $\text{cyclo}[21,29][\text{D-Cys}^{21},\text{Cys}^{29}]\text{-uPA}_{21-30}$ , und ist somit mit dem Monomer **26** ( $Q = 3.1$ ) vergleichbar. Die Aktivität von **35** gegenüber  $\alpha\beta 3$ -Integrinen mit 2.6 nM entspricht dem typischen Wert des Referenzpeptids  $\text{cyclo(-RGDfV-)}$ .<sup>[333]</sup> Die beiden Epitope des Heterodimers beeinflussen sich gegenseitig nicht in der Affinität zu den entsprechenden Rezeptoren. Der Weg steht somit offen für die Synthese einer Reihe von Heterodimeren, die sowohl in das Urokinase- als auch in Integrinsysteme eingreifen. Von Interesse wären insbesondere Untersuchungen mit dem in Kapitel 2.2.6 beschriebenen  $\alpha\text{M}\beta 2$ -Integrinepitop „Clone 25“ (AESTYHHLSLGYMYTLN),<sup>[119]</sup> das für die direkte Wechselwirkung der beiden Rezeptortypen verantwortlich zu sein scheint.

### 2.5.3 Synthese von N-terminal funktionalisiertem *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>

N-terminale Modifikationen sind an der festen Phase wegen des linearen Aufbaus vom C- zum N-Terminus synthetisch sehr leicht zugänglich. Von großer Bedeutung für die Verknüpfung mit Funktionalitäten ist dabei das  $\alpha$ -Amin des N-Terminus oder das  $\epsilon$ -Amin in der Seitenkette von Lys, da diese leicht zu Amiden, Harnstoffen oder Thioharnstoffen umgesetzt werden können. Wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, kann der N-Terminus von *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> um eine Aminosäure verlängert werden, wenn das  $\alpha$ -Amin der N-terminalen Aminosäure dabei unangetastet bleibt. Es bietet sich deshalb an, an Position 20 ein Lys einzuführen, das an der Seitenkette mit verschiedenen Funktionalitäten ausgestattet wird. Für die Manipulation der Lys-Seitenkette benötigt man eine etwas andere Schutzgruppenstrategie, da der N-Terminus während der Seitenkettenmodifikation am Lys<sup>20</sup> geschützt sein muss. Man verwendet dazu für die Peptidsynthese das umgekehrt geschützte Boc-Lys(Fmoc)-OH, das nach Fmoc-Entschützung nur sein Seitenkettenamin für Reaktionen zur Verfügung stellt.

Um den Einfluß von N-terminalen Modifikationen auf die Aktivität des Liganden zu überprüfen, wurde an das Lys<sup>20</sup> über eine Standardkupplung eine räumlich anspruchsvolle 2-Naphthoesäure oder die Peptidsequenz Lys-Lys-Gly-Ser-Gly gehängt (Abbildung 2.32). Das harzgebundene Peptid ist währenddessen an allen anderen reaktiven Stellen mit säurelabilen Schutzgruppen versehen, die nach der Kupplung an der Lys-Seitenkette mit TFA abgespalten werden. Die Cysteinbrückencyclisierung erfolgt abschließend mit DMSO in Lösung. Die Aktivität des Naphthoyl-Peptids **36** und des Peptids mit KKGSG-Sequenz **37** ist dabei wie im Fall des Val<sup>20</sup>-Derivats **9** um das vier- bis fünffache abgesunken (Tabelle 2.5), d. h. Reste an der Lys-Seitenkette beeinflussen die Bindung zum uPAR selber nicht.





**Abbildung 2.32:** *Synthese von funktionalisierten cyclo[21,29][Lys<sup>20</sup>,D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>20-30</sub>-Peptiden über die Seitenkette des Lys<sup>20</sup>. Die Abspaltung, Entschützung und Cyclisierung der Peptide erfolgt auf die gleiche Weise.*

Für den FACS-Test wird bisher eine mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)<sup>[334,335]</sup> kovalent verknüpfte Urokinase verwendet. Diese steht während des Aktivitätstests in Konkurrenz mit dem zu untersuchenden uPAR-Antagonist (siehe Kapitel 2.3.3). Die gentechnische Herstellung der „gelabelten“ Urokinase ist aufwendig und relativ teuer. Die Anbringung des FITC-labels geschieht außerdem unspezifisch an irgend einer am Protein außen liegenden Lys-Seitenkette, was bedeutet, dass ein Teil der Urokinase im schlechtesten Fall deaktiviert vorliegt, da auch das Lys<sup>23</sup> des Bindungsepitops betroffen sein kann. Es wäre deswegen von Vorteil, wenn an Stelle der Urokinase ein peptidischer Antagonist zur Verfügung stehen würde, den man in größeren Mengen synthetisch herstellen und mit FITC selektiv an nur einer Stelle verknüpfen kann, ohne dass es dabei zu starken Aktivitätsverlusten kommt. Zu diesem Zweck wurde an der Lys-Seitenkette des nur am Lys<sup>20</sup> ungeschützten *cyclo*[21,29][Lys<sup>20</sup>,D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>20-30</sub> der FITC-label addiert (Abbildung 2.32c). Die Reaktion aus Amin und Isothiocyanat zum Thioharnstoff erfolgt unter leicht basischen Bedingungen (Collidin) in NMP innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur.

**Tabelle 2.5:** Aktivitäten von Lys<sup>20</sup>-seitenkettenfunktionalisiertem *cyclo*[21,29][Lys<sup>20</sup>,D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>20-30</sub>.

	Bezeichnung	IC <sub>50</sub> [μM]	Q = IC <sub>50</sub> (Peptid)/ IC <sub>50</sub> (X)
9	Val <sup>20</sup>	1.4	4.0
36	Lys <sup>20</sup> (2-Naphthoyl)	1.3	3.7
37	Lys <sup>20</sup> (KKGSG)	7.6	5.1
38	Lys <sup>20</sup> (FITC)	2.2	3.6
39	Lys <sup>20</sup> (DOTA)	10.5	7.0

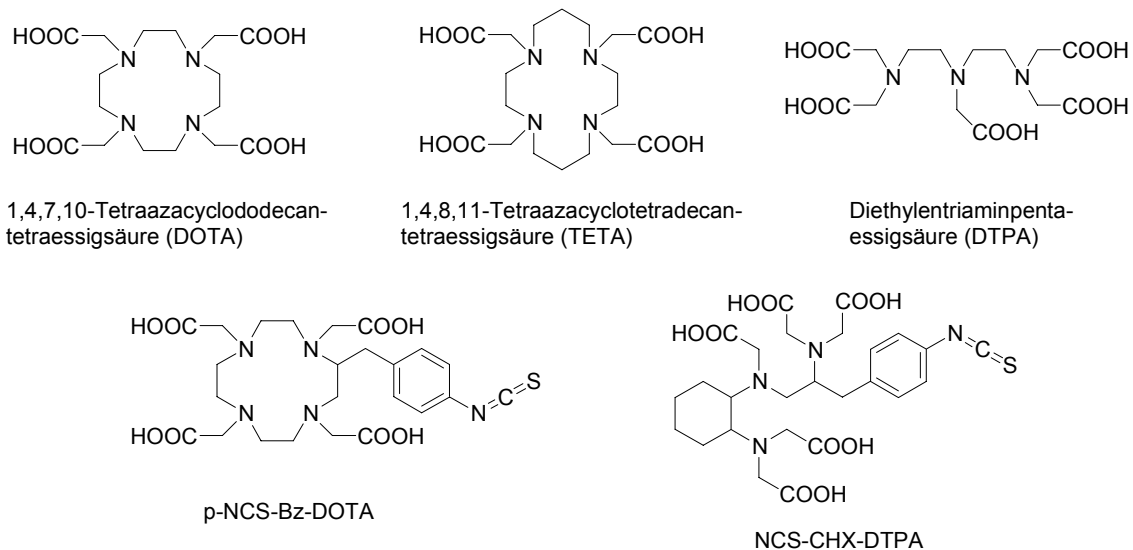
Besonders attraktiv sind radioaktiv-funktionalisierte Moleküle, die für therapeutische und indikative Zwecke in der Nuklearmedizin benutzt werden können. Idealerweise sind dies sog. Radiopharmazeutika mit geringem Molekulargewicht, die sich im Tumorgewebe schnell und in hoher Konzentration anreichern, um dort das Tumorgewebe durch Strahlung zu schädigen oder es durch Szintigrafie bzw. Positronen-Emissions-Tomografie (PET)<sup>[336]</sup> sichtbar zu machen. Dazu werden hoch aktive und selektive Trägermoleküle wie z. B. Peptide, Proteine oder Antikörper benötigt, die eine möglichst lange metabolische Stabilität *in vivo* aufweisen und außerhalb des Tumorgewebes schnell ausgeschieden werden. Letzteres ist notwendig, um die Strahlungsbelastung für gesundes Gewebe (besonders Niere, Leber und Knochenmark) gering zu halten.<sup>[337]</sup> Da der Urokinase-Rezeptor hauptsächlich auf bestimmten Tumorzelllinien überexprimiert wird, wäre ein selektiver Ligand wie das *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> in Verknüpfung mit einem Radionuklid ein ideales Instrument, um Tumorgewebe sichtbar zu machen oder zu schädigen.

Die Auswahl des Radionuklids hängt ab von seiner Strahlungsart ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), der Strahlungsintensität, der Halbwertszeit, der Verfügbarkeit und der Art und Weise, wie es in ein bioaktives Molekül eingebracht werden kann. Dabei sollte die Halbwertszeit in etwa der biologischen Halbwertszeit des Radiopharmazeutikums im Tumorgewebe entsprechen, weil sonst bei schnellem Zerfall kaum Radioaktivität mehr vorhanden ist, bevor eine maximale Anreicherung des Trägermoleküls im Tumor erreicht wird. Im entgegengesetzten Fall von zu langer Halbwertszeit kann gesundes Gewebe geschädigt werden, weil die Radioaktivität nach Zerfall des Trägermoleküls durch fehlende Selektivität nicht mehr im Tumor festgehalten werden kann.<sup>[338, 339]</sup> In letzter Zeit setzt sich immer mehr die Radiomarkierungen über bifunktionale Chelatliganden durch, die mit dem Trägermolekül kovalent verknüpft werden und über Komplexbildung radioaktive Metalle dauerhaft

binden. Die in Abbildung **2.33** gezeigten Chelatliganden besitzen folgende Vorteile:

- Die Herstellung und Isolierung des Trägermoleküls mit Chelatligand findet vor dem Radio-*labeling* statt. Die kovalente Verknüpfung beider Einheiten erfolgt meist über Amidbindungen oder Thioharnstoffe. Die chemischen Vorläufer Carbonsäure bzw. Aktivesters oder Isothiocyanat sind für die Peptid-Festphasensynthese ideal geeignet. Proteine und Antikörper werden unselektiv über das  $\epsilon$ -Amin eines Lys mit dem Chelatliganden verknüpft.
- Die vom EDTA abgeleiteten multimeren Amino- oder Azaalkylenessigsäuren binden bevorzugt 3-wertige, "harte" Metallkationen über eine bis zu achtfache Koordinierung durch die N/O-Donoren. Die Polyazamakrocyclen wie z. B. 1,4,7,10-Tetraazacyclododecantaetraessigsäure (DOTA) (siehe Abbildung **2.33**) haben eine hohe Komplexstabilität, so dass es selbst bei pH-Werten  $< 2$  zu keiner *in vivo*-Dekomplexierung kommt.<sup>[340-342]</sup> Lineare bivalente Liganden wie z. B. Diethylentriaminpentanessigsäure (DTPA) dagegen sind bekannt dafür, dass ein geringer Prozentsatz des Radionuklids mit der Zeit freigesetzt wird, was zu unkontrollierbarer Verteilung im Organismus führt.<sup>[343-345]</sup>
- Als Radionuklid kommen eine Vielzahl von 3-wertigen Hauptgruppen-, Nebengruppenelementen und Lanthaniden in Frage, die je nach Isotop das gesamte Spektrum der Strahlungsarten beinhalten (Tabelle **2.6**). Das selbe Trägermolekül mit Chelatligand kann somit je nach Anwendung und Strahlungsintensität mit unterschiedlichen Radionukliden ausgestattet werden. Dabei spielt der Atomradius des Metallskations eine untergeordnete Rolle, da sowohl  $\text{Ga}^{3+}$  als auch  $\text{Bi}^{3+}$  stark komplexiert werden. Als Grundvoraussetzung gilt, dass das verwendete Metallion in komplexierter Form - und besser noch auch in freier Form - keine toxische Wirkung zeigt.

- Die Komplexbildungsreaktion für cyclische bivalente Liganden verläuft im allgemeinen in neutralen Pufferlösungen und 40-80 °C innerhalb von wenigen Minuten. Da für die Bildung eines stabilen Komplexes mehrere energetisch ungünstige Übergangszustände (Umlagerung und Bindungsrotationen des Macrocyclus) durchlaufen werden müssen,<sup>[340, 346]</sup> ist für eine schnelle Reaktion eine Erwärmung der Pufferlösung unerlässlich. Für Antikörper und Proteine muss wegen der Gefahr der Denaturierung bei Raumtemperatur und mit linearen Liganden gearbeitet werden, die eine wesentlich schnellere Kinetik bei Raumtemperatur aufweisen.<sup>[347]</sup> Durch die rasche Komplexbildung kann im allgemeinen auch mit kurzlebigen Radionukliden gearbeitet werden.



**Abbildung 2.33:** Bivalente Chelatliganden und in der Nuklearmedizin verwendete 3-wertige Metallkationen. Je nach Anwendungsgebiet können Strahlungsart und Halbwertszeit der Radionuklide variiert werden.

**Tabelle 2.6:** Dreiwertige, radioaktive Nuklide, geeignet für den Einsatz in der Nuklearmedizin

	Strahlungsart	Halbwertszeit $t_{1/2}$
$^{67}\text{Ga}$	Auger	78 min
$^{90}\text{Y}$	$\beta^-$	2.67 d
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	$\gamma$	6.05 h
$^{111}\text{In}$	Auger	2.81 d
$^{140}\text{La}$	$\beta^-$	40.2 h
$^{153}\text{Sm}$	$\beta^-$	1.93 d
$^{165}\text{Dy}$	$\beta^-$	2 h
$^{177}\text{Lu}$	$\beta^-$	6.71 d
$^{186}\text{Re}$	$\beta^-$	3.79 d
$^{213}\text{Bi}$	$\alpha$	5.01 d

Mit Hilfe von Chelatliganden werden inzwischen bemerkenswerte Ergebnisse in der Nuklearmedizin erzielt. So werden z. B. Somatostatinanaloga mit radioaktivem In, Ga, Lu oder Y markiert, um diese für diagnostische und therapeutische Zwecke einzusetzen.<sup>[348-350]</sup> Das unter dem Namen *OctreoScan* kommerziell erhältliche Radiopharmazeutikum wird erfolgreich zur Lokalisierung von menschlichen Tumoren mit hohem Somatostatin-Rezeptor-Gehalt eingesetzt.<sup>[351, 352]</sup> Auch andere bioaktive Peptide wie Bombesin, Melantropin, die HIV-tat-Sequenz und cyclische RGD-Peptide dienen als selektive Träger von Radionukliden.<sup>[353-356]</sup>

Für die Radiomarkierung von *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> wurde DOTA als Chelatligand ausgewählt, weil es hohe Komplexstabilität verspricht und als Tris-<sup>t</sup>Butyl-geschütztes Derivat kommerziell erhältlich ist.<sup>[357]</sup> Ungeschütztes DOTA kann in der Festphasensynthese nicht gekuppelt werden, da es in DMF und NMP wegen seiner hohen Polarität nicht löslich ist. Der Zusatz von Wasser als Lösungsmittel für die Festphasensynthese hat zur Folge, dass zwar das DOTA in Lösung geht, aber das TCP-Harz nicht mehr quellen

kann. Die Kupplung erfolgte wie in Abbildung **2.32** gezeigt an die Seitenkette des Lys<sup>20</sup> mittels Standardkupplungsbedingungen. Nach Entschützung und HPLC-Reinigung wurde die Aktivität des DOTA-Peptids **39** ermittelt, welche um den Faktor 7 schwächer an den uPA-Rezeptor bindet als *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> (Tabelle **2.5**). Wahrscheinlich hat die große Raumausdehnung des Liganden wegen sterischer Effekte einen negativen Effekt auf die Bindung. Auch könnten die Ladungen der DOTA-Carboxylate zur Abschwächung der Aktivität beitragen.

In ersten Stabilitätsversuchen mit <sup>209</sup>Bi-Salzen (löslicher NH<sub>4</sub>[BiJ<sub>4</sub>]-Komplex) und Trägermolekül **39** in Ammoniumacetatpuffer konnte gezeigt werden, dass das Metall vom Chelatliganden stark komplexiert wird (nach 5 min bei 60°C, Umsetzung 99%), da der Komplex selbst unter HPLC-Bedingungen (pH = 1.5) nicht zerfällt (siehe auch *Kumar et al.*<sup>[358]</sup>). Die ESI-Masse nimmt genau um 209 Einheiten zu. Andere Massen aus Nebenreaktionen oder von Zersetzungsprodukten konnten nicht festgestellt werden. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass nach Behandlung mit radioaktivem <sup>213</sup>Bi ( $\alpha$ -Strahler) keine strahlungsbedingte Fragmentierung des Peptids auftritt. FACS- und *in vitro* Versuche mit U-937-Zellen und dem <sup>213</sup>Bi-gelabelten Peptid **39** werden derzeit durchgeführt.

## 2.6 Synthese von templatbasierten Hexapeptiden

### 2.6.1 Templatkonzepte für uPAR-Antagonisten

Wie bereits erwähnt, besitzen *backbone*-cyclisierte Peptide mit kleiner Ringgröße aufgrund ihrer Aminosäuresequenz eine definierte räumliche Anordnung des Peptidgrundgerüsts und Ausrichtung der Seitenketten. Das Wissen über deren Primärstruktur und der daraus resultierenden Vorzugskonformation ermöglicht ihre Verwendung als Strukturtemple. Man geht davon aus, dass Cyclopeptide, deren Strukturen bekannt sind, unter Beibehaltung von strukturinduzierenden Elementen (z. B. D-Aminosäuren, Prolin, Glycin) - jedoch bei Austausch von Seitenketten - ihre ursprüngliche Konformation beibehalten.<sup>[279, 359]</sup>

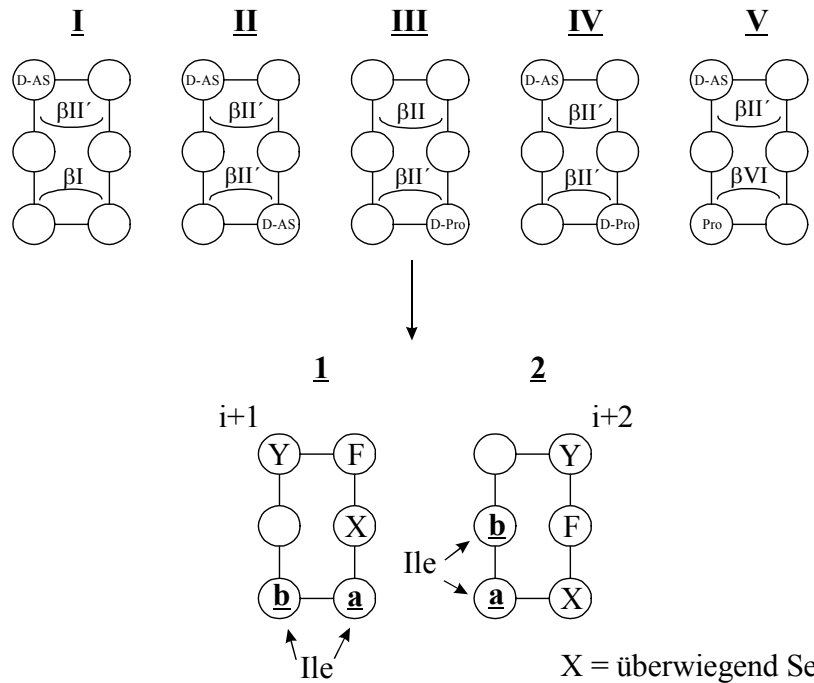
Im Fall des uPAR-Antagonisten *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>, wurde von C. Rölz eine Überlagerung der in Kapitel 2.3.3 erläuterten Struktur mit *backbone*-cyclisierten Modellpeptiden durchgeführt. Dabei wurden folgende Überlegungen berücksichtigt:

- Die für die Bindung an uPAR wichtigen Aminosäuren Tyr<sup>24</sup>, Phe<sup>25</sup> und Ile<sup>28</sup> sollen in genannter Reihenfolge in hexacyclische Peptide integriert werden; weitere Aminosäuren fungieren als Abstandhalter. Pentacyclen werden nicht eingesetzt, da diese in der Raumausdehnung und Variabilität der strukturinduzierenden Einheiten zu stark eingeschränkt sind.
- Das Ile wird im Abstand von bis zu zwei Aminosäuren mit der Tyr-Phe-Dipeptideinheit verknüpft, um den in *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> entsprechenden Abstand zu erhalten. Als Abstandhalter werden hauptsächlich Ser und Asn verwendet, die ebenfalls in der natürlichen uPA-Sequenz an dieser Stelle enthalten sind.



- Da das C-terminale Trp<sup>30</sup> in *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> eine extracyclische Position einnimmt und damit hohe Beweglichkeit besitzt, wird es nicht in den Ring des Templats integriert, sondern bei Bedarf über geeignete peptidische Abstandshalter mit dem Cyclus verknüpft.
- Der Abstand zwischen Phe<sup>25</sup> und extracyclischem Trp<sup>30</sup> soll in etwa 6 Aminosäuren betragen, da in den bisher bekannten uPAR-Antagonisten ein solcher maßgeblich zur Aktivität beigetragen hat.
- Als strukturinduzierende Elemente werden hauptsächlich D-Aminosäuren (maximal zwei) und D-Prolin (maximal eines) verwendet.
- Die Grundlage der Strukturüberlagerung bildet die Raumorientierung der Seitenketten der Aminosäuren Tyr, Phe und Ile. Die C<sub>α</sub>-C<sub>β</sub>-Vektoren der entsprechenden Reste in *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> und im Modellpeptid sollen möglichst wenig Abweichung in ihrer Orientierung aufweisen (ausgedrückt durch den *root-mean-square-deviation*(RMSD)-Wert).

Für die Überlagerung geeigneten Modellcyclen sind in **Konzept 1** (Abbildung 2.34) aufgeführt. Dabei ergeben sich die zwei Möglichkeiten, das Tyr in der i+1- oder i+2-Position eines  $\beta$ -turns des Hexacyclus zu integrieren, um zu einer fast gestreckten Anordnung der Tyr-Phe-Ser-Ile-Sequenz zu gelangen (siehe Kapitel 2.3.3). Bei Einbau von Tyr in der i- oder i+4-Position des Cyclus würden sich durch die Stellung des Ile eine stark gewinkelte Anordnung der Aminosäuren ergeben.

**Konzept 1:**

**Abbildung 2.34:** Backbone-cyclisierte Hexapeptide bilden bevorzugt Strukturen mit zwei  $\beta$ -turns aus, die durch strukturinduzierende Aminosäuren definiert werden. Sie finden Anwendung als Templat (römische Ziffern). Weitere Unterscheidung erfolgt durch Lage des Tyr in  $i+1$ - oder  $i+2$ -Position (Ziffern 1 und 2) und durch Lage des Ile (Buchstabe a und b).

Nicht alle der oben angeführten Einschränkungen können gleichzeitig erfüllt werden. In manchen Fällen müssen aus synthetischen oder strukturellen Gründen Kompromisse eingegangen werden. Dies wird bereits deutlich in den für die Überlagerung berechneten RMSD-Werte, die im Durchschnitt bei 0.8 – 1.4 Å liegen, was hauptsächlich durch die Abweichung in der Seitenkettenorientierung des Ile verursacht wird. Peptide mit Ile in der b-Position (siehe Abbildung 2.34) wurden zwar während der Strukturüberlagerung nicht berücksichtigt, da eine größere Abweichung in der räumlichen Anordnung der Aminosäureseitenketten zu erwarten ist, aber

dennoch aus Gründen eines erweiterten *screenings* in die Syntheseplanung der Peptide **40-59** mit eingeschlossen.

**Tabelle 2.7:** Backbone-cyclisierte Hexapeptide **40-59** nach **Konzept 1** unter Berücksichtigung der essentiellen Reste Tyr, Phe und Ile und deren vermutete räumliche Anordnung in cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>.

	Position						Templat
	i+1	i+2	i+3	i+4	i+5	i	
<b>40</b>	D-Tyr	Phe	Ser	Ile	Asn	Lys	<b>I.1.a</b>
<b>41</b>	D-Tyr	Phe	Ser	Asn	Ile	Lys	<b>I.1.b</b>
<b>42</b>	Tyr	Phe	Ser	D-Ile	Asn	Lys	<b>I.1.a</b>
<b>43</b>	Tyr	Phe	Ser	D-Asn	Ile	Lys	<b>I.1.b</b>
<b>44</b>	Lys	Tyr	Phe	D-Ser	Ile	Asn	<b>I.2.a</b>
<b>45</b>	Lys	Tyr	Phe	D-Ser	Asn	Ile	<b>I.2.b</b>
<b>46</b>	D-Lys	Tyr	Phe	Ser	Ile	Asn	<b>I.2.a</b>
<b>47</b>	D-Lys	Tyr	Phe	Ser	Asn	Ile	<b>I.2.b</b>
<b>48</b>	D-Tyr	Phe	Ser	D-Ile	Asn	Lys	<b>II.1.a</b>
<b>49</b>	D-Tyr	Phe	Ser	D-Asn	Ile	Lys	<b>II.1.b</b>
<b>50</b>	D-Lys	Tyr	Phe	D-Ser	Ile	Asn	<b>II.2.a</b>
<b>51</b>	D-Lys	Tyr	Phe	D-Ser	Asn	Ile	<b>II.2.b</b>
<b>52</b>	Lys	Tyr	Phe	D-Pro	Ile	Asn	<b>III.2.a</b>
<b>53</b>	Lys	Tyr	Phe	D-Pro	Asn	Ile	<b>III.2.b</b>
<b>54</b>	D-Lys	Tyr	Phe	D-Pro	Ile	Asn	<b>IV.2.a</b>
<b>55</b>	D-Lys	Tyr	Phe	D-Pro	Asn	Ile	<b>IV.2.b</b>
<b>56</b>	Tyr	Phe	Ser	Pro	Ile	Lys	<b>V.1.b</b>
<b>57</b>	Tyr	Phe	Ser	Pro	Ile	D-Lys	<b>V.1.b</b>
<b>58</b>	Tyr	Phe	Asn	Ile	Lys	Asn	-
<b>59</b>	Tyr	Phe	Asn	Lys	Ile	Asn	-

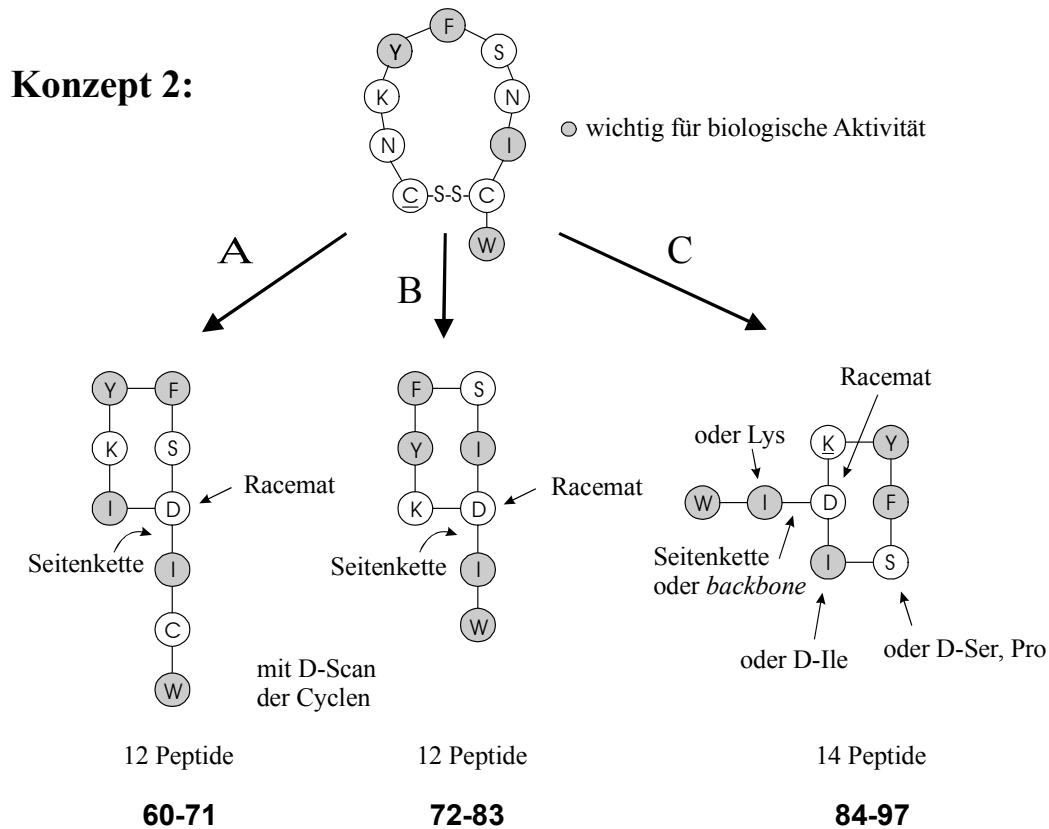
Um das in den oben genannten Peptiden noch nicht berücksichtigte C-terminale Trp mit einzubeziehen, muss das Konzept um eine Verzweigungsstelle im Cyclus erweitert werden. Dafür wird an einer Position im Cyclus, die nicht mit einer für die Aktivität oder Struktur wichtigen Aminosäure belegt ist, ein trifunktionaler Baustein (siehe Kapitel 2.6.2) eingebaut, was eine weitere Einschränkung des Templatansatzes zur Folge hat. Die Positionen in direkter Nachbarschaft zur Tyr-Phe-Einheit scheiden für eine Verzweigung aus, da ansonsten der extracyclische, lineare Peptidrest zu nahe am Tyr oder Phe liegen könnte. In Frage kommen somit die Positionen a und b (laut Abbildung 2.34) im *backbone*-cyclisierten Peptid (siehe **Konzept 2A** und **2B**). Wie in Abbildung 2.35 gezeigt, wird als Verzweigungseinheit ein racemisches Asp verwendet, das an seiner Seiten- bzw. Hauptkette ein lineares Peptid mit C-terminalem Trp trägt.

Damit der ungefähre Abstand von 6 Aminosäuren zwischen Trp und Phe gewährleistet wird, wird ein entsprechend langes, lineares Peptid am Cyclus angebracht, das in manchen Fällen ein zusätzliches Ile enthält. Dieses Ile könnte anstelle des im Ring enthaltenen Ile mit an der Bindung an den uPA-Rezeptor beteiligt sein, falls letzteres den räumlichen Anforderungen der Rezeptortasche nicht entspricht.

Um auch nicht vorhersehbare konformationelle Anordnungen zu berücksichtigen, werden im Design der Peptidbibliotheken mit extracyclisch angebrachtem Trp D-Aminosäure-Scans vorgesehen; auch unter Verwendung von zwei oder drei D-Aminosäuren im Hexacyclus. Dieses sogenannte „räumliche *screening*“ wurde bereits im Fall von anderen cyclischen Antagonisten erfolgreich durchgeführt.<sup>[297, 360]</sup>

Das **Teilkonzept 2C** beruht auf der Templatstruktur mit dem kleinsten RMSD-Wert von 0.8 Å aus der oben beschriebenen Überlagerung mit *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>. Charakteristisch ist die Lage des Tyr in der i+2-Position eines  $\beta$ -turns und die Anbringung des linearen Trp-Peptids in i-Position (Templat I.2.a laut Abbildung 2.34). In diesem Fall wird kein D-Scan

vorgenommen, jedoch neben der Cyclisierungsart (über *backbone* oder Seitenkette) eine Reihe anderer Substitutionen, die zusätzlichen Einfluss auf die Konformation der Peptide **84-97** nehmen sollen (siehe Abbildung **2.35**).

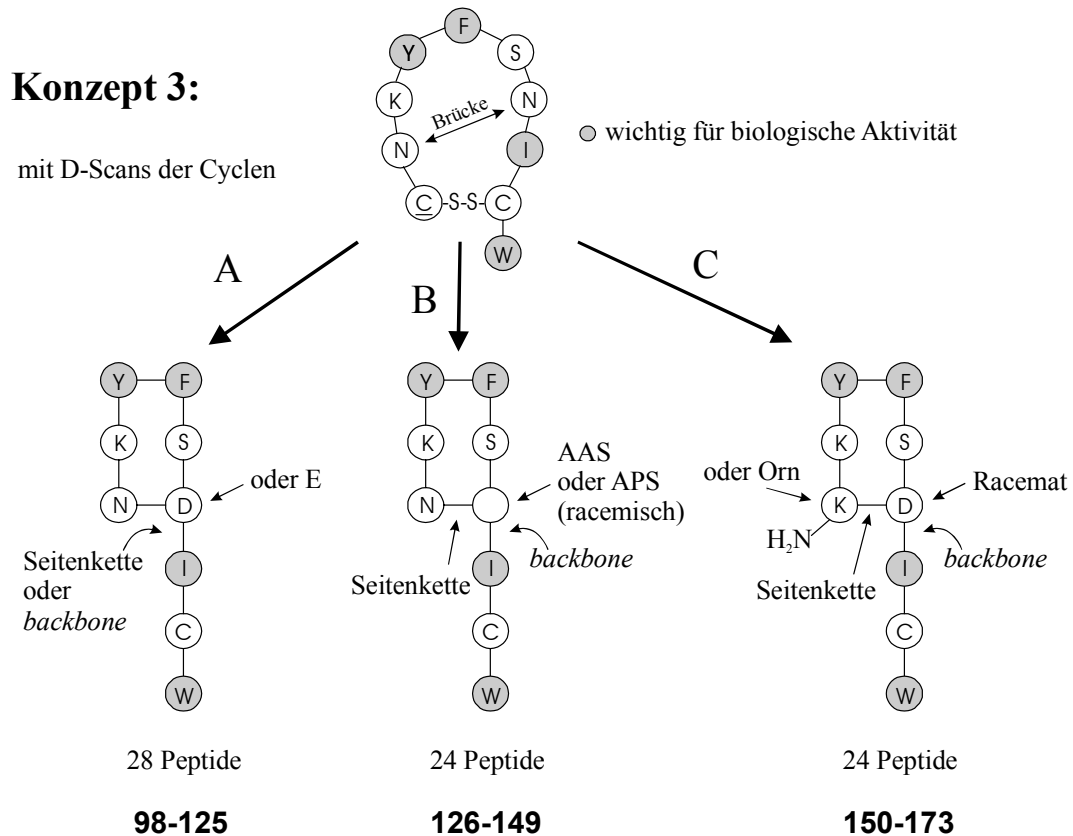


**Abbildung 2.35:** Cyclische Hexapeptide **60-97** mit Asp als Verzweigungseinheit, extracyclischen, linearen Peptiden und Trp als C-terminale Aminosäure.

Das **Konzept 3** (Abbildung **2.36**), das ebenfalls die Eigenschaft von Cyclohexapeptiden als Templat verwendet, basiert auf der Annahme, dass die beiden Asn des *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> eine nur untergeordnete Rolle spielen, da diese im Ala- bzw. D-Scan ohne größeren Aktivitätsverlust ausgetauscht werden können. Der Abstand der C<sup>α</sup>-Atome der beiden Asn in der Struktur von *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> beträgt 7.8 Å. Ausgehend davon wurde die Überlegung angestellt, eine in der Länge variierende Verbrückung der beiden Asn vorzunehmen, um zu Hexacyclen zu gelangen. In

allen diesen Peptiden sind die essentiellen Reste Ile und Trp extracyclisch mit dem Ring verknüpft.

Um die Länge der Brücke oder den Abstand zum C-terminalen Trp zu variieren, wird Asp, Glu oder Homologe dazu als trifunktionelles Bauteil verwendet. Wird ein zusätzliches Lys oder Orn in Nachbarschaft zur Verzweigungseinheit eingebaut, kann die Cyclisierung über die Seitenkette dieser Aminosäure unter gleichzeitiger Beibehaltung des N-Terminus erfolgen (**Konzept 3C**). Um systematisch die Stellung der Aminosäuren in den beiden  $\beta$ -turns des Hexacyclus zu variieren, wird auch in diesem Fall ein D-Scan mit denen im Cyclus enthaltenen Aminosäuren durchgeführt.



**Abbildung 2.36:** Geplante Cyclopeptide **98-173** basierend auf der Verbrückung der beiden Asn in cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>. Variationen ergeben sich durch die Verwendung unterschiedlicher Brückenelemente.

### 2.6.2 Synthese von trifunktionellen Aminosäurebausteinen

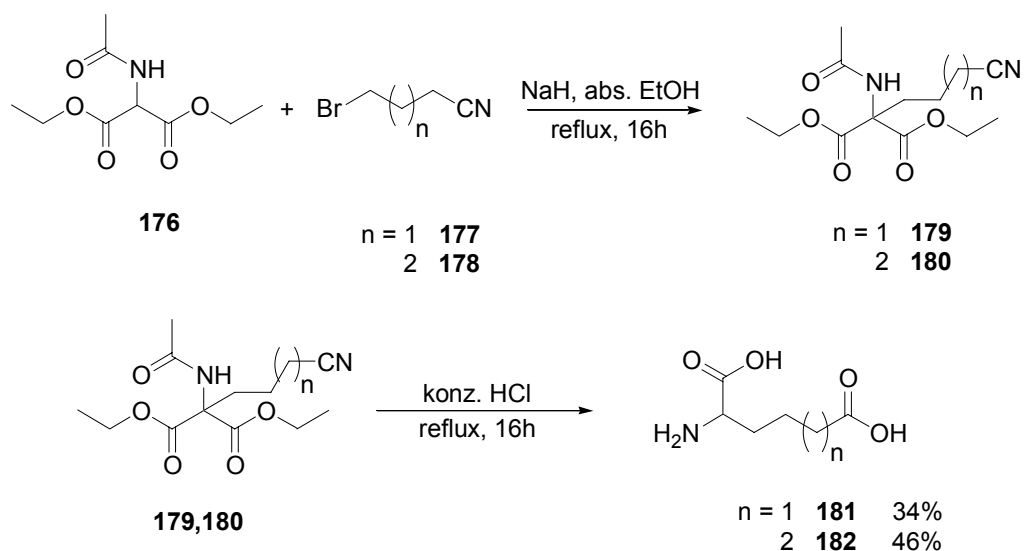
Die für die Verzweigung am Cyclus verantwortliche trifunktionelle Aminosäure muss bestimmten Anforderungen entsprechen:

- Es sollte sich um eine  $\alpha$ -Aminosäure handeln, um den für das Templatkonzept wichtigen Konformationseinfluss zu gewährleisten.
- Der Baustein muss zwei Carbonsäure- und eine Aminofunktion enthalten, da die Peptidbindungsrichtung im Cyclus und der C-Terminus erhalten bleiben soll.

Es bietet sich deshalb an,  $\alpha$ -Aminosäuren mit Säurefunktionen in der Seitenkette zu verwenden. Unter diese Klasse fallen die natürlichen Aminosäuren Asp **174** und Glu **175**, sowie die in der Seitenkette um Methylengruppen verlängerten Homologen 2-Aminoadipinsäure (AAS) **181** und 2-Aminopimelinsäure (APS) **182** und die jeweiligen D-Isomere der vier Aminosäuren.

Die beiden unnatürlichen Aminosäuren AAS **181** und APS **182** werden für den Templatansatz in racemischer Form verwendet, damit man schneller zu größerer Diversität gelangt. Die Herstellung geschieht über eine herkömmliche Acetamidomalonsäureester-Synthese mit anschließender Verseifung und Decarboxylierung der Zwischenprodukte **179** und **180**.<sup>[361,</sup>

362]



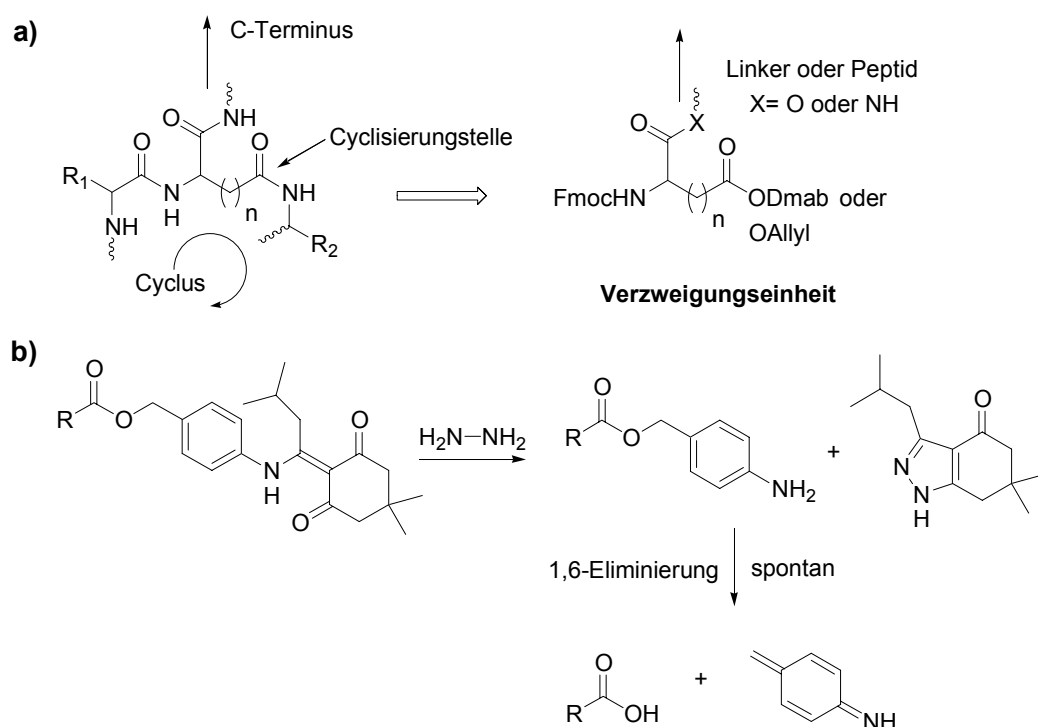
**Abbildung 2.37:** *Synthese von racemischer AAS 181 und APS 182 ausgehend von Acetamidomalonsäuredieethylester 176 und Bromalkylnitrilen 177 und 178.*

Um den linearen Peptidaufbau und die anschließende Cyclisierung während der Fmoc-Festphasensynthese unabhängig voneinander durchführen zu können, benötigt man drei orthogonale Schutzgruppen für die Verzweigungseinheit:

- Das Amin wird Fmoc-geschützt zur Verlängerung des Peptids.
- Eine Carbonsäuregruppe ist zur Immobilisierung mit dem Festphasenlinker oder einem Peptidstrang verknüpft.
- Die zweite Carbonsäuregruppe benötigt eine basen- und säurestabile Schutzgruppe, die kurz vor der Cyclisierung selektiv abgespalten werden kann.
- Die Lage der orthogonal geschützten zweiten Carbonsäuregruppe im *backbone* oder in der Seitenkette der Verzweigungseinheit bestimmt die Cyclisierungsstelle (siehe Abbildung 2.38a).

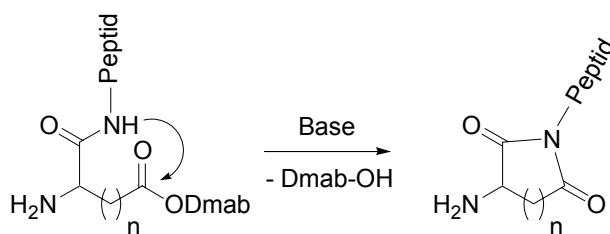


Die bisher für die Amidbindungs-Cyclisierung von Peptiden verwendete orthogonale Allylesterschutzgruppe, die mit  $\text{Pd}^0$  abgespalten wird, ist für die Festphasensynthese nur bedingt geeignet, da die Abspaltung relativ aufwendig und problembehaftet ist (z. B. das Auswaschen von Pd-Lösungen aus dem Harz).<sup>[363, 364]</sup> Als Alternative bietet sich die 1995 von *Chan et al.* entwickelte Dmab-Schutzgruppe<sup>[365, 366]</sup> an, da diese sehr effektiv innerhalb von 5 Minuten mit einer 2%igen Hydrazin-Hydrat-Lösung in DMF abgespalten werden kann (Abbildung 2.38b). Säurelabile Gruppen wie Trt oder Boc werden dadurch nicht angegriffen. Allerdings erfolgt durch die basische Hydrazin-Lösung auch eine teilweise Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe, die bei Cyclisierungen gegebenenfalls vorher durch eine Boc-Gruppe ausgetauscht werden muss.



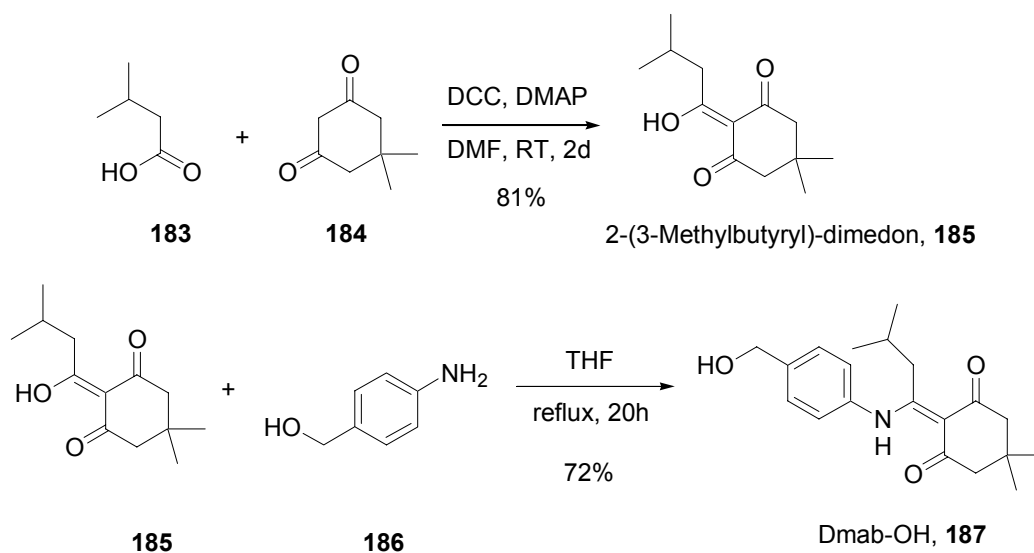
**Abbildung 2.38:** a) Anforderungen an die Orthogonalität einer trifunktionellen Aminosäure zum Aufbau von verzweigten Cyclopeptiden; b) Abspaltmechanismus der Dmab-Schutzgruppe.

Säureschutzgruppen wie Allyl-, Benzyl oder Dmab-Ester zeigen eine geringere Stabilität als entsprechende *tert*-Butylester gegenüber Nucleophilen bei Anwesenheit von Basen. So beobachtet man die Bildung von cyclischen Imiden während der Fmoc-Abspaltung durch den Angriff des Stickstoffs der in der Sequenz folgenden Aminosäure am Carbonyl des Dmab-Esters.<sup>[367-369]</sup> Verhindert werden kann dies durch die direkte Anbindung der Allyl- oder Dmab-Aminosäure am Festphasenlinker, da so das für die Nebenreaktion nötige Nucleophil fehlt.<sup>[370-373]</sup> Allerdings müssen nachfolgende Peptidsequenzen, die wie in **Konzept 2** und **3** das Cyclopeptid vom Verzweigungsbaustein in Richtung C-Terminus verlängern, über nachträgliche Fragmentkupplung angebracht werden (siehe Kapitel **2.6.4**).



**Abbildung 2.39:** *Imidbildung als typische Nebenreaktion von Peptiden mit Dmab-geschützten Aminosäuren.*

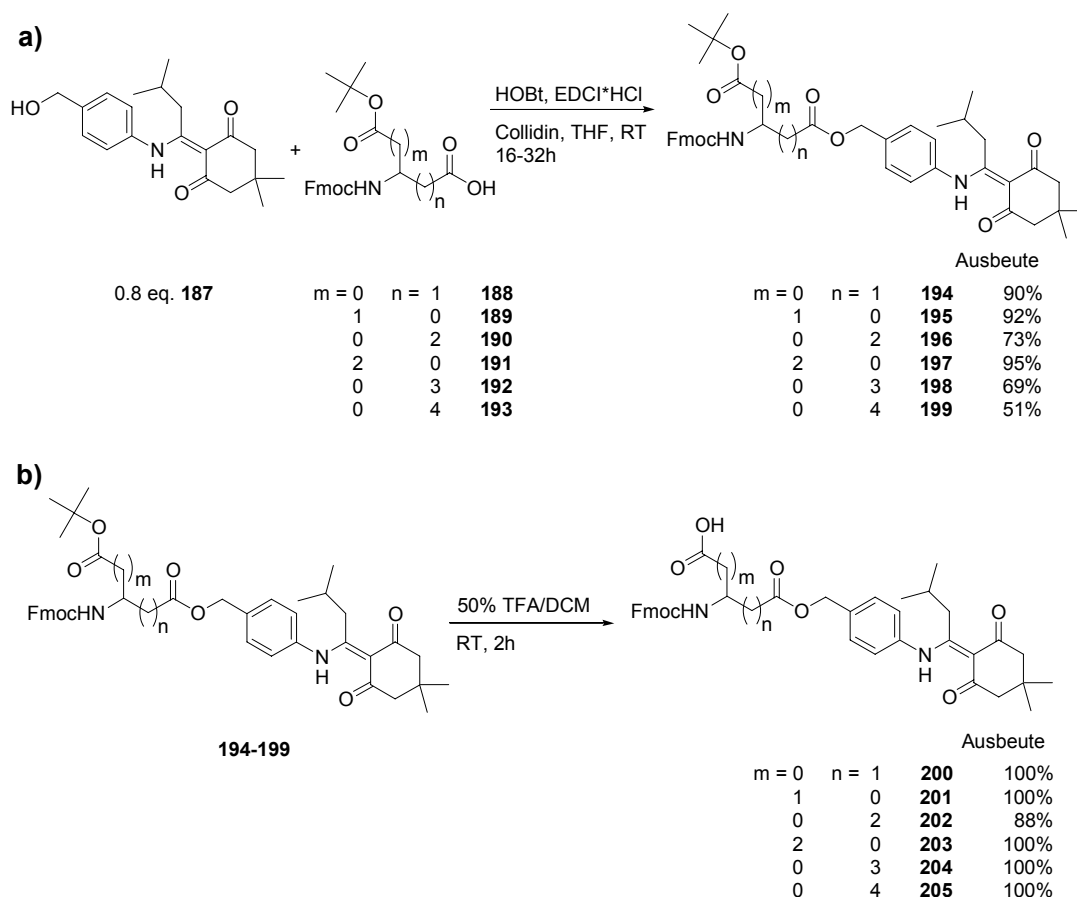
Die Aminosäurederivate von L-Asp und L-Glu mit N-Fmoc- und Dmab-Schutzgruppen (in Seitenkette oder im *backbone*) sind kommerziell erhältlich (*Novabiochem*). Alle weiteren Aminosäurederivate mussten selbst aus Aminosäuren oder durch Umschützen von Aminosäurederivate hergestellt werden. Ausgangspunkt war dabei die zweistufige, mit guten Ausbeuten verlaufende Synthese des Dmab-Alkohols **187**.<sup>[365, 374]</sup> Die erste Stufe besteht aus einer Esterkondensation von Dimedon **184** und Isovaleriansäure **183**, die zuvor mit DCC und DMAP *in situ* voraktiviert wird. Anschließend wird die Hydroxygruppe des 2-(3-Methylbutyryl)-Dimedons **185** gegen 4-Aminobenzylalkohol **186** durch Reflux in THF substituiert (Abbildung **2.40**).



**Abbildung 2.40:** 2-stufige Synthese des Dmab-Alkohols **187** ausgehend von Dimedon **184**, Isovaleriansäure **183** und 4-Aminobenzylalkohol **186**.

Die Vorstufe für die in der Festphasensynthese einsetzbaren Dmab-Verzweigungseinheiten sind die jeweiligen N-Fmoc- und einfach *tert*-Butylgeschützten Aminosäuren, die an ihrer freien Carbonsäure mit dem Dmab-Alkohol **187** verestert werden. Dies geschieht mit Hilfe des Aktivierungsreagenzes EDCI-Hydrochlorid und HOBT als Additiv in trockenem DCM mit Collidin als Base. Der Dmab-Alkohol **187** wird dabei im Unterschub eingesetzt.

Nach Aufreinigung des Produkts wird die *tert*-Butyl-Gruppe im Säuren mit einer 50%igen TFA-DCM-Mischung abgespalten, um den isolierten Peptidbaustein mit dem dadurch frei gewordenen Carboxylat am Festphasenharz immobilisieren zu können.



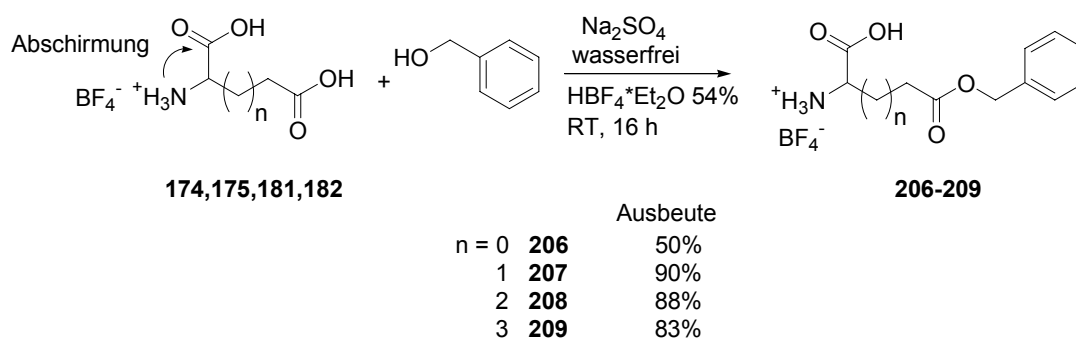
**Abbildung 2.41:** 2-stufige Synthese der Fmoc-/Dmab-geschützten Aminosäuren **200-205** aus den Edukten **188** = Fmoc-D-Asp-O<sup>t</sup>Bu, **189** = Fmoc-D-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH, **190** = Fmoc-D-Glu-O<sup>t</sup>Bu, **191** = Fmoc-D-Glu(O<sup>t</sup>Bu)-OH, **192** = Fmoc-D/L-AAS-O<sup>t</sup>Bu und **193** = Fmoc-D/L-APS-O<sup>t</sup>Bu.

Wie man anhand der Ausbeuten der Dmab-Estersynthese (Abbildung **2.41a**) leicht erkennen kann, nimmt die Reaktivität von Aktivestern in der Seitenkette einer Aminosäure mit zunehmender Kettenlänge ab. Zum Teil konnten im Fall von AAS und APS stabile HOBt-Ester als Zwischenprodukte isoliert werden. Die Abspaltung der *tert*-Butylgruppe (Abbildung **2.41b**) verläuft quantitativ.

Die Fmoc/<sup>t</sup>Butyl-Derivate von AAS **192** und APS **193** sowie Fmoc-D-Glu-O<sup>t</sup>Bu **190** sind kommerziell nicht erhältlich. Es musste deswegen nach einer

Synthese-Route gesucht werden, die es ermöglicht, selektiv nur das  $\alpha$ -Carboxylat der Aminosäure als *tert*-Butylester zu schützen. Die Synthese wurde anhand des D-Glutaminsäurebausteins erarbeitet und später auf die Aminosäuren AAS und APS übertragen.

Der Schlüsselschritt zum selektiven Schutz nur einer Carbonsäuregruppe des Glutamats ist die Benzylierung in Anwesenheit von Tetrafluorborsäure-Etherat und wasserfreiem Natriumsulfat in Benzylalkohol.<sup>[375]</sup> Durch die starke Säure, die das Amin des Glutamats protoniert, wird das  $\alpha$ -Carboxylat gegenüber einer säurekatalytischen Veresterung abgeschirmt. Der Benzylalkohol kann nur am aktivierten Carboxylat der Seitenkette angreifen (Abbildung 2.42). Von Asp zu Glu steigt die Ausbeute der Veresterung sprunghaft an, da der abschirmende Einfluss des Ammoniumions am C $^{\alpha}$  auch die Veresterung des Carboxylats der kurzen Asp-Seitenkette beeinflussen kann.



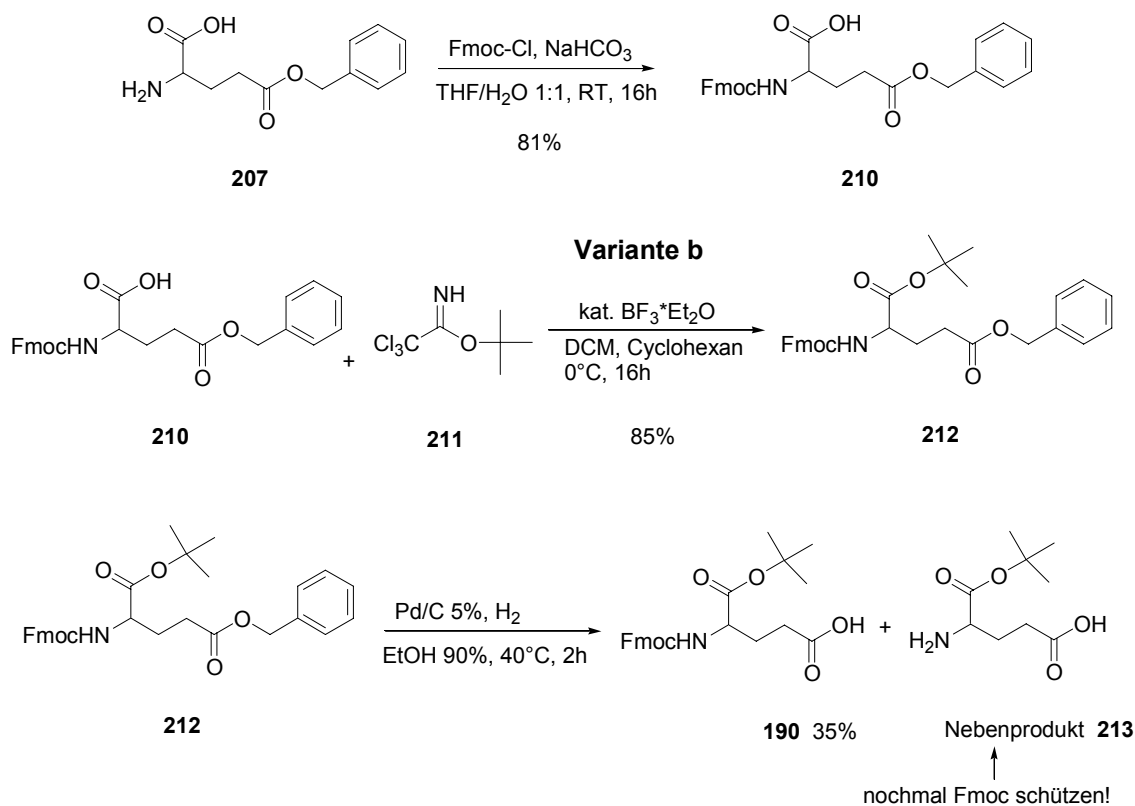
**Abbildung 2.42:** Regioselektive Synthese von Aminosäurebenzylestern **206-209** über saure Abschirmung des  $\alpha$ -Carboxylats mittels  $\text{HBF}_4$ .

Nach Einführung der Carbonsäuredifferenzierung bleibt die Fragestellung nach der Anbringung der Fmoc- und *tert*-Butyl-Schutzgruppe, sowie der Abspaltung der Benzylschutzgruppe. In der Literatur finden sich mehrere unterschiedliche Synthesewege, die sich zum Teil in der Reihenfolge der verbliebenen Reaktionschritte unterscheiden, aber auch in der Wahl der Reagenzien. So kann

die *tert*-Butyl-Gruppe am  $\alpha$ -Carboxylat über drei unterschiedliche **Varianten** eingeführt werden:

- Sauerkatalysierte Addition von Isobutylen im Druckreaktor,<sup>[376, 377]</sup>
- BF<sub>3</sub>-katalysierte Umsetzung mit *tert*-Butyl-2,2,2-trichloracetimidat<sup>[378]</sup>
- oder sauerkatalysierte Umesterung mit Essigsäure-*tert*-Butylester.<sup>[379]</sup>

Die **Variante a** hat den Nachteil, dass die Umsetzung nur mit schlechten Ausbeuten verläuft. Wegen des niedrigen Siedepunkts ist außerdem die Handhabung des Isobutylen sehr aufwendig. Soll die Acetimidat-Methode (**Variante b**) angewandt werden, muss vorher der Stickstoff der Aminosäure geschützt werden, da sonst auch das Amin alkyliert wird. Aus den obigen Überlegungen heraus wurden folgende zwei Synthesewege über **Variante b** und **c** besprochen.

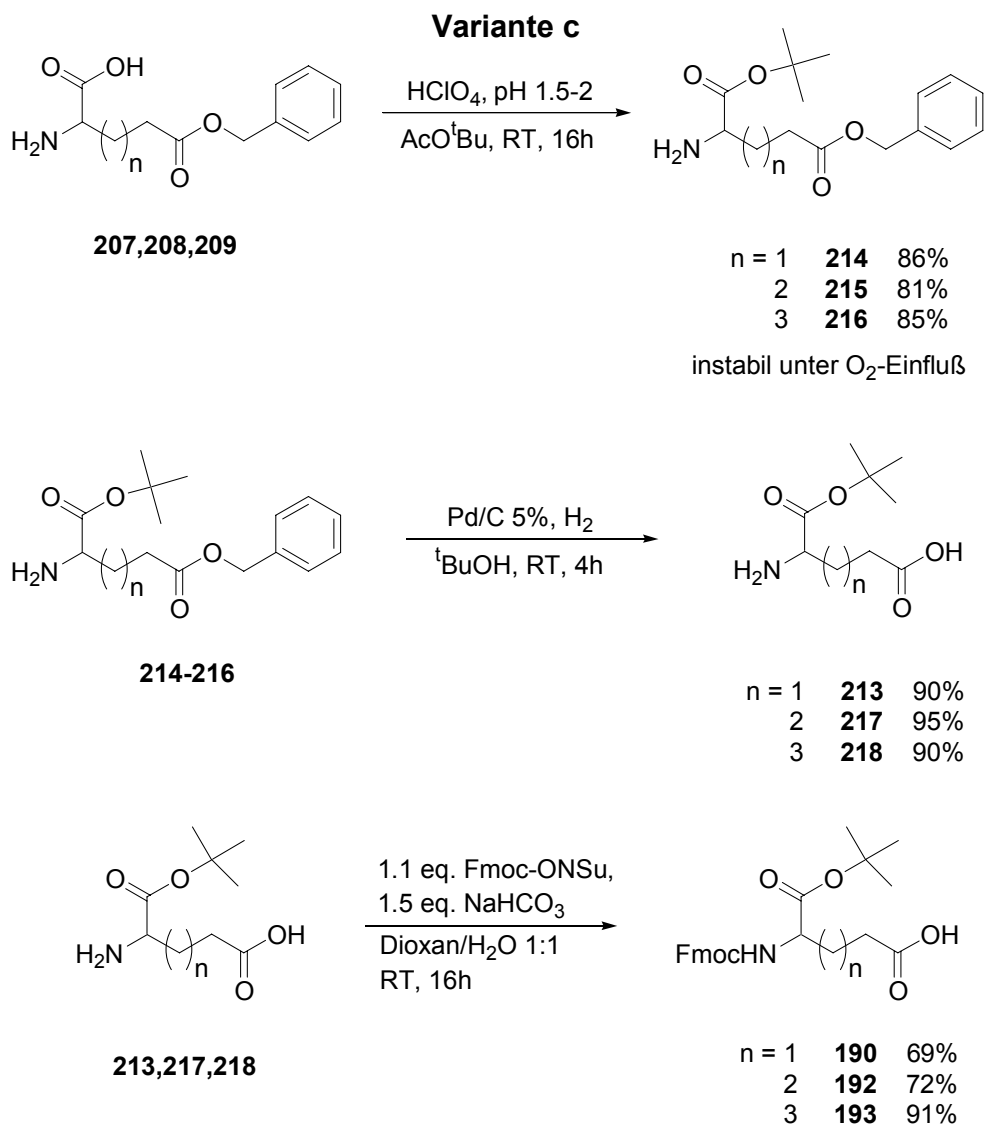


**Abbildung 2.43:** Synthese von *Fmoc-D-Glu-O<sup>t</sup>Bu* **190** über Einführung der *tert*-Butyl-Gruppe mittels *tert*-Butyl-2,2,2-Trichloracetimidat **211** (**Variante b**).

Wie in Abbildung **2.43** gezeigt, verlaufen die beiden ersten Reaktion der N-Fmoc- und *tert*-Butyl-Schutzgruppen-Einführung (über **Variante b**) mit guten Ausbeuten. Jedoch bereitet die hydrogenolytische Abspaltung des Benzylesters große Probleme, da gleichzeitig ebenfalls die Fmoc-Gruppe während der Hydrierung abgespalten wird. Diese Nebenreaktion kann auch durch Variation des Lösungsmittels oder der Reaktionstemperatur nicht unterdrückt werden. Die Ausbeute mit 35% ist dementsprechend schlecht. Die Verwendung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe (Z) anstelle von Fmoc als Aminoschutzgruppe oder die erneute N-Fmoc-Schätzung des Nebenprodukts **213** könnte zwar die Ausbeuten der einzelnen Stufen erhöhen, würde aber einen zusätzlichen Reaktionsschritt notwendig machen, da in beiden Fällen das Amin nach der Hydrierung ungeschützt vorliegt.

Um zu einer effektiveren Synthese zu gelangen, wurde ein anderer Syntheseweg (**Variante c**) eingeschlagen, bei dem der *tert*-Butyl-Ester zu einem früheren Zeitpunkt in die Aminosäure eingeführt wird. Nach erfolgreicher Etablierung dieses Synthesewegs für die Herstellung von Fmoc-D-Glu-O<sup>t</sup>Bu **190** wurde er auf die Aminosäuren AAS **181** und APS **182** übertragen.

Der Vorteil dieser 4-stufigen Synthese (Abbildung **2.44**) ist, dass ausgehend von der Aminosäure bis zum Fmoc/<sup>t</sup>Bu-geschützten Derivat keine aufwendige Flash-Chromatografie zur Reinigung benötigt wird. Alle Produkte fallen nach Extraktion entweder als reines Öl oder als Feststoff an, welches entweder sofort weiter umgesetzt wird bzw. welcher durch Umkristallisation gereinigt werden kann. Die Synthese ist durch die eingesetzten Reagenzien und die guten Ausbeuten extrem kostengünstig.



**Abbildung 2.44:** *Synthese von Fmoc-D-Glu-O<sup>t</sup>Bu 190, Fmoc-AAS-O<sup>t</sup>Bu 192 und Fmoc-APS-O<sup>t</sup>Bu 193 über Einführung der tert-Butyl-Gruppe nach Variante c. Alle Produkte der unter guten Ausbeuten verlaufenden Synthese können ohne Flash-Chromatografie isoliert werden.*

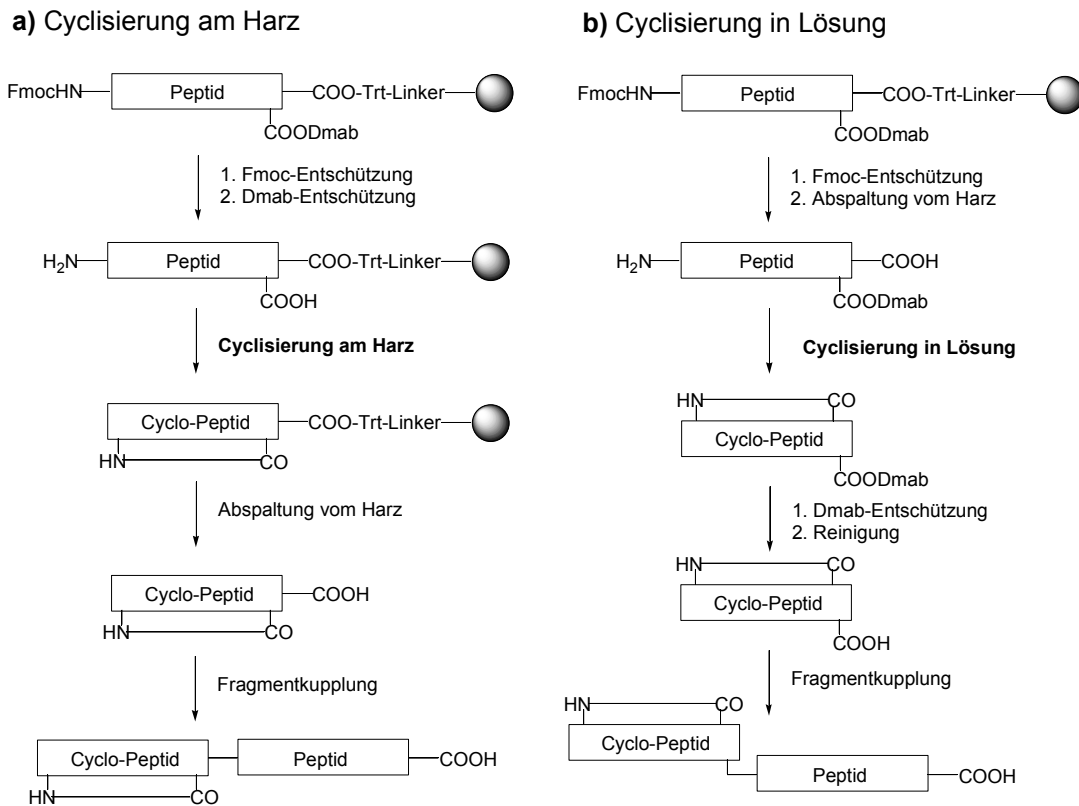


### 2.6.3 Peptidcyclisierung am Harz

Die Cyclopeptide **40-59** aus **Konzept 1** (Kapitel **2.6.1**) wurden standardmäßig über Festphasensynthese linear aufgebaut und nach der Abspaltung vom Harz in seitenkettengeschützter Form in Lösung mittels DPPA-Methode cyclisiert (siehe Kapitel **2.4.1**). Abschließend wurden die Peptide mit TFA entschützt und HPLC-gereinigt. Für die verzweigten Cyclopeptide **60-173** aus **Konzept 2** und **3** bedarf es jedoch einer anderen Synthesestrategie.

Da zur Vermeidung von Imidbildung (siehe Abbildung **2.39**) der Verzweigungsbaustein **200-205** direkt an das TCP-Harz gebunden wird, stellt der Trityllinker eine orthogonale Schutzgruppe für die zweite Carbonsäuregruppe der Dmab-estergeschützten Aminosäure dar. Es bietet sich deshalb aufgrund einer möglichst effizienten Synthese an, die Cyclisierung des Peptids am Harz durchzuführen (Abbildung **2.45a**), nachdem die Fmoc- und Dmab-Schutzgruppe mit 20%iger Piperidinlösung in NMP bzw. 2%iger Hydrazin-Hydrat-Lösung in DMF selektiv abgespalten wurden.

Bei einer Cyclisierung in Lösung (Abbildung **2.45b**) müsste die Dmab-Schutzgruppe erst nach Abspaltung vom Harz und dem Cyclisierungsschritt entfernt werden, um eine Fragmentkupplung des Cyclus mit dem linearen extracyclischen Peptid zu ermöglichen. Die Entfernung von überschüssigen Kupplungsreagenzien und abgespaltenen Schutzgruppen gestaltet sich bei Peptidreaktionen in Lösung erfahrungsgemäß extrem aufwendig, da zusätzliche Reingungsschritte erforderlich sind. Bei Cyclisierung am Harz entfallen diese Komplikationen, da nach Cyclisierung und Abspaltung vom Harz das reine seitenkettengeschützte Peptid vorliegt, das direkt für die Fragmentkupplung verwendet werden kann.



**Abbildung 2.45:** *Synthesestrategien zum Aufbau verzweigter Cyclopeptide.*

In der Literatur finden sich eine Vielzahl von Beispielen für am Harz cyclisierte Peptide unter Verwendung von Allyl- oder Dmb-Schutzgruppen für das Carboxylat der Cyclisierungsstelle. Auffällig dabei ist, dass die Verzweigungseinheit dabei fast immer direkt mit dem Festphasenlinker verbunden ist, um Nebenreaktionen wie die Imidbildung auszuschließen.

Für die Optimierung der Cyclisierungsreaktion wurden unterschiedliche Kupplungsreagenzien auf ihre Effizienz hin untersucht. Die Reagenzien HATU, PyBOP, DIC und DPPA wurden zusammen mit HOAt als Additiv und Collidin als Base in NMP gelöst und für 16 Stunden mit einem harzgebundenen, seitenkettengeschützten Modellpeptid **219** gerührt. Das Modellpeptid besteht aus sechs L-Aminosäuren und soll *backbone*-cyclisiert werden, was zu sterischer Hinderung der Reaktion führen kann.

Die anschließende Analyse der Peptide ergab, dass DIC und PyBOP am geeignetsten für die Cyclisierung am Harz ist, da der beste Umsatz vom linearen zum cyclischen Peptid erzielt wurde. PyBOP hat allerdings den Nachteil, dass während der Kupplungsreaktion ein Stereozentrum - wahrscheinlich das des Asp - stark racemisiert. Cyclisierungen mit HATU haben den Nachteil, dass das Aktivierungsreagenz bei sterisch gehinderten Kupplungen auch direkt mit dem N-Terminus zum Tetramethylguanidin (TMG, Masse: lineares Peptid +98) reagieren kann.<sup>[368, 380]</sup> Eine ähnliche Nebenreaktion wird mit DIC beobachtet, dass ebenfalls an der N-Terminus addiert und dabei ein Dicyclohexylguanidin (DCG, Masse: lineares Peptid +126) bildet.<sup>[381]</sup> In Tabelle 2.8 sind nähere Einzelheiten der Untersuchung aufgeführt:

**Tabelle 2.8:** Reagenzienoptimierung für Cyclisierung am Harz unter Verwendung des Modellpeptids  $H_2N$ -Asn(Trt)-Lys(Boc)-Tyr(<sup>t</sup>Bu)-Phe-Ser(<sup>t</sup>Bu)-Asp(TCP-Harz)-OH **219**.

	<b>Aktivierungsreagenz</b>	<b>+Additiv +10 eq. Collidin</b>	<b>Produkte (Hauptprodukt unterstrichen)</b>
<b>1</b>	1 eq. HATU	2 eq. HOAt	<u>lineares Peptid mit TMG</u> , Cyclus
<b>2</b>	3 eq. PyBOP	3 eq. HOAt	<u>Cyclus</u> , starke Racemisierung (25%)
<b>3</b>	3 eq. DIC	3 eq. HOAt	<u>Cyclus</u> , Racemisierung, wenig DCG
<b>4</b>	3 eq. DPPA	-	<u>lineares Peptid</u> , sehr wenig Cyclus

TMG = Tetramethylguanidin, am N-Terminus des Peptids.

DCG = Dicyclohexylguanidin, am N-Terminus des Peptids.

Um das Ausmaß der Racemisierung im Fall der Cyclisierung mit DIC zu untersuchen, wurde die Synthese des cyclischen Modellpeptids **219** um einen D-*scan* erweitert. Dabei wurde festgestellt, dass bei Erhöhung der Additivmenge auf 6 eq. die Racemisierung etwas zurückgedrängt werden kann. Die höchste Racemisierungsrate wird - wie erwartet - beim all-L-Peptid erzielt.

Es ist zu erwarten, dass bei Cyclisierung von weniger gehinderten Peptidsequenzen (z. B. bei Cyclisierung über Seitenketten) die Racemisierung weiter abnimmt. HPLC-Analysen von entsprechenden Peptiden bestätigen diese Annahme.

**Tabelle 2.9:** Racemisierung der Peptidsequenz **219** mit D-scan während Cyclisierung am Harz.

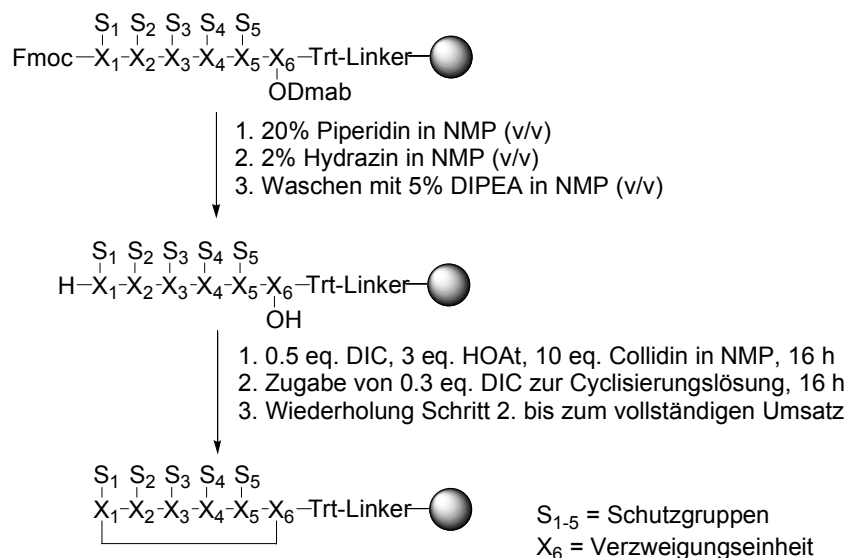
Peptidsequenz <sup>b)</sup>	Racemisierung in %	
	3 eq. HOAt	6 eq. HOAt
N-K-Y-F-S-D	20	16.4
N-K-Y-F- <u>S</u> -D <sup>a)</sup>	4.8	3.5
N-K-Y- <u>F</u> -S-D <sup>a)</sup>	8.4	6.0
N-K- <u>Y</u> -F-S-D <sup>a)</sup>	10.8	7.5
N- <u>K</u> -Y-F-S-D <sup>a)</sup>	8.0	5.7
<u>N</u> -K-Y-F-S-D <sup>a)</sup>	6.0	3.8

weitere Reaktionsbedingungen: 3 eq. DIC, 10 eq. Collidin in NMP, 24h bei RT; a) D-Aminosäuren sind unterstrichen.

b) Seitenkettenschutzgruppen wurden zur Vereinfachung weggelassen.

Die Nebenproduktbildung des Dicyclohexylguanidins konnte zurückgedrängt werden, wenn zuerst nur 0.5 eq. und dann jeweils 0.3 eq. DIC zur Reaktionslösung gegeben wurden, bis das lineare Peptid vollständig umgesetzt war (Abbildung **2.46**). So ist gewährleistet, dass kein überschüssiges DIC in der Lösung vorhanden ist, welches mit dem N-Terminus des linearen Peptids reagieren könnte. Überraschenderweise konnten die Peptide mit AAS als Verzweigungseinheit (Zielpeptide **138-149**) am Harz nicht cyclisiert werden. Laut Massenspektrum konnten die Fmoc- und Dmab-Schutzgruppen vollständig entfernt werden, jedoch haben sich trotz längerer Reaktionsdauer von 3 Tagen und Verwendung von PyBOP und HATU als Kupplungsreagenzien nur Spuren der Cyclen gebildet. Auch bei Einbau von Pseudoprolinen, die in manchen Fällen durch die Einführung einer *cis*-

Amidbindung die Sekundärstruktur von Peptiden modifizieren und damit Cyclisierungen erzwingen,<sup>[382, 383]</sup> ergab sich kein gewünschtes cyclisches Produkt. Es wird vermutet, dass durch sterische Hinderung oder Aggregation des harzgebundenen Peptids das Carboxylat der AAS nicht in die räumliche Nähe des N-Terminus gelangt. Das Kupplungsreagenz kann wahrscheinlich mit dem Carboxylat reagieren, da erst bei Überschüssen von DIC oder HATU ab 1.1 eq. die entsprechenden Nebenprodukte am N-Terminus gebildet werden (TMG und DCG).

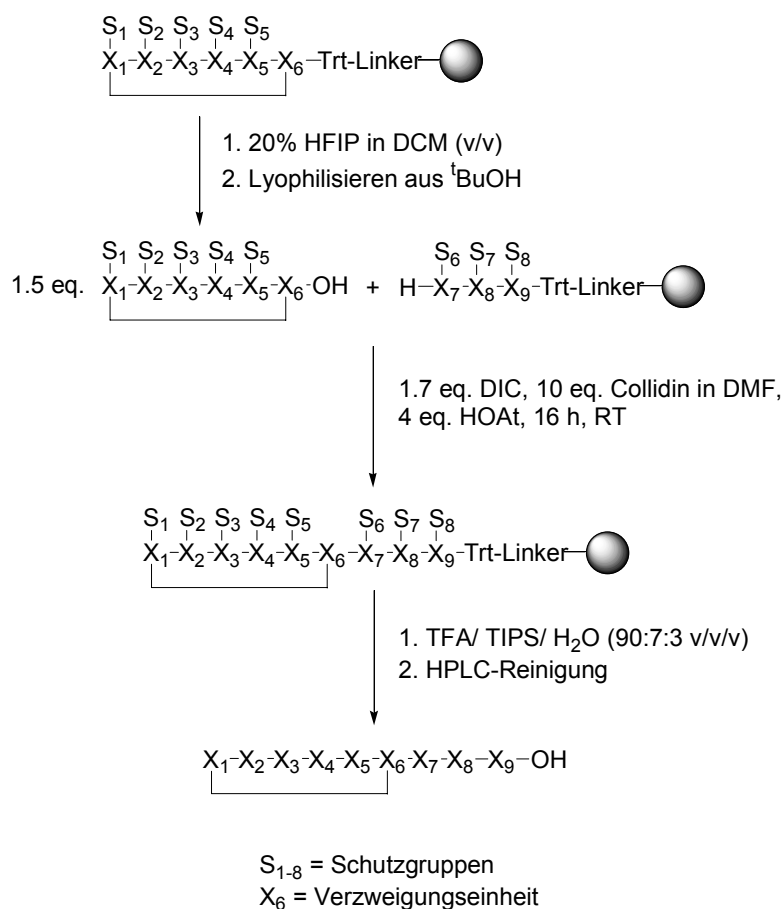


**Abbildung 2.46:** Allgemeine Methode zur Cyclisierung von Hexapeptiden am Harz mit DIC als Kupplungsreagenz.

#### 2.6.4 Fragmentkupplung von Cyclopeptiden an harzgebundene lineare Peptide

Für die Fragmentkupplung der Cyclen an ein lineares Peptid mit Trp am C-Terminus wurden die Cyclopeptide mit HFIP unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen vom TCP-Harz abgespalten und die Lösungsmittel durch Lyophilisieren aus <sup>t</sup>BuOH vollständig entfernt. Die geschützten Cyclopeptide besitzen alle eine Reinheit von mindestens 90% und sind in NMP

und DMF gut löslich. Wie bereits oben erwähnt, wurden die Cyclopeptide mit ihrem vorher an das Harz gebundenen Carboxylat an die N-Termini der entsprechenden immobilisierten linearen Di- oder Tripeptide gekuppelt. Für die Kupplungslösung wurden dafür 1.5 eq. Cyclopeptid und 1.7 eq. DIC unter Zusatz von HOAt und Collidin als Base verwendet (siehe Abbildung 2.47). Als Lösungsmittel für die Kupplung wurde DMF verwendet, da NMP bei langsam verlaufenden Kupplungen mit Aktivestern  $\beta$ -Dicarbonylverbindungen am C-Terminus von Peptiden bildet (Masse: Peptid + 67).<sup>[384]</sup> Nach erfolgreicher Kupplung wurden zum Schluss die Peptide vom Harz abgespalten, die Schutzgruppen mit TFA entfernt und die Endverbindungen mittels HPLC gereinigt.



**Abbildung 2.47:** Allgemeine Methode zur Kupplung von Cyclopeptidfragmenten an lineare Peptide am Harz.

Die Peptide **40-137** und **150-173** (keine Cyclisierung im Fall von den Peptiden **138-149**) wurden im FACS-Test auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. Bei keinem der Peptide konnte Bindung an den uPA-Rezeptor festgestellt werden. Dies könnte mehrere Gründe haben. Zum einen kann die Orientierung der Seitenketten der Reste Tyr, Phe, Ile und Trp trotz templatunterstützter Vorhersage nicht der bioaktiven Konformation von *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> entsprechen. Man konnte bereits anhand des D-Scans von *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> erkennen, dass bereits kleine Änderungen der Konformation große Auswirkung auf die Aktivität des Antagonisten zur Folge haben. Ein anderer Grund könnte sein, dass in vielen der Hexacyclen der N-Terminus entweder nicht vorhanden oder in seiner Lage stark verschoben ist, und dass somit ein für die Ligandenbindung wichtiges Element nicht existiert. Wohl am plausibelsten ist, dass durch den Templatansatz eine völlig andere *backbone*-Struktur geschaffen wurde, die nicht mehr mit der Bindungstasche des uPAR kompatibel ist. Andere Arbeitsgruppen vermuten ebenfalls, dass der *backbone* eines uPAR-Liganden (wie z. B. *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>) stark für die biologische Aktivität verantwortlich zeichnet.<sup>[107]</sup>

### 3 Cyclische, peptidische Rezeptor-Liganden mit konformationell eingeschränkten Aminosäuren

Wie bereits in Kapitel 2.4.2 erläutert, besitzen cyclische Peptide mit kleinen Ringgrößen bevorzugte konformationelle Merkmale, die durch strukturinduzierende Aminosäuren – wie z. B. D-Aminosäuren oder Pro - hervorgerufen werden. Die Cyclisierung hat neben einer definierten Struktur auch den Vorteil, dass die metabolische Stabilität im Vergleich zu linearen Peptiden erhöht wird.<sup>[385-387]</sup> Verstärkt wird dieser Effekt durch den Einbau von unnatürlichen Aminosäuren, da Peptidasen keine Spezifität für z. B.  $\beta$ -Aminosäuren oder *turn*-Mimetika besitzen. Schon vor 30 Jahren hat man die entsprechende Erhöhung der Proteasestabilität entdeckt, als man unnatürliche Aminosäuren N-terminal mit AngiotensinII-Peptiden verknüpft hat.<sup>[388]</sup>

Im Folgenden sollen zwei neue Peptidbausteine vorgestellt werden, die sowohl strukturinduzierende Eigenschaften besitzen, als auch die metabolische Stabilität von Peptiden erhöhen, da sie nicht von Proteasen als Substrat erkannt werden.

#### 3.1 Die cyclische $\beta$ -Aminosäure c $\beta$ AA

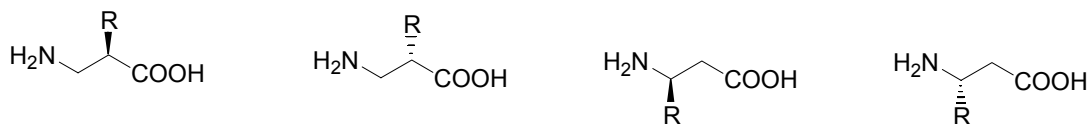
##### 3.1.1 Verwendung von cyclischen $\beta$ -Aminosäuren als Peptidbaustein

Eine Möglichkeit, um peptidische Liganden gegenüber Proteasen zu stabilisieren und gleichzeitig strukturellen Einfluss auszuüben, ist die Verwendung von  $\beta$ -Aminosäuren, die im Gegensatz zu natürlich vorkommenden  $\alpha$ -Aminosäuren eine zusätzliche Methylenheit zwischen der Amino- und Carbonsäurefunktion aufweisen.<sup>[389]</sup>

Denkbar sind die in Abbildung 3.1 dargestellten vier Isomere einer monosubstituierten  $\beta$ -Aminosäure durch Variation von Chiralität und Position



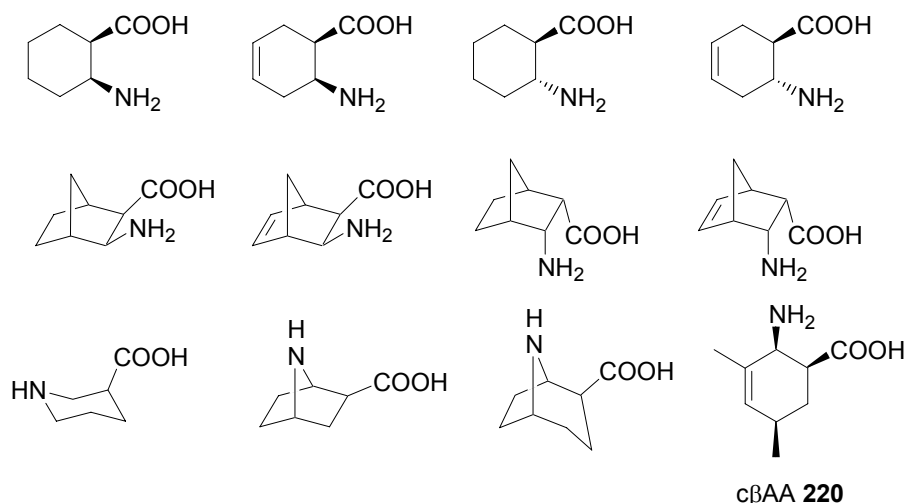
der Seitenkette. Allerdings erhöht sich dadurch auch die Zahl der Freiheitsgrade, was zu größerer Flexibilität führen kann.



**Abbildung 3.1:** Vier mögliche Isomere einer monosubstituierten  $\beta$ -Aminosäure.

$\beta$ -Aminosäuren wurden bereits in eine Vielzahl von bioaktiven Peptiden eingebaut. Zu erwähnen sind Derivate des AngiotensinII,<sup>[388]</sup> des Gastrin<sup>[390]</sup> und des Bradkinin,<sup>[391]</sup> die durch den Einbau von  $\beta$ -Aminosäuren *in vivo* längere Halbwertszeiten aufwiesen. Es wurden auch Versuche durchgeführt, die zeigen, dass  $\beta$ -Peptide gegenüber einer Reihe von Proteasen selbst nach Tagen noch unzersetzt vorliegen.<sup>[392, 393]</sup>

Im Fall eines Bombesin-Antagonisten konnte gezeigt werden, dass durch den Einbau einer  $\beta$ -Aminosäure ein für die Bindung wichtiger  $\beta$ II-*turn* stabilisiert werden konnte.<sup>[394]</sup> Stärkeren Einfluss auf die Konformation von Peptiden besitzen konformationell eingeschränkte  $\beta$ -Aminosäuren (Abbildung 3.2), die für die Synthese von Rezeptorliganden (z. B. für  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrine und Opioid-Rezeptoren) verwendet wurden. Einschränkung der Freiheitsgrade werden durch cyclische und bicyclische Strukturen, Einbau von Doppelbindungen und *cis*- bzw. *trans*-Stellung der Amino- und Carboxysubstituenten erreicht.<sup>[395-397]</sup>



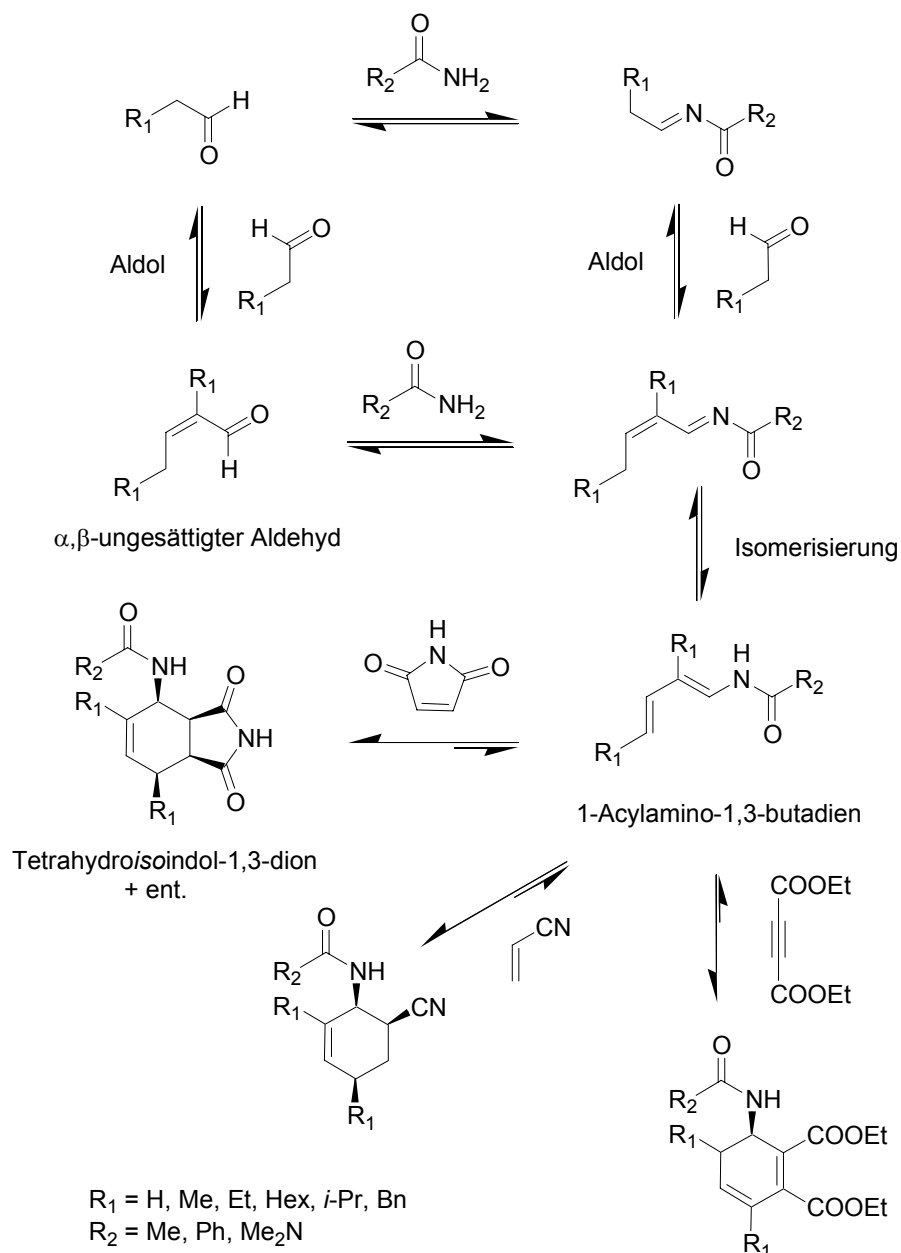
**Abbildung 3.2:** Cyclische und bicyclische  $\beta$ -Aminosäuren.

Die hier vorgestellte cyclische  $\beta$ -Aminosäure c $\beta$ AA 220 entspricht einem solchem konformationell eingeschränkten Peptidbaustein. Ziel dieser Arbeit war es, diesen enantioselektiv herzustellen und durch Einbau in Peptide seine strukturinduzierende Eigenschaften zu verifizieren. Interessant war es herauszufinden, ob ein Cyclohexenring mit Methyl-, Amino- und Carboxylatsubstituenten in der Lage ist, Cyclopeptide unterschiedlicher Ringgröße auf nur eine Konformation festzulegen.

### 3.1.2 Synthese der cyclischen $\beta$ -Aminosäure c $\beta$ AA über eine Multikomponenten-Diels-Alder-Reaktion

*M. Beller et al.* beschreibt die Synthese von Tetrahydroisoindol-1,3-dion aus  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Aldehyden, Amid und Maleinimid über eine Multikomponentenreaktion (MCR).<sup>[398-400]</sup> Die Cyclohexenderivate entstehen dabei durch die Kondensation des Amids mit einem Molekül Aldehyd, einer Aldolkondensation mit einem zweiten Molekül Aldehyd und einer Doppelbindungsisomerisierung zu einem 1-Acylamino-1,3-butadien, dass

zusammen mit Maleinimid abschließend eine Diels-Alder-Reaktion eingeht (Abbildung 3.3).



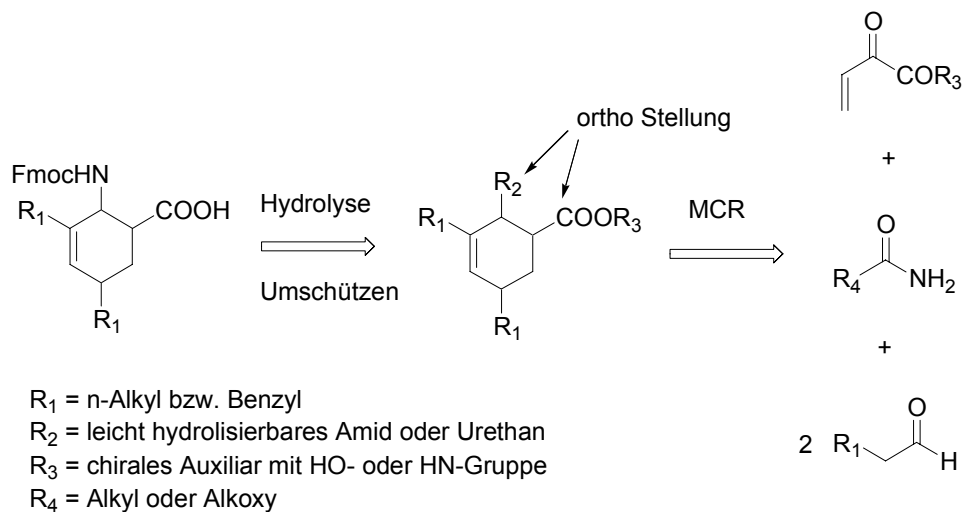
**Abbildung 3.3:** Multikomponentenreaktion zur Synthese von unterschiedlich substituiertem 1-Acylamino-cyclohex-2-en mittels Kondensation und Diels-Alder-Reaktion von Aldehyden, Amiden und Dienophilen.

Die Reaktion verläuft am besten in NMP oder DMF mit p-Toluolsulfonsäure als Katalysator und stöchiometrischen Mengen an Acetanhydrid bei 120°C in einem Druckreaktor. Dabei liegen die unterschiedlichen Zwischenprodukte im Gleichgewicht vor. Erst die (fast) irreversible Diels-Alder-Reaktion am Ende der MCR-Kaskade führt zu einem stabilen Produkt, das sich mit der Dauer der Reaktion (24 h) anreichert. Die Wahl des Aldehyds und des Dienophils (z. B. Acetylendicarbonsäureester oder Acrylnitril) bestimmen dabei die Substitution des Cyclohexenrings. Die aus einer *endo*-Addition entstandenen Produkte sind alle durch ein all-*syn*-Substitutionsmuster gekennzeichnet, wobei die für die Diels-Alder-Reaktion typische Mischung zweier Enantiomere entsteht. Die Ausbeuten mit reaktiven Dienophilen liegen je nach eingesetztem Aldehyd oder Amid im Bereich von 50-90%. Bei sterisch anspruchsvollen Aldehyden liegen die Ausbeuten im unteren Bereich.

Für die Synthese einer cyclischen  $\beta$ -Aminosäure mit Hilfe der oben beschriebenen MCR und für den nachfolgenden Einbau in Peptide über die Fmoc-Festphasenstrategie sind folgende Sachverhalte zu berücksichtigen:

- Als Dienophil wird ein Acrylsäureester eingesetzt, der durch die Regioselektivität der Diels-Alder-Reaktion zu einer *ortho*-Stellung von Amino- und Carboxylat-Funktion des Produkts führt. Der Ester kann anschließend leicht verseift werden, um die freie Carbonsäure zu erhalten. Theoretisch könnte auch Acrylnitril als Dienophil verwendet werden, jedoch besteht während der sauren Verseifung der Nitrilfunktion die Gefahr, dass es zu unerwünschten Nebenreaktionen kommt (z. B. Addition an Doppelbindung des Cyclohexenrings).
- Die Wahl des Amids wird bestimmt durch seine Hydrolysebeständigkeit, da im Anschluss an die MCR eine Umschätzung zum Fmoc-Derivat nötig ist. Das Amid sollte deswegen einerseits während der MCR, die bei höheren Temperaturen stattfindet, stabil sein, zum anderen aber auch leicht zu spalten sein.

- Da bei Diels-Alder grundsätzlich beide Enantiomere entstehen, soll durch Verwendung von chiralen Reagenzien die Enantioselektivität gesteuert werden. In Frage kommen grundsätzlich chirale Katalysatoren oder Auxiliare, wobei erstere wegen der hohen Reaktionstemperaturen nicht eingesetzt werden kann. Es bietet sich an, das Auxiliar über den Acrylsäureester einzuführen, da dieser nach der MCR durch Hydrolyse gespalten wird und so das Auxiliar wieder entfernt werden kann.
- Die Wahl des Aldehyds beschränkt sich auf unverzweigte Alkyl- oder Benzylaldehyde, um die Hinderung der Reaktion durch sterische Ansprüche möglichst gering zu halten.

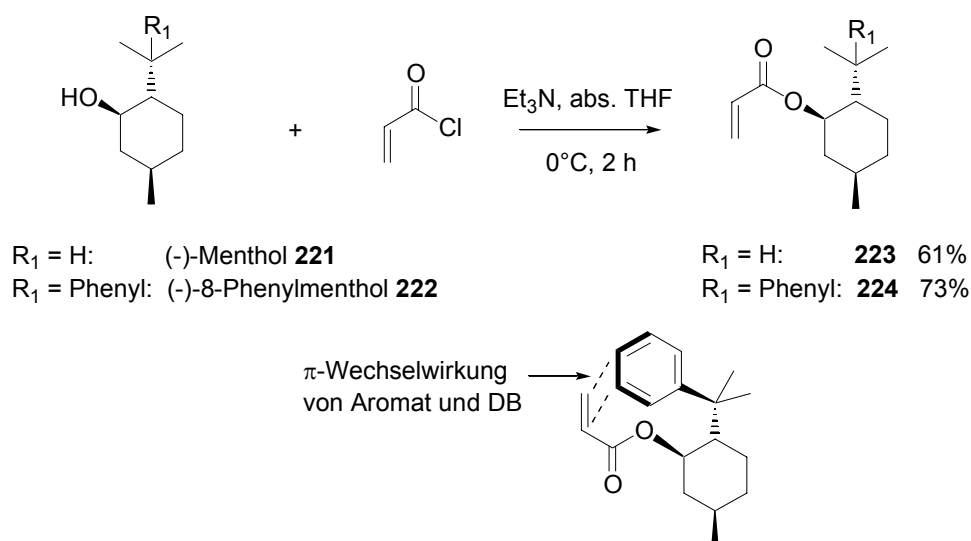


**Abbildung 3.4:** Retrosynthetische Analyse für eine cyclische  $\beta$ -Aminosäure mit Cyclohexen-Grundgerüst.

Als Acrylsäurederivate wurden der Menthol- **223** bzw. Phenylmentholester **224** verwendet. Die beiden sekundären Alkohole haben sich besonders für Cycloadditionsreaktionen als Auxiliar bewährt.<sup>[401]</sup> Das von Corey 1975 für die Prostaglandinsynthese entwickelte (-)-8-Phenylmenthol<sup>[402-404]</sup> besitzt dabei erheblich stärkeren Einfluss auf die Steuerung des Enantiomerenüberschuss als Menthol, da der Phenylring des Auxiliars mit der Doppelbindung des Acrylats in  $\pi$ -Wechselwirkung tritt und somit diese räumlich von einer Seite gegenüber

einem Angriff eines Diens abschirmt.<sup>[405, 406]</sup> Im Fall von Menthol ist dieser Effekt schwächer ausgeprägt.

Die Synthese der beiden Acrylsäureester **223** und **224** aus Acrylsäurechlorid und Menthol **221** bzw. Phenylmenthol **222** wurde in trockenem THF mit Triethylamin als Base bei 0°C durchgeführt (Abbildung 3.5). Bemerkenswert dabei ist, dass sich das Menthylacrylat **223** zur Reinigung im HV bei 75°C destillieren lässt (unter Zugabe von Hydrochinon), das 8-Phenylmenthylacrylat **224** aber nicht, da es bei 85°C bereits aus dem dampfförmigen Zustand heraus polymerisiert. Die Aufreinigung musste deshalb mittels Flash-Chromatografie erfolgen. Die beiden Acrylate sind im Kühlschrank ohne Zusatz von Radikalfängern extrem stabil. Die Wechselwirkung von Phenylring mit der Doppelbindung (DB) des Acrylats im Fall von **224** wird im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum deutlich, da im Vergleich zu **223** die DB-Protonen hochfeldverschoben sind und sich das Kopplungsmuster wesentlich verändert.

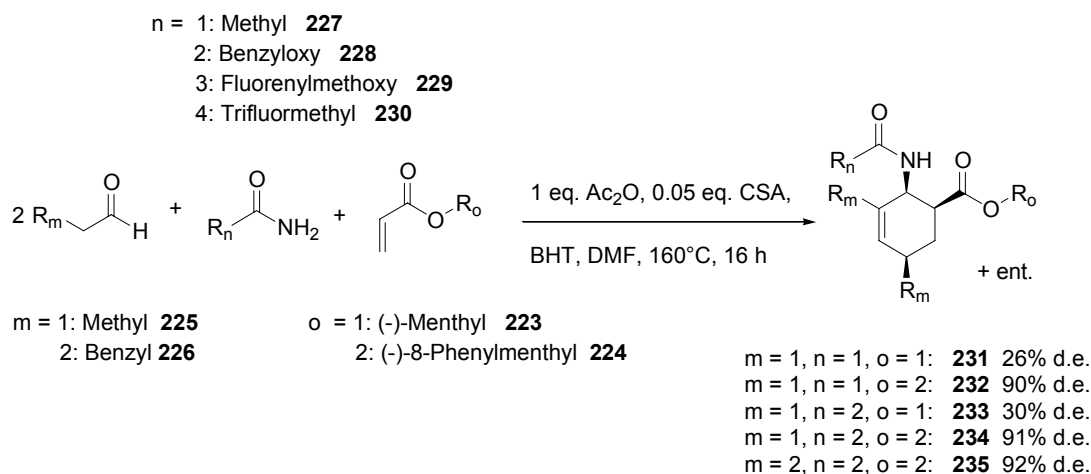


**Abbildung 3.5:** Synthese von Acrylsäurementhylester **223** und Acrylsäure(-)-8-phenylmenthylester **224**.

Für die Synthese von cyclischen β-Aminosäuren mussten einige Modifikationen der in der Literatur beschriebenen Reaktionsbedingungen

durchgeführt werden. Zum einen ist es notwendig, dass für Diels-Alder-Reaktionen mit Acrylaten bei hohen Temperaturen Radikalfänger zugesetzt werden,<sup>[407]</sup> da sonst ausschließlich Polymerisationsprodukte entstehen. Mit Hilfe von 0.05 eq. 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methyl-phenol (BHT) kann die Nebenreaktion bis auf ein sehr geringes Maß zurückgedrängt werden. Weiterhin war eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 140-160°C notwendig, weil bei 120°C die abschließende Diels-Alder-Reaktion nur langsam verlief; bei Temperaturen unter 100°C konnte kein Produkt im Reaktionsgemisch detektiert werden. Dies kann auf die geringere Reaktivität von Acrylaten als Dienophil zurückgeführt werden. Die Reaktionsdauer von 16 h war ausreichend. Die Verwendung eines Druckreaktors ist zwingend, weil der Siedepunkt mancher Reagenzien (z. B. Acetanhydrid) unterhalb der Reaktionstemperatur liegen. Als Säurekatalysator wurden 0.05 eq. wasserfreie Camphersulfonsäure verwendet und als Lösungsmittel DMF.

Die ersten MCR-Reaktionen wurden mit der in der Literatur beschriebenen Reagenzien Propionaldehyd **225** (später auch Phenylpropionaldehyd **226**) und Acetamid **227** durchgeführt, um den Verlauf der Reaktion zu studieren. Es ist aber bekannt, dass Amine mit Acetylschutzgruppen nur unter drastischen Bedingungen (konz. KOH oder HCl) entfernt werden können (Beispiele in <sup>[408-412]</sup>). Es wurden deshalb nach weiteren Amino-Schutzgruppen bzw. Amididen gesucht, die sich leichter abspalten lassen. Die Wahl fiel auf Trifluoracetamid **230**, Fmoc-Amid **229** und *Z*-Amid **228** (Carbaminsäurebenzylester). Trifluoracetamid **230** wird häufig verwendet, um Aminogruppen in Moleküle einzuführen,<sup>[413]</sup> und lässt sich leicht mit verdünnter K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung hydrolysieren,<sup>[414, 415]</sup> das Fmoc-Amid **229** würde ohne Umweg die für die spätere Fmoc-Festphasensynthese gewünschte Schutzgruppe liefern, und die *Z*-Schutzgruppe lässt sich unter milden hydrogenolytischen Bedingungen oder mit starken Säuren abspalten.<sup>[416-418]</sup>



~ 20% Ausbeute

**Abbildung 3.6:** *Synthese von cyclischen  $\beta$ -Aminosäuren über enantioselective Multikomponentenreaktion.*

Nach Beendigung der Reaktion wurden flüchtige Stoffe wie DMF, Essigsäure und Propionaldehyd entfernt und der Rückstand auf seinen Inhalt hin untersucht. Bei Verwendung von Fmoc-Amid **229** und Trifluoracetamid **230** konnte keine Produktbildung festgestellt werden. Wahrscheinlich ist das Fmoc-Amid unter den hohen Temperaturen instabil und das Trifluoracetamid zu wenig nucleophil für die Kondensation mit dem Aldehyd. Mit Acetamid und Z-Amid wurden im Durchschnitt Ausbeuten von 20% nach Flash-Chromatografie erreicht. Als Nebenprodukte entstanden mehrere Substanzen mit Massen +40 und +80, die wahrscheinlich aus der Kondensation eines Produktmoleküls mit ein oder zwei Molekülen Propionaldehyd stammen. Die Nebenproduktbildung konnte etwas unterdrückt werden, wenn die Menge an Propionaldehyd im Verhältnis zum Amid verringert wurde. Die Äquivalente des Acrylats und des Acetanhydrids spielten dabei keine Rolle. Es wird vermutet, dass sich bei Überschuss an Aldehyd höhere Kondensate aus Amid und Aldehyd bilden, die abschließend mit dem Acrylat eine Diels-Alder-Reaktion eingehen. Ein Nachteil der Synthese ist wahrscheinlich die geringe Reaktivität des Acrylat-Dienophils, da mit dem in der Literatur verwendeten Maleinimid höhere Ausbeuten und



weniger Nebenreaktionen beobachtet wurden. Dass die Reaktion auch mit anderen Aldehyden funktioniert, zeigt die Entstehung des MCR-Produkts **235**, das unter Verwendung von Phenylpropionaldehyd **226** entstanden ist.

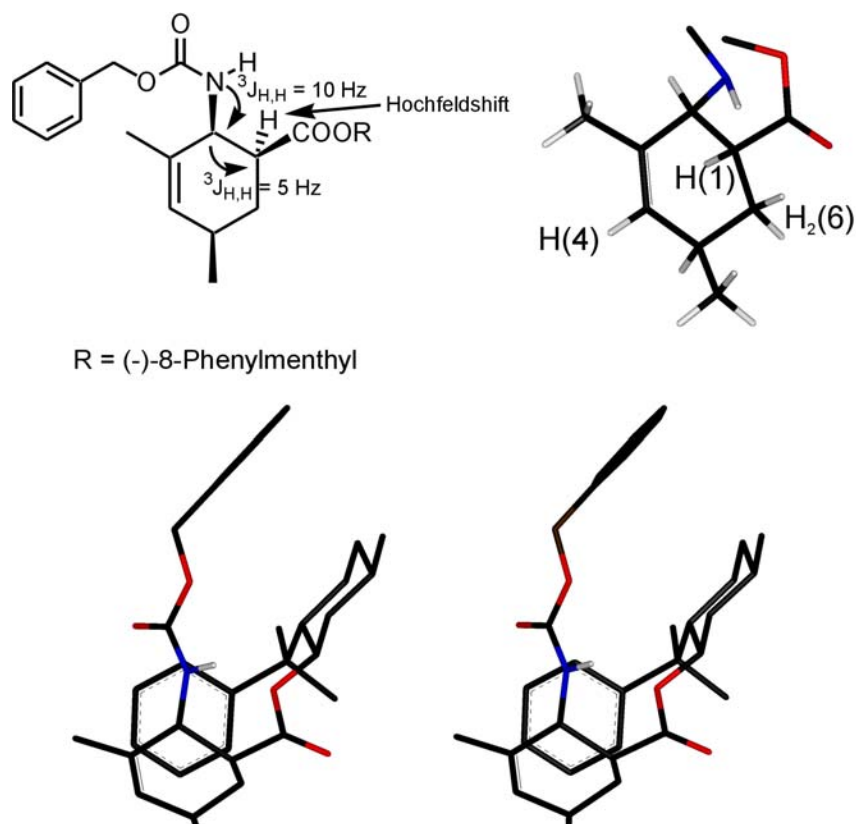
### 3.1.3 Strukturanalyse des $\beta$ AA-Bausteins

Die gereinigten Produkte wurden einer NMR-Analyse unterzogen, um Informationen über Konstitution, Konfiguration und Enantioselektivität zu erhalten. Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Zuordnung über 2D-Experimente und Ermittlung einiger  $^3\text{J}$ -Kopplungskonstanten des Protonenspektrums ermöglichten die eindeutige Identifizierung der Primärstruktur der Verbindungen **231-235**. Die *trans*-Stellung des Amidprotons und des H(2) zueinander wird dabei durch eine  $^3\text{J}$ -Kopplung von 10.5 Hz und die *cis*-Stellung zwischen H(2) und H(1) durch eine von 5.2 Hz wiedergespiegelt. Es handelt sich bei der MCR tatsächlich um eine *endo*-Diels-Alder-Reaktion mit gewünschter Regioselektivität zur *cis*- $\beta$ -Aminosäure.

Der *re*- bzw. *si*-Seitenangriff der Diels-Alder-Reaktion führt zu zwei Diastereomeren (das chirale Auxiliar ist noch über die Esterbindung mit dem Cyclohexenring verknüpft), die sich über Flash-Chromatografie oder HPLC-Trennmethode nicht getrennt isolieren lassen. Die Enantioselektivität lässt sich aber über die Integration der H(2)-Peaks im NMR-Protonenspektrum ermitteln, da dort zwei getrennte Peaksets der Diastereomeren (selbe Kopplungskonstanten von NH und H(2) von 10/5 Hz) erkennbar sind. Mit Menthol als Auxiliar beträgt das Verhältnis 37:63; mit Phenylmenthol dagegen verbessert sich die Selektivität auf 6:94. Im Folgenden wurden deswegen nur die Synthesen mit den Zwischenprodukten **232** und **234** weiter verfolgt.

Um herauszufinden, welches Diastereomer bevorzugt gebildet wird, wurden ROESY-NMR-Spektren von **234** aufgenommen, um Kontakte zwischen benachbarten Protonen zu ermitteln. Neben kurzen Abständen zwischen axial stehenden Protonen des Menthol- bzw. der Cyclohexenrings gibt es schwache

Kontakte zwischen dem Benzyl-CH<sub>2</sub> der Z-Schutzgruppe und der Methylgruppe am C(5) des Phenylmenthols. Weiterhin wechselwirkt der Aromat des Phenylmenthols schwach mit dem H(5), H(6) und H(1) des Cyclohexenrings. Ein sehr wichtiges Indiz für die in Abbildung 3.7 dargestellte Struktur ist auch der Hochfeldverschiebung von über einem ppm des H(1)-Protons von **234** (1.67 ppm) im Gegensatz zum Produkt **233** (2.74 ppm), das keinen Phenylring am Menthol trägt. Die Struktur von **234** wurde mit Hilfe der NOE-Strukturdaten und nach Energieminimierung (Discover-Programm) erhalten. Weitere Konformationen sind aber nicht auszuschließen. Das Diastereomer zu **234** erlaubt dagegen keine zu den Messdaten passende Struktur. Hinzu kommt, dass die in den Kapiteln 3.4.4 und 3.6.4.1 besprochenen Cyclopeptidstrukturen eindeutig die Konfiguration der  $\beta$ -Aminosäure **220** beweisen.



**Abbildung 3.7:** Stereodarstellung der energieminierten Struktur des Diels-Alder-Produkts **234**.

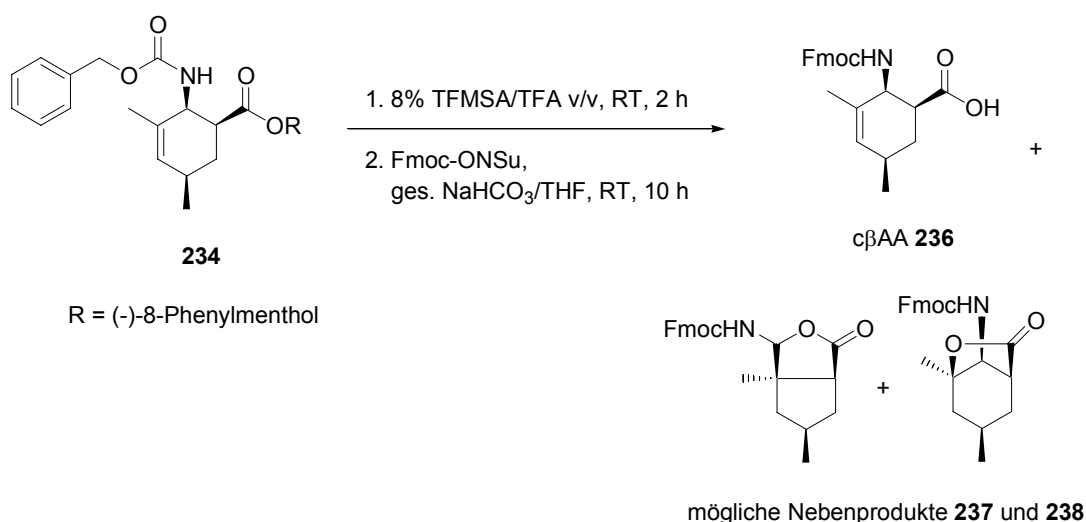
Durch einfache Dynamikrechnungen im CVFF-Kraftfeld (Discover-Programm) wird deutlich, dass nur eine Konformation des Cyclohexenrings der cyclischen  $\beta$ -Aminosäure eingenommen wird, die selbst bei Temperaturen von 500 K stabil bleibt. Theoretisch wären zwei Konformationen denkbar, da der Ring durch die C(6)H<sub>2</sub>-Methylengruppe einen Freiheitsgrad besitzt. Die Methylengruppe liegt entweder über oder unter der Doppelbindungsebene. Die in Abbildung 3.7 dargestellte Vorzugskonformation des Cyclohexenrings kann dadurch erklärt werden, dass die C(5)-CH<sub>3</sub>-Gruppe und das Carboxylat beide eine energetisch günstigere, äquatoriale Stellung einnehmen. Würde der Ring in die andere Konformation umklappen, würden sich die beiden Reste axial gegenüber stehen und sich gegenseitig sterisch stark abstoßen.

### 3.1.4 Synthese von Fmoc-c $\beta$ AA-OH

Um den  $\beta$ -Aminosäurebaustein in Peptidsynthesen einsetzen zu können, muss das Auxiliar durch Hydrolyse des Esters und Abspaltung der Aminoschutzgruppe entfernt werden. In der Literatur finden sich dazu hauptsächlich Hydrolysemethoden entweder mit konz. methanolischer KOH-Lösung<sup>[419]</sup> oder mit konz. wässriger HCl.<sup>[408]</sup> Beide Methoden versagen jedoch im Fall der Zwischenprodukte **231** und **232**. Mit alkalischen Lösungen lässt sich zwar bei Temperaturen um die 100°C der Phenylmentholester spalten, jedoch tritt schon bei Raumtemperatur die basenkatalysierte Racemisierung des C(1)-Stereozyentrums in Nachbarschaft zum Carboxylat des Cyclohexenrings ein. Bei der Behandlung mit wässrigen Säuren kommt es dagegen zur Addition an die Doppelbindung von **234**, was durch das Verschwinden des DB-Protons im NMR-Spektrum gekennzeichnet ist. Erst mit 8% Trifluormethansulfonsäure (TFMSA) in TFA (v/v)<sup>[420]</sup> unter wasserfreien Bedingungen lässt sich beides - Z-Schutzgruppe und Phenylmentholester - innerhalb von 2 h bei Raumtemperatur hydrolysieren. Die stark saure TFMSA kommt zu Einsatz,

weil der sekundäre Phenylmentholester selbst unter TFA-Bedingungen stabil ist.

Die dabei entstehende freie Aminosäure wird nicht isoliert, sondern wie in Abbildung 3.8 dargestellt nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels und sofortigem Quenchen der Reaktion mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung *in situ* mit Fmoc-ONSu zur Fmoc-geschützten  $\beta$ -Aminosäure **236** umgesetzt (Ausbeute 64%). Ein Teil der Substanz geht wahrscheinlich durch kationische Wagner-Meerwein-Umlagerung und intramolekulare, Säure-katalysierte Addition des Carboxylats an die DB verloren. Ein entsprechendes Fmoc-geschütztes Nebenprodukt **237** mit der entsprechenden Masse konnte isoliert und spektroskopisch nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.8:** Synthese der Fmoc-geschützten  $\beta$ -Aminosäure **236** aus Zwischenprodukt **234**.

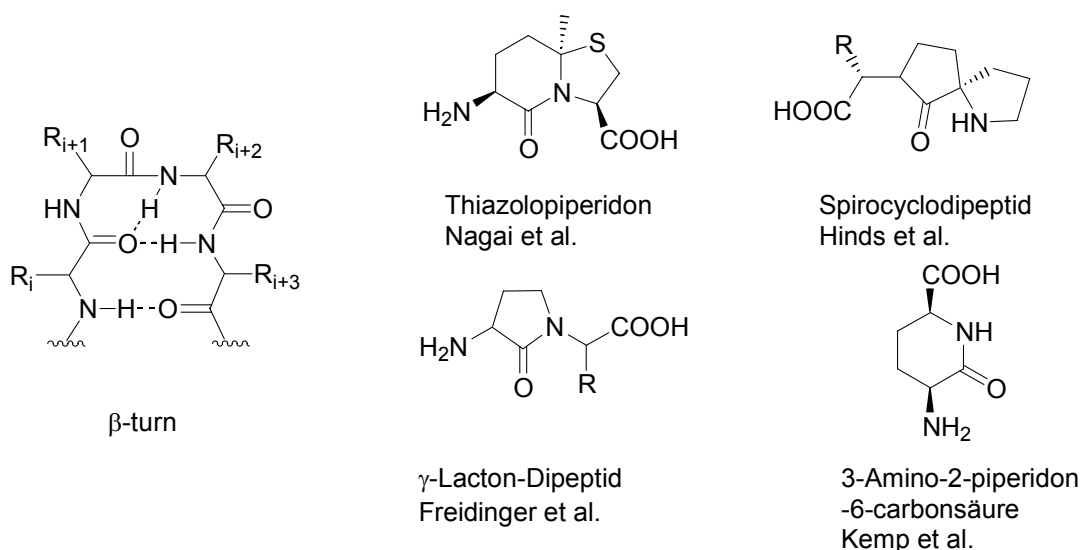
Im großen und ganzen handelt es sich bei der beschriebenen zweistufigen Synthese um eine effektive Methode, um schnell eine Vielzahl von unterschiedlichen, konformationell eingeschränkten  $\beta$ -Aminosäuren enantioselektiv herzustellen, die als *building blocks* oder *turn*-Mimetika für die Synthese von peptidischen und nichtpeptidischen Liganden im Wirkstoffdesign

verwendet werden können. Über die Wahl des Aldehyds (auch  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Aldehyde) und des Dienophils könnten unterschiedliche Substitutionmuster eingeführt werden,<sup>[399]</sup> um evtl. peptidische Seitenketten zu ersetzen. Die Funktionalität der Doppelbindung ermöglicht darüber hinaus Derivatisierungen (z. B. Bishydroxylierung, Epoxydierung, Addition von Metallorganen), die im Bereich der Naturstoffsynthese Anwendung finden könnten. Die Anwendung der  $\beta$ -Aminosäure **220** als Baustein für Somatostatinrezeptor- und Integrin-Liganden wird in den Kapiteln **3.4.4** und **3.6.4.1** beschrieben.

## 3.2 Das $\beta$ -turn-Mimetikum ATUA

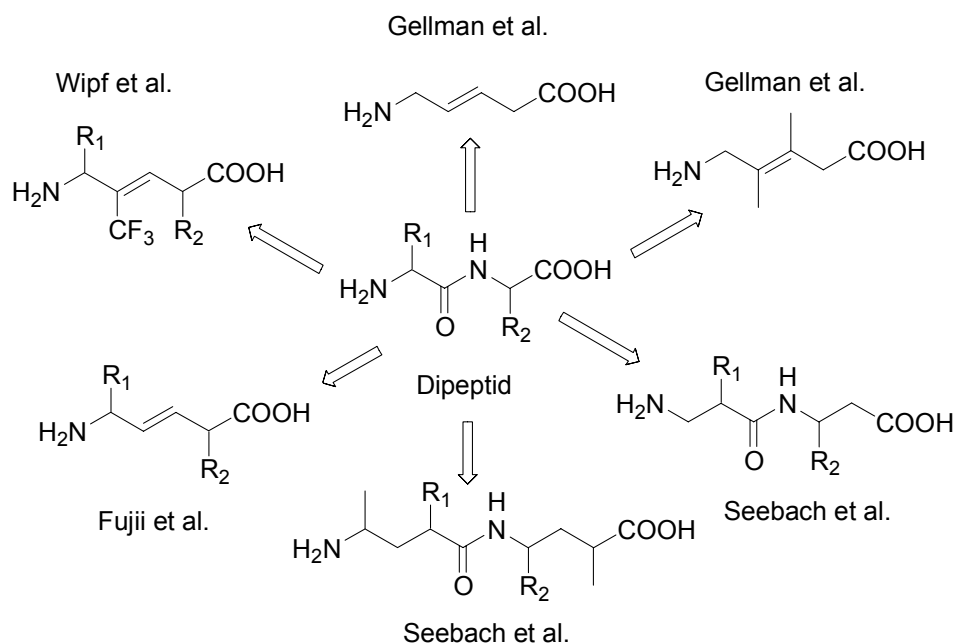
### 3.2.1 $\beta$ -turn-Mimetika als Peptidbausteine

Neben den  $\beta$ -Aminosäuren sind u. a. auch  $\beta$ -turn-Mimetika eine Klasse von proteasestabilen Peptidbausteinen, die dazu benutzt werden, um Sekundärstrukturen zu induzieren oder zu stabilisieren.<sup>[421-425]</sup>  $\beta$ -turns sind eine in Proteinen und bioaktiven Peptiden häufig auftretende Struktureinheit, die den Zweck hat, die Richtung eines Peptidstranges umzukehren oder als Erkennungssegment in exponierten Proteinschleifen zu fungieren.<sup>[426]</sup> Um die Struktur von  $\beta$ -turns (siehe Kapitel **2.4.2**) zu ersetzen, werden häufig mono- oder bicyclische Systeme eingesetzt, die die Aminosäuren in den Positionen  $i+1$  und  $i+2$  eines  $\beta$ -turns ersetzen.<sup>[427-430]</sup> Einige wichtige Vertreter sind in Abbildung **3.9** dargestellt. Durch die zusätzlichen kovalenten Brücken, die z. B. die Wasserstoffbrücke zwischen dem  $i$  und  $i+3$ -Rest eines  $\beta$ -turns ersetzen, kommt es zur Einschränkung des konformationellen Raumes des  $\beta$ -turn-backbones und somit auch in manchen Fällen zur Stabilisierung der bioaktiven Konformation eines Liganden.<sup>[431]</sup> Allerdings bereitet dieser Ansatz Schwierigkeiten in der Beibehaltung der  $i+1$ - und  $i+2$ -Seitenketten und ihrer ursprünglichen Orientierung im  $\beta$ -turn, die zum Teil ebenfalls wichtig für die biologische Aktivität eines Liganden sein können.



**Abbildung 3.9:** Struktur eines  $\beta$ -turns und einiger ausgewählter  $\beta$ -turn-Mimetika.

Ein anderes Prinzip, das in letzter Zeit verstärkt bearbeitet wird, ist das Design und die Anwendung von linearen  $\beta$ -turn-Mimetika, da in diesem Fall die Beibehaltung der  $i+1$ - und  $i+2$ -Seitenketten leichter zu bewerkstelligen ist.<sup>[432-436]</sup> Zur Einschränkung des konformationellen Freiraums werden dabei hauptsächlich die beiden Konzepte der Allylspannung<sup>[437]</sup> und die Erhöhung von Rotationsbarrieren durch Substitution von Alkanen verwendet. Ausgehend von der Primärstruktur eines Dipeptids kann die Amidbindung zwischen den beiden Aminosäuren gegen eine Doppelbindung ausgetauscht und zusätzliche Alkyl- oder Methylengruppen am *backbone* angebracht bzw. insertiert werden. Die in Abbildung 3.10 dargestellten Verbindungen sind einige Literaturbeispiele für lineare  $\beta$ -turn-Mimetika, die zum Teil über das Forschungsgebiet der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aminosäuren entwickelt wurden.

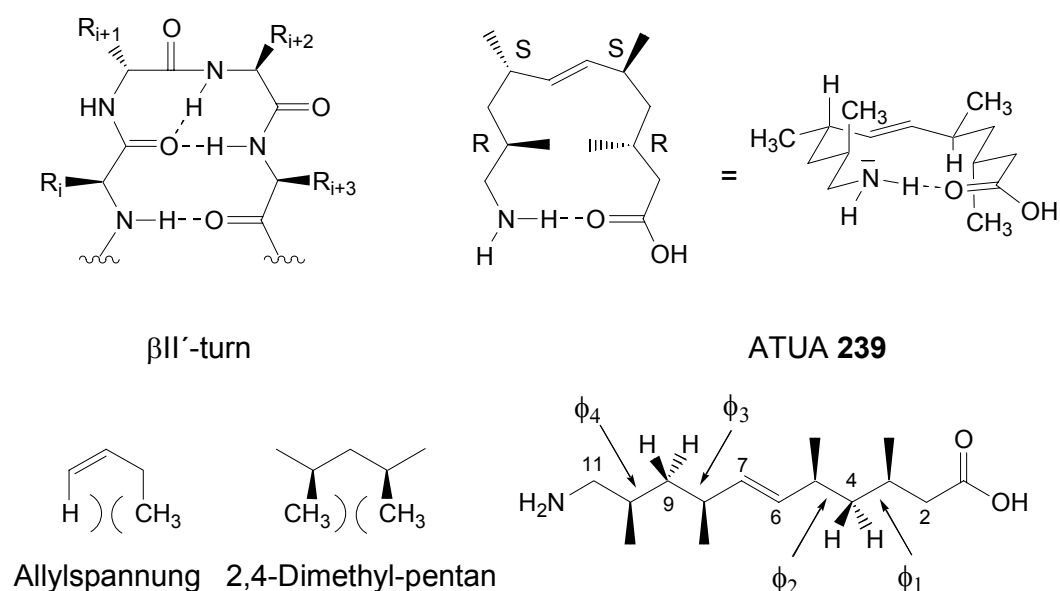


**Abbildung 3.10:** Beispiele für lineare  $\beta$ -turn-Mimetika.

### 3.2.2 Design von ATUA

Das von *Hoffmann et al.* entwickelte  $\beta$ II'-turn-Mimetikum [3*R*,5*S*,6*E*,8*S*,10*R*]-11-Amino-3,5,8,10-tetramethylundec-6-ensäure (ATUA) **239**<sup>[438]</sup> besteht aus einem acyclischen Kohlenwasserstoff und substituiert eine Kette von vier statt nur zwei Aminosäuren. Für das Design von ATUA **239** wurde das bereits oben angedeutete Konzept der Allylspannung verwendet. Außerdem beruht es auf den Vorzugskonformationen von 2,4-Dimethylpentan-Einheiten, die in der Natur im Bereich der polyketiden Naturstoffe auftreten.<sup>[439]</sup> Die (*E*)-Alkeneinheit in der Mitte des Moleküls substituiert die Amidbindung zwischen der *i*+1- und *i*+2-Position in einem  $\beta$ -turn (Abbildung 3.11). Hinweise auf die wahre Struktur von ATUA ergaben sich durch NMR- und IR-Messungen am *bis*-Amid des ATUA-Enantiomer, das laut Modelling-Studien einen  $\beta$ II'-turn ausbilden sollte. Es konnte gezeigt werden, dass in  $\text{CCl}_4$  eine Wasserstoffbrücke zwischen den beiden Termini vorhanden ist (typische IR-

Schwingung bei  $3360\text{ cm}^{-1}$ ), und dass in  $\text{CDCl}_3$  vicinale  $^1\text{H}$ -Kopplungskonstanten von 3 Hz und 10.5 Hz zwischen dem H(5)- und den H(4)-Protonen vorhanden sind, die nur im Fall einer stabilen  $\beta$ -turn-artigen Struktur diese Werte annehmen. Die genaue Vorzugskonformation lässt sich jedoch auf diese Weise nicht genau bestimmen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit das  $\beta$ -turn-Mimetikum ATUA **239** in ein cyclisches RGD-Peptid, das einen  $\beta\text{II}'$ -turn enthält, eingebaut und strukturell über NMR-Methoden untersucht (siehe Kapitel 3.6.4.2).



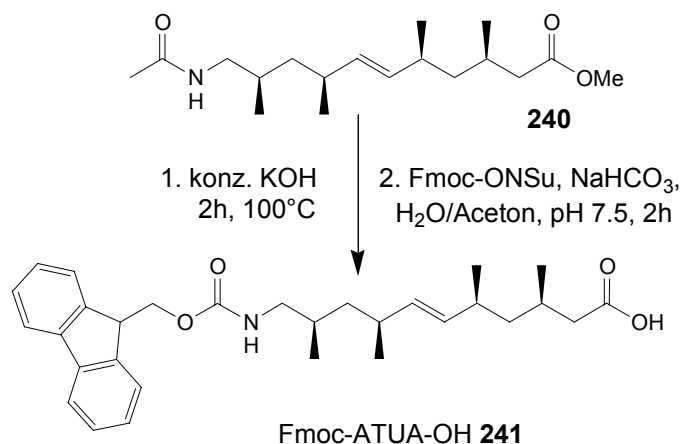
**Abbildung 3.11:** Primär- und vorhergesagte Sekundärstruktur des  $\beta\text{II}'$ -turn-Mimetikums ATUA **239**. Strukturinduzierender Einfluss wird durch die Allylspannung der Doppelbindung und die 2,4-Dimethylpentaneinheiten ausgeübt.

### 3.2.3 Synthese von Fmoc-ATUA-OH

Um das  $\beta$ -turn-Mimetikum ATUA **239** über die Fmoc-Strategie in Peptide einbauen zu können, muss es als N-Fmoc-geschütztes Derivat vorliegen. Die in



der Gruppe von *Prof. Hoffmann* synthetisierte Vorstufe **240**,<sup>[440]</sup> die N-terminal mit einer Acetylgruppe versehen ist und C-terminal als Methyl-Ester vorliegt, wurde mit konz. KOH unter Rückfluß entschützt und *in situ* mit Fmoc-ONSu und NaHCO<sub>3</sub> als Base in einem H<sub>2</sub>O/Aceton-Gemisch zum Fmoc-Derivat **241** umgesetzt. Eine Addition an die Doppelbindung des ATUA konnte dabei nicht festgestellt werden.



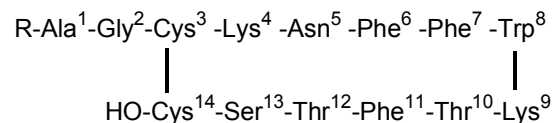
**Abbildung 3.12:** *Synthese von Fmoc-ATUA-OH 241.*

Die Anwendung von Fmoc-ATUA-OH **241** für den Einbau in ein cyclisches RGD-Peptid wird in Kapitel **3.6.4.2** ausführlich behandelt.

### 3.3 Das Peptidhormon Somatostatin

#### 3.3.1 Vorkommen und Funktion von Somatostatin

Somatostatin (SST) oder "somatropin release-inhibiting factor" (SRIF) ist ein cyclisches Peptidhormon, das 1973 zum ersten Mal aus Rinderhypothalamus-Gewebe isoliert wurde und in zwei natürlich vorkommenden, biologisch aktiven Formen existiert.<sup>[441, 442]</sup> Sowohl das aus 14 Aminosäuren bestehende Somatostatin-14 (SST-14 oder SRIF-14) als auch das 28-mer Somatostatin-28 (SST-28 oder SRIF-28)<sup>[443]</sup> werden biosynthetisch aus dem Polypeptid-Vorläufer Prosomatostatin dargestellt.<sup>[444]</sup>



**242** SST-14: R = H

**243** SST-28: R = H-Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Lys-

**Abbildung 3.13:** *Bioaktive Formen des natürlich vorkommenden Somatostatins.*

Der Hauptursprung von Somatostatin liegt im peripheren Gewebe des endokrinen Pankreas und des Darms, sowie im zentralen und peripheren Nervensystem. Es befinden sich jedoch auch Somatostatin-produzierende Zellen in der Plazenta, den Nieren, der Nebenniere, der Prostata und der Schilddrüse.<sup>[445-448]</sup> Bei der Entdeckung des Hormons wurde festgestellt, dass es die Ausschüttung von Wachstumshormon (*growth hormon*, GH) in der Hypophyse inhibiert. Später hat man noch eine Reihe von anderen physiologischen Funktionen gefunden, die sich auf die drei Prozesse der Neurotransmission, Zellproliferation und endo- und exokriner

Hormonausschüttung konzentrieren.<sup>[449]</sup> So wird z. B. die Regulierung des gastrointestinalen Stoffwechsels durch parakrine Inhibierung der Glucagon, Insulin-, Gastrin- und Sekretinausschüttung beeinflusst.<sup>[450-452]</sup> Als weitere Funktionen wurden eine Reihe autokriner Wirkungen im Bereich des zentralen Nervensystems beobachtet, durch die Somatostatin als Neurotransmitter lokomotorische Aktivität moduliert und kognitive Funktionen beeinflusst.<sup>[453]</sup> Auf zellulärer Ebene inhibiert es dabei die Aktivität der Adenylatcyclase sowie den Strom von Calciumionen, während der Transport von Kaliumionen potenziert wird.<sup>[454]</sup> Somatostatin ist deswegen von pharmakologischem Interesse, weil Krankheiten wie z. B. Diabetes, rheumatoide Arthritis, Alzheimer und gastrointestinale Fehlfunktionen beeinflusst werden können. Besonders in Hinblick auf seine Rolle für die GH-Sekretion und Zellproliferation erscheint es sinnvoll, Somatostatin als Antikrebswirkstoff einzusetzen, wobei es durch seine kurze Halbwertszeit *in vivo* von ein bis zwei Minuten und seiner Unspezifität stark eingeschränkt ist.

### 3.3.2 Die Somatostatin-Rezeptoren und ihre Funktion

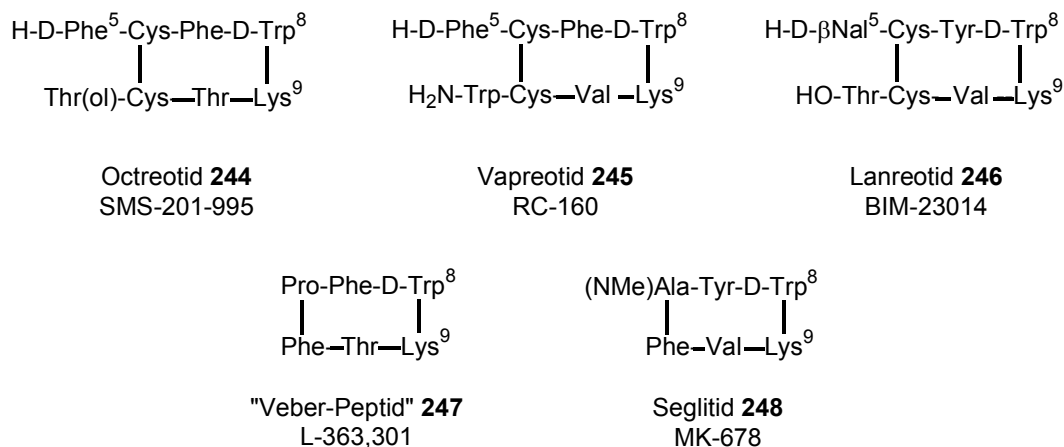
Die unterschiedlichen Funktionen von Somatostatin lassen sich mit einer Familie von fünf Plasmamembran-Rezeptoren (SSTR1-5) in Verbindung bringen, die von einer Vielzahl von normalen und malignen Zellen exprimiert werden.<sup>[455]</sup> Die Rezeptoren gehören zur Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) mit sieben transmembranen  $\alpha$ -Helices und wurden 1992 durch Klonierung indentifiziert und charakterisiert.<sup>[456-461]</sup> Sie zeigen eine hohe Sequenzhomologie (39-57%); unterscheiden sich aber hauptsächlich in ihren C- bzw. N-terminalen Segmenten, die für die Liganden-Spezifität und die intrazelluläre Signaltransduktion maßgeblich sind. Man findet die SST-Rezeptoren überwiegend im Gewebe der Hypophyse und des Gehirns (25%), des Pankreas (5%) und des gastrointestinalen Trakt (65%).<sup>[455, 462]</sup> Die restlichen Prozent verteilen sich auf Niere, Nebenniere, Leber und Herz.

Darüber hinaus werden die Rezeptoren auf einer Vielzahl von Krebszellen überexprimiert;<sup>[462-466]</sup> das gilt insbesondere für den Somatostatin-Rezeptor-Subtyp SSTR2. In Zusammenhang mit der Tatsache, dass SSTR2 die Wachstumshormon-Sekretion und damit die Zellproliferation steuert, wird die Bedeutung des Rezeptors als *target* für die Krebstherapie deutlich.<sup>[466]</sup> Vom SSTR5-Rezeptor vermutet man, dass er für die Inhibition der Insulin-Ausschüttung verantwortlich ist, was ihn für die Behandlung von Insulin-abhängiger Diabetis interessant macht.<sup>[450]</sup> Der SSTR3-Rezeptor wird für Inhibierung von Magensäure- und Acetylcholinsekretion verantwortlich gemacht.<sup>[467]</sup> Die Wirkstoffforschung der letzten Jahre auf dem Somatostatin-Gebiet hatte deswegen als primäres Ziel, SSTR2- und SSTR5-selektive Liganden zu finden, die eine lange Halbwertszeit *in vivo* und möglichst hohe Aktivitäten im unteren nanomolaren Bereich besitzen.<sup>[442]</sup>

### 3.3.3 Entwicklung von Somatostatin-Analoga

Die beiden Somatostatin-Peptide SST-14 und SST-28 binden mit hoher Affinität (nM Bereich) an alle fünf SSTR-Subtypen und können deswegen als unselektive Liganden betrachtet werden.<sup>[468, 469]</sup> Ausgehend von der natürlichen Sequenz wurde in der Gruppe von *Salk et al.* die in der Wirkstoffsuche häufig angewandten Methoden der C- und N-terminalen Verkürzung, des Ala- und des D-Scans durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass bei Austausch des L-Trp<sup>8</sup> gegen ein D-Trp<sup>8</sup> die Aktivität um das 6-8-fache ansteigt, und dass die Aminosäuren Phe<sup>6</sup>, Phe<sup>7</sup>, D-Trp<sup>8</sup>, Lys<sup>9</sup> und Phe<sup>11</sup> essentiell für die agonistische Unterdrückung der GH-Freisetzung sind.<sup>[470-474]</sup> Durch Verschiebung der Cysteine auf die Positionen Cys<sup>6</sup> und Cys<sup>11</sup>, Beibehaltung des D-Trp<sup>8</sup> und Einführung eines C-terminalen Threoninols und N-terminalen D-Phe<sup>5</sup> gelang es *Bauer et al.* einen peptidischen Agonisten zu finden, der eine hohe Proteasestabilität besitzt und der im Vergleich zu SST-14 die GH-Sekretion um den Faktor 45-70 stärker inhibiert. Das sog. Octreotid **244** (SMS-201-995) ist

außerdem selektiver gegenüber dem SSTR2, da die Insulin- und Glucacon-Ausschüttung weniger stark gehemmt wird als die des GH.<sup>[475, 476]</sup> Zusammen mit zwei anderen in der Struktur sehr ähnlichen Peptide (Unterschiede nur in Positionen 5, 7, 10 und 12) – Vapreotide **245** (RC-160) und Lanreotide **246** (BIM-23014)<sup>[477-480]</sup> – wird Octreotid **244** inzwischen in der Klinik als antineoplastischer Wirkstoff eingesetzt. Die antiproliferative Wirkung nutzt man aus, um Acromegalie, Adenoma und Pankreas-, Brust- und Prostata-Krebs zu behandeln.<sup>[481]</sup> Dabei bezieht sich die Selektivität aller drei Wirkstoffe auf die Somatostatinrezeptoren SSTR2 und SSTR5.<sup>[468, 469]</sup> Die *in vivo*-Stabilität im Menschen von Octreotid und Lanreotid beträgt etwa 80-100 min,<sup>[482, 483]</sup> und besitzt damit eine bedeutend bessere Pharmakokinetik als SST-14.

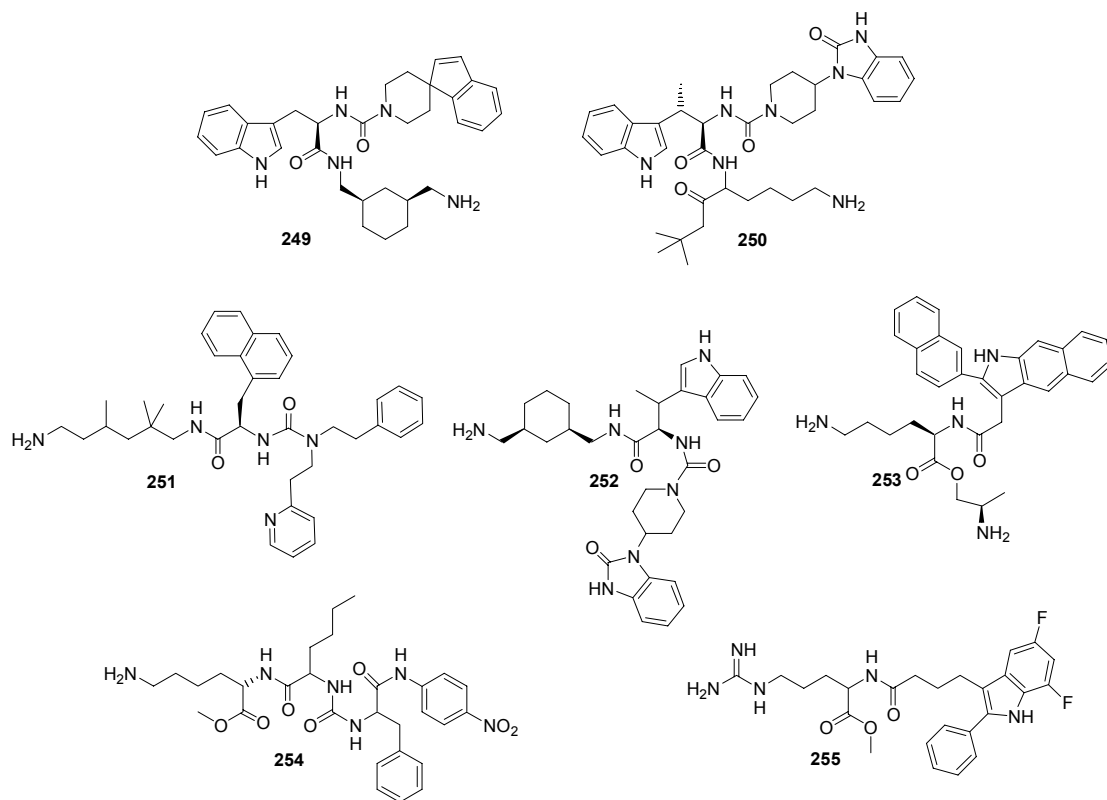


Peptid	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
SST-14	1.1	1.3	1.6	0.53	0.9
SST-28	2.2	4.1	6.1	1.1	0.07
Octreotid	>1000	2.1	4.4	>1000	5.6
Vapreotid	>1000	5.4	31	45	0.7
Lanreotid	>1000	1.8	43	66	0.62
"Veber-Peptid"	>1000	5.1	129	>1000	25

**Abbildung 3.14:** Peptidische Somatostatin-Analoga und ihre receptorspezifische Affinitäten ( $K_i$  in nM).<sup>[468, 484]</sup>

Eine weitere wichtige Entdeckung wurde von *Veber et al.* mit einem hoch aktiven, *backbone*-cyclisierten Hexapeptid **247** (L-363,301, sog. "Veber-Peptid") gemacht, das die Sequenz *cyclo*(-Pro<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>-D-Trp<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Thr<sup>10</sup>-Phe<sup>11</sup>-) besitzt und die Sekretion von GH, Insulin und Glucacon inhibiert.<sup>[485-487]</sup> Weitere Modifikationen führten zur Synthese von MK-678 **248** (auch bekannt unter Seglitide), das anstelle des Pro<sup>6</sup> ein N-methyliertes Alanin trägt, Phe<sup>7</sup> und Thr<sup>10</sup> gegen Tyr und Val ausgetauscht wurden und das eine 10-fach bessere Aktivität als L-363,301 besitzt,<sup>[488]</sup> wobei sich die Selektivität mehr auf den SSTR5 und die Insulin-Ausschüttung verlagert.

Um den pharmakologischen Limitierungen – insbesondere der schlechten oralen Verfügbarkeit und kurzen Halbwertszeit - der peptidischen Agonisten entgegen zu wirken, werden Anstrengungen unternommen, um niedermolekulare, nicht peptidische Somatostatin-Analoga mittels rationalem Design zu finden. Von Untersuchungen mit einem  $\beta$ -D-Glucose-Grundgerüst, auf dem über Etherbrücken D-Trp-, Lys- und Phe-Seitenketten angebracht wurden, weiß man, dass das Peptidrückgrat keine Relevanz für die Aktivität besitzt.<sup>[489, 490]</sup> Auf Grund dieser Tatsache und mit Hilfe von strukturbasierter kombinatorischer Chemie wurden 1998 von der Merck-Gruppe die ersten nichtpeptidischen Agonisten **249** und **250** vorgestellt, die selektiv mit hoher Affinität an den SSTR2-Rezeptor binden.<sup>[491, 492]</sup> Auffällig ist, dass wiederum die drei Funktionalitäten der D-Trp- und Lys-Seitenkette und eines Aromaten vorhanden sind. Es ist ebenfalls gelungen, auch für die anderen Rezeptor-Subtypen selektive Inhibitoren (**251-255**, Abbildung **3.15**) zu finden, mit deren Hilfe man hofft, den Bindungsmodus und die genaue Funktion der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung zu verstehen.<sup>[493]</sup>



	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
SST-14	0.38	0.04	0.66	1.78	2.32
<b>249</b>	1740	1.6	2950	2000	4470
<b>250</b>	2392	0.01	31	81	163
<b>251</b>	1.4	1875	2240	170	3600
<b>252</b>	2760	0.05	729	310	4260
<b>253</b>	1255	>10000	24	8650	1200
<b>254</b>	199	4720	1280	0.7	3880
<b>255</b>	3.3	52	64	82	0.4

**Abbildung 3.15:** Nichtpeptidische Somatostatin-Analoga und ihre receptorspezifischen Affinitäten ( $K_i$  in nM).

### 3.3.4 Struktur-Wirkungsbeziehung von Somatostatin-Analoga

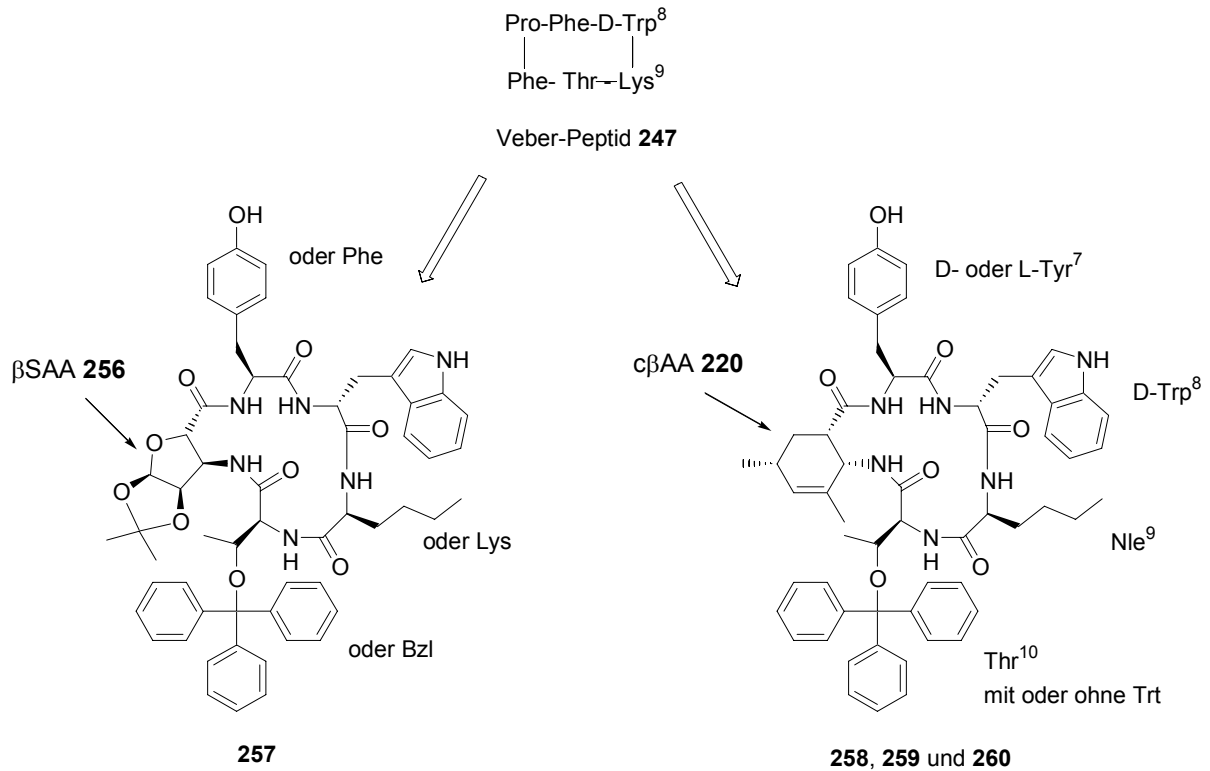
Schon während der Synthese der ersten SST-14-Analoga hat man vermutet, dass ein  $\beta\text{II}'\text{-turn}$  der Sequenz  $\text{Phe}^7\text{-D-Trp}^8\text{-Lys}^9\text{-Thr}^{10}$  ein Bestandteil der aktiven Konformation ist, weil durch Einbau eines D-Trp in Position 8 eine Aktivitätssteigerung zu beobachten war und eine D-Aminosäure in der  $i+1$ -Position eines  $\beta\text{II}'\text{-turns}$  häufig anzutreffen ist (siehe Kapitel 2.4.2). Seither wurde die Verwendung von  $\text{D-Trp}^8$  für viele SST-Agonisten beibehalten. Nach der Entdeckung des Veber-Peptids **247**, dessen Raumstruktur mit Hilfe von NMR und *modelling*-Techniken aufgeklärt wurde,<sup>[494, 495]</sup> konnte belegt werden, dass im Hexapeptid tatsächlich ein  $\beta\text{II}'\text{-turn}$  vorliegt, dem sich gegenüber im Peptid ein  $\beta\text{VI}\text{-turn}$  befindet. Die  $\text{Phe}^{11}\text{-Pro}^6$ -Einheit bildet dabei eine *cis*-Amidbindung aus, die das Peptid in die für die hohe Aktivität wichtige Konformation bringt. Untersuchungen am retro-inversen Veber-Peptid bestätigen die eben erwähnte Vermutung, dass das Peptid-Rückgrat nicht direkt an der Rezeptorbindung teilnimmt.<sup>[496]</sup> Da im SST-Analogen MK-678 **248** das  $\text{Pro}^6$  gegen NMe-Ala und  $\text{Thr}^{10}$  gegen Val ohne Verluste ausgetauscht werden kann, geht man davon aus, dass diese beiden Positionen nicht Teil des Pharmakophors sind.<sup>[486]</sup> Die restlichen Aminosäuren werden laut eines pharmakophoren Modells von *Goodman et al.* für die Aktivität verantwortlich gemacht, wobei das  $\text{D-Trp}^8$  und das  $\text{Lys}^9$  in ihrer Position nicht variiert werden können,<sup>[497]</sup> das  $\text{Phe}^7$  aber durch  $\text{Tyr}^7$  (siehe z. B. Lanreotid **246**) ersetzt werden kann oder das  $\text{Phe}^{11}$  wie im Fall des Octreotids extracyclisch angebracht wird. Das Modell eines Gerüstmoleküls mit einer D-Trp, Lys- und einer aromatischen Seitenkette wurde für das Design von nichtpeptidischen SST-Analoga erfolgreich verwendet.<sup>[491]</sup>



### 3.4 Synthese von Somatostatin-Analoga mit c $\beta$ AA als strukturinduzierendem Baustein

#### 3.4.1 Bisheriger Kenntnisstand und Aufgabenstellung

Aus der Arbeit von *S. Gruner* ist bekannt, dass die Dipeptideinheit Phe<sup>11</sup>-Pro<sup>6</sup> des Veber-Peptids ohne Verlust der Aktivität durch eine cyclische Zuckeramino­säure ersetzt werden kann, wenn dabei das Thr<sup>10</sup> als Benzyl- oder Trt-Ether vorliegt.<sup>[498, 499]</sup> Die aus Glucose gewonnene Zuckeramino­säure **256** besteht aus einem konformationell eingeschränkten Furanosering; stabilisiert durch eine Isopropylidengruppe, die zwei benachbarte Hydroxygruppen als Ketal schützt. Die Carboxy- und Aminofunktion in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Position stehen in *trans*-Stellung zueinander. Sehr gute antiproliferative Effekte mit menschlichen Krebszelllinien (A431 (epidermoid carcinoma) und Panc-1 (Pankreas)) mit einem IC<sub>50</sub> = 10  $\mu$ M konnten erzielt werden bei Austausch des Lys<sup>9</sup> gegen Nle und Phe<sup>7</sup> gegen Tyr (ähnlich wie in MK-678 **248**), ohne dass dabei cytotoxische Effekte beobachtet werden konnten. Besonders der Austausch des Lys<sup>9</sup> gegen Nle bringt eine Aktivitätssteigerung von 25  $\mu$ M auf 10  $\mu$ M mit sich, was bedeutet, dass das Amin in der Lys-Seitenkette für antiproliferative Effekte eher hinderlich ist. Eventuell rückt dadurch bevorzugt ein unbekannter Mechanismus in den Vordergrund, der im geringeren Maß über die SST-Rezeptoren vermittelt wird. Peptide ohne Trt- oder Benzylether als Schutz der Thr<sup>10</sup>-Seitenkette zeigen keinerlei Aktivität, was entweder durch eine Änderung der *backbone*-Struktur oder die Beteiligung des Trityls am Pharmakophor erklärt werden könnte. Die Anfälligkeit gegenüber Peptidasen sollte äußerst gering sein, da  $\beta$ -Aminosäuren und D-Aminosäuren nicht als Substrat erkannt werden. Auch das Trt-geschützte Thr<sup>10</sup> bietet keine Angriffsfläche für proteolytischen Abbau.



**Abbildung 3.16:** Entwicklung von Somatostatin-Analoga mit strukturinduzierender  $\beta$ -Aminosäure.

Mit dem Einbau der in Kapitel 3.1 beschriebenen cyclischen  $\beta$ -Aminosäure **220** in auf das Veber-Peptid basierenden SST-Analoga sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen geklärt werden:

- Welche Bedeutung hat das Furanosegerüst der Zuckeraminosäure **256** oder der methylierte Cyclohexenring der  $\beta$ -Aminosäure **220** für die SST-Aktivität der Cyclopeptide?
- Kann durch die *cis*-Stellung des Carboxylats und des Amins der cyclischen  $\beta$ -Aminosäure **220** eine Steigerung der Aktivität hervorgerufen werden, da evtl. die Konformation des *backbones* im positiven Sinn beeinflusst wird?
- Welche genaue Rolle spielt die Trt-Schutzgruppe des Thr<sup>10</sup> für die Aktivität?

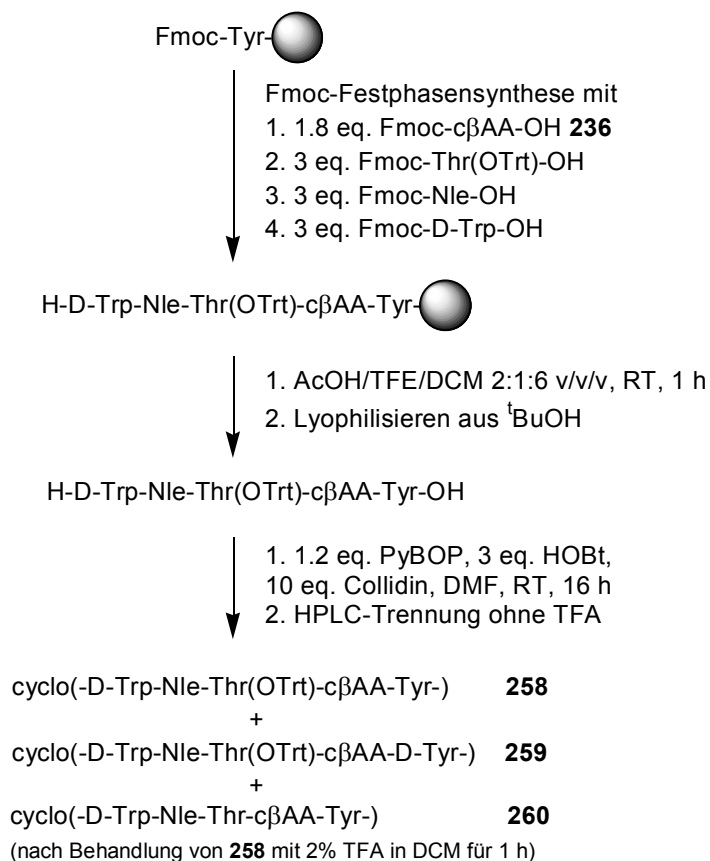
- Welche Bedeutung hat die Chiralität der Aminosäure in Position 7, und welcher Einfluss ergibt sich daraus für die Aktivität?
- Welche Sekundärstruktur besitzen die SST-Analoga mit einer  $\beta$ -Aminosäure anstelle der Phe-Pro-Einheit und zeigen diese Ähnlichkeiten mit bereits bekannten SST-Strukturen?

Als Basis für die Untersuchungen dient das Peptid mit der Sequenz *cyclo*(-Tyr-D-Trp-Nle-Thr(OTrt)- $\beta$ SAA-) **257**, da es das Peptid mit der größten antiproliferativen Aktivität der oben beschriebenen Cyclen darstellt.

### 3.4.2 Synthese der cyclischen SST-Analoga mit $\beta$ AA

Die Peptide wurden mit der in Kapitel **2.4.1** erläuterten Fmoc-Festphasenmethode am TCP-Harz synthetisiert, das mit seitenkettenungeschütztem Fmoc-Tyr-OH als erste Aminosäure belegt wurde. Der in der Synthese nachfolgende, nur in geringen Mengen vorliegende Fmoc- $\beta$ -Aminosäure-Baustein **236** wurde abweichend zum Standardverfahren nur mit einem geringen Überschuss von 1.8 eq. an das Tyr gekuppelt. Die Kupplungsausbeute laut HPLC- und Masseanalyse war trotzdem quantitativ. Nach Kupplung der Aminosäuren Thr(OTrt), Nle und ungeschütztem D-Trp wurde die N-terminal entschutzte Sequenz mit Hilfe eines sehr schwach sauren Essigsäure/ TFE/ DCM-Gemisch abgespalten, da der Tritylether des Thr extrem säurelabil ist und selbst durch Behandlung mit einer 20%igen HFIP-Lösung in DCM langsam gespalten wird. Das annähernd reine, aus <sup>t</sup>BuOH lyophilisierte, lineare Peptid wurde mit 1.2 eq. PyBOP als Kupplungsreagenz und der Base Collidin in DMF cyclisiert. Dabei tritt eine Racemisierung des C-terminalen Tyrosins zu etwa 20% auf. Eine nachfolgende selektive Entschützung der Seitenketten ist nicht notwendig, da das D-Trp und das Tyr als ungeschützte Fmoc-Aminosäuren eingesetzt wurden und das Trt des Thr erhalten bleiben soll. Die Aufreinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer

RP-HPLC, wobei die Lösungsmittel der mobile Phase ohne Zusatz von TFA verwendet werden, da sonst auch in diesem Fall die Trt-Etherbindung säurekatalytisch hydrolysiert wird. Ein Teil des cyclischen SST-Analogons **258** wurde mit TFA behandelt, um auch das Trt-ungeschützte Derivat **260** zu Vergleichszwecken zur Verfügung zu haben.



**Abbildung 3.17:** *Synthese von Somatostatin-Analoga 258, 259 und 260 mit cβAA 220.*

### 3.4.3 Biologische Testergebnisse

Die biologische Testung wurde im Labor von *Prof. Kéri* (Semmelweis Medicinal University, Budapest) von *Dr. Schwab* durchgeführt. Die antiproliferativen Effekte wurden an menschlichen A431-Zellen (epidermoid

carcinoma) untersucht. Die Zellen wurden dazu auf Mikrotiterplatten adhiert und nach 6 h bzw. 48 h mit Methylenblau (MB) oder mit Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium-bromid (MTT) angefärbt und ihre Anzahl in Abhängigkeit der Peptidkonzentration vermessen. MB wird dabei hauptsächlich verwendet, um die Zahl von adhierten Zellen zu messen,<sup>[500]</sup> MTT für die Anfärbung von Mitochondrien in lebenden Zellen.<sup>[501]</sup> Die Messungen wurden mit einer internen negativen und positiven Kontrollen durchgeführt, wobei die Messergebnisse in Relation zur Negativkontrolle in Prozent ausgedrückt werden. Die Positivkontrolle, für die Cycloheximid<sup>[502]</sup> verwendet wurde, dient zur Überprüfung der Stabilität des Testsystems. Es hat sich gezeigt, dass bereits nach 6 h erkennbar wird, ob zelltoxische Verbindungen vorhanden sind, die zur Nekrose (unselektiver Zelltod unter Stressbedingungen) führen. Ist dies ausgeschlossen, können nach 48 h Effekte auf die Wachstumsrate der Zellen direkt in Verbindung mit Proliferation (Zellwachstum) oder Apoptose (kontrollierter Zelltod) gebracht werden. Die Testergebnisse sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Dabei entspricht der IC<sub>50</sub>-Wert der Konzentration an Peptid, bei der nach 48 h die Anzahl der Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle um 50% abgenommen hat.

**Tabelle 3.1:** *Antiproliferative Aktivität der Verbindungen 258, 259 und 260 gegenüber menschlichen A431-Zellen (epidermoid carcinoma) nach 48 h.*

Peptid	IC <sub>50</sub> -Wert in $\mu\text{M}$	Nekrose nach 6 h
<b>257</b>	10	keine
<b>258</b>	5	keine
<b>259</b>	6	keine
<b>260</b>	> 100	keine

Die Messungen haben gezeigt, dass keines der untersuchten Peptide zelltoxische Wirkung besitzt. Dies bedeutet, dass der c $\beta$ AA-Baustein **220** ähnlich wie die Zuckeramino-säure **256** von lebenden Zellen toleriert wird. Der Vergleich der Aktivitäten macht deutlich, dass eine Steigerung der Aktivität

durch Substitution von  $\beta$ SAA **256** durch  $c\beta$ AA **220** um etwa 50% erreicht werden kann. Dies könnte einerseits an einer Konformationsänderung des *backbones* durch die *cis*-Stellung der Amino- und Carboxylat-Substituenten von **220** im Gegensatz zu **256** (hier *trans*-Stellung) liegen. Dadurch wäre es möglich, dass eine für die Aktivität passendere Anordnung der pharmakophoren Gruppen erzielt wird. Ein anderer Grund könnte sein, dass die Sekundärstruktur von  $c\beta$ AA **220** Einfluss auf die Aktivität nimmt. Im direkten Vergleich der beiden Bausteine erkennt man, dass prinzipiell die sterisch anspruchsvolle Isopropylidengruppe zusammen mit den zwei Sauerstoffatomen durch eine Doppelbindung und zwei Methylgruppen ersetzt wird, um die Rigidität des Cyclus zu gewährleisten. Eventuell kann durch diese Modifikation der Ligand besser an den Somatostatin-Rezeptor binden, da unerwünschte sterische Wechselwirkungen verringert werden. Auch könnte die Abnahme der Hydrophobizität auf dem Weg vom sauerstoffhaltigen Zuckergerüst zum Cyclohexenring Grund für die Zunahme der Aktivität sein. In jedem Fall zeigt das Peptid **258** geringe Polarität und ist kaum in H<sub>2</sub>O löslich, da alle fünf Aminosäuren des Cyclus starken hydrophoben Charakter besitzen und nur die Amidbindungen als polare Einheiten fungieren.

Erstaunlicherweise besitzt das Peptid **259** mit einem D-Tyr in der Sequenz eine ähnlich gute Aktivität wie das Peptid **258**. Dies könnte darauf hin deuten, dass die Konfiguration des Tyr eine untergeordnete Rolle für den antiproliferativen Effekt und die Struktur des Peptids hat. Einen extrem wichtigen Rolle dagegen besitzt – wie auch schon in den Studien von *S. Gruner* gezeigt – die Trt-Schutzgruppe der Thr-Seitenkette, da bei dessen Entfernung (Peptid **260**) keinerlei Aktivität mehr gemessen werden kann. Auf Grund der biologischen Tests kann vermutet werden, dass die Trt-Gruppe direkt an der Bindung zum Somatostatin-Rezeptor beteiligt ist.

Weitere Untersuchungen zum Mechanismus der antiproliferativen Wirkung des Peptids **258** zeigen, dass keine klassische Apoptose sondern wahrscheinlich ein lysosomaler Zelltod (Caspase-unabhängig) durch das Peptid ausgelöst wird, der evtl. auch ohne Einbeziehung eines SST-Rezeptors erfolgt (Kinaseinhibitor).

### 3.4.4 NMR-Struktur von *cyclo(-D-Trp-Nle-Thr(OTrt)-cβAA-Tyr-)*

Die Bestimmung der Struktur von *cyclo(-D-Trp-Nle-Thr(OTrt)-cβAA-Tyr-)* **258** in Lösung wurde durch NMR-Messungen (DQF-COSY,<sup>[503, 504]</sup> <sup>13</sup>C-HSQC,<sup>[505]</sup> TOCSY,<sup>[506]</sup> ROESY<sup>[507-509]</sup>) in DMSO (0.8 mg Peptid in 0.5 mL) unter Hilfe von *M. Heller* in unserer Arbeitsgruppe an Bruker DMX500- und DMX600-Geräten durchgeführt. Nach Zuordnung der <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Verschiebungen und Kreuzpeak-Integration der ROE-Signale wurden Abstands-*restraints* der Protonen unter Annahme der isolierten 2-Spin-Approximation berechnet.<sup>[510-512]</sup> Als Eichabstand wurde dafür der ROE-Kreuzpeak der CH<sub>2</sub>(6)-Protonen des cβAA-Bausteins mit 1.78 Å verwendet. Die *distance geometry*-Rechnungen (DG) (DISGEO-Programm<sup>[513-515]</sup>) und anschließenden *molecular dynamics*-Rechnungen (MD) (Discover-Programm mit CVFF-Kraftfeld<sup>[516]</sup>) in DMSO wurden mit Hilfe von *L. Marinelli* durchgeführt. Insgesamt wurden 35 Interprotonenabstände für DG- und MD-Rechnungen benutzt. Zusätzlich wurden über <sup>1</sup>H-NMR-Messungen <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>-Kopplungskonstanten<sup>[517-520]</sup> (*backbone* und Seitenketten) und die Temperaturgradienten der Amidprotonen<sup>[521, 522]</sup> bestimmt, um ergänzende Aussagen über Strukturmerkmale treffen zu können (z. B. Seitenkettenorientierung, Flexibilität, Abschirmung gegenüber Lösungsmittel). Außerdem war es möglich, aufgrund von ROE-Intensitäten und <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>-Kopplungskonstanten die prochiralen Methylenprotonen CH<sub>2</sub>(6) des cβAA-Bausteins und H<sup>β</sup> der Tyr-Seitenkette stereospezifisch zuzuordnen.

Erste Strukturhinweise erhält man durch Vergleich der Messdaten der Amidprotonen mit den Daten von ähnlichen, bereits publizierten Peptiden, die ebenfalls hohe Aktivität gegenüber den Somatostatin-Rezeptoren (insbesondere SSTR2) zeigen. Für den Vergleich herangezogen wurden das Veber-Peptid **247**,<sup>[523]</sup> einem Veber-Peptid-Derivat mit Z-Schutzgruppe in der Seitenkette des Lys<sup>9</sup> **261**<sup>[524]</sup> und ein Veber-Peptid-Derivat, das statt des D-Trp<sup>8</sup> ein (2*R*,3*S*)-β-

Methyl-D-Trp enthält **262**.<sup>[525]</sup> Diese Peptide enthalten alle einen  $\beta$ II'-turn mit D-Trp<sup>8</sup> in der i+1-Position.

**Tabelle 3.2:** Chemische Verschiebung,  $^3J_{H,H}$ -Kopplungskonstante und Temperaturgradient der Amidprotonen der cyclischen Somatostatin- Analoga **258, 247, 261 und 262**.<sup>a)</sup>

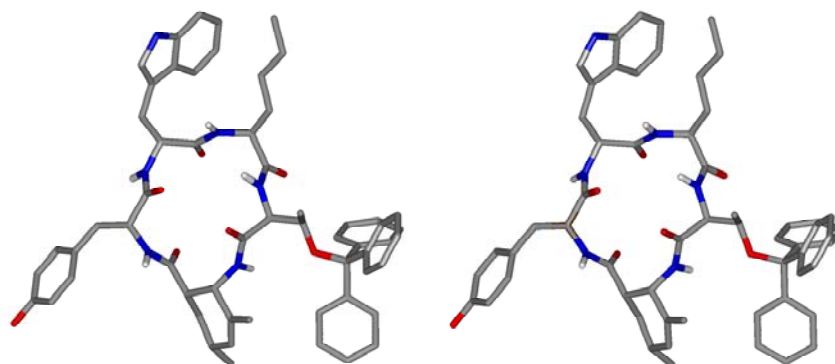
	Peptid	Phe/Tyr <sup>7</sup>	D-Trp <sup>8</sup>	Lys/Nle <sup>9</sup>	Thr <sup>10</sup>	c $\beta$ AA/Phe <sup>11</sup>
<b>chem. Verschiebung [ppm]</b>	<b>258</b>	7.84	8.16	<b>8.61</b>	<b>6.86</b>	7.53
	<b>247</b>	7.20	8.40	<b>8.67</b>	<b>6.96</b>	8.30
	<b>261</b>	7.21	8.41	<b>8.65</b>	<b>6.95</b>	8.30
	<b>262</b>	7.42	8.41	<b>8.65</b>	<b>6.95</b>	8.30
$^3J_{HN,H\alpha}$ [Hz]	<b>258</b>	8.7	<b>7.7</b>	<b>7.3</b>	5.2	9.9
	<b>247</b>	– <sup>b)</sup>	<b>7.8</b>	<b>7.0</b>	7.4	4.9
	<b>261</b>	6.4	<b>8.3</b>	<b>7.2</b>	7.5	6.0
	<b>262</b>	6.0	<b>8.2</b>	<b>7.1</b>	7.5	4.5
<b><math>-\Delta\delta/\Delta T</math> [ppb/K]</b>	<b>258</b>	4.4	9.2	<b>4.9</b>	<b>-1.0</b>	13.1
	<b>247</b>	1.6	5.1	<b>5.4</b>	<b>0.3</b>	2.8
	<b>261</b>	1.0	4.8	<b>5.0</b>	<b>0.2</b>	2.8
	<b>262</b>	5.4	6.0	<b>5.4</b>	<b>-0.7</b>	4.8

a) Die Messwerte der Peptide **247, 261 und 262** wurden den Referenzen<sup>[523-525]</sup> entnommen. b) Durch Überlappung von Signalen kein Messwert vorhanden.

Wie man aus den Messdaten leicht erkennen kann, bestehen große Übereinstimmungen im Bereich der D-Trp<sup>8</sup>, Lys/Nle<sup>8</sup> und Thr<sup>10</sup>-Amidprotonen. Insbesondere die  $^3J_{HN,H\alpha}$ -Kopplungskonstanten, die über die Karplus-Gleichung mit den dihedralen Winkeln im *backbone* des Peptids in Beziehung stehen, lassen den Rückschluss zu, dass die sekundären Peptidstrukturen um das Lys/Nle<sup>8</sup> kaum voneinander abweichen. Auch die Übereinstimmung der Temperaturgradienten, die bei Werten von  $-\Delta\delta/\Delta T < 2$  ppb/K auf eine Beteiligung des Amidprotons an einer intramolekularen



Wasserstoffbrücke oder auf eine Abschirmung von der Lösungsumgebung hindeuten,<sup>[521, 522]</sup> führen zum selben Ergebnis. Besonders charakteristisch für die  $\beta\text{II}'$ -Konfiguration der Tyr-D-Trp-Nle-Thr-Sequenz ist der extrem niedrige Wert von  $-\Delta\delta/\Delta T < -1.0$  ppb/K des  $c\beta\text{AA}$ -Peptids **258**, der in ähnlicher Größenordnung auch bei den anderen Peptiden gemessen wurde. Für die Amidprotonen die am Rand oder außerhalb des für die Aktivität wichtigen  $\beta\text{II}'$ -turns liegen, werden im Fall der Vergleichspeptide **247**, **260** und **261** noch Übereinstimmungen der Messwerte gefunden, da es sich bei allen um Hexapeptiden mit Pro<sup>6</sup> handelt, jedoch gibt es große Unterschiede im Vergleich zum  $c\beta\text{AA}$ -Peptid **258**.



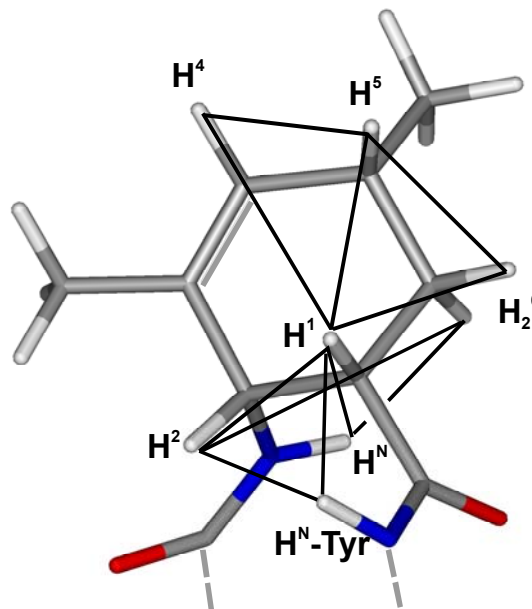
**Abbildung 3.18:** Stereodarstellung der gemittelten Struktur in Lösung von *cyclo(-D-Trp-Nle-Thr(OTrt)-c $\beta$ AA-Tyr-)* **258** aus freien MD-Rechnungen (ohne Abstands-restraints).

Weitere Messdaten stehen ebenfalls im Einklang mit der in Abbildung **3.18** dargestellten, aus DG- und MD-berechneten Raumstruktur von *cyclo(-D-Trp-Nle-Thr(OTrt)-c $\beta$ AA-Tyr-)* **258**. Zum Beispiel kann der extrem niedrige Temperaturgradient von  $-\Delta\delta/\Delta T < -1.0$  ppb/K für das Thr<sup>10</sup>-Amidproton dadurch erklärt werden, dass die  $\gamma$ -Methylgruppe des Thr<sup>10</sup> direkt über der entsprechenden Amidbindung liegt und dadurch das Proton stark von der Lösungsumgebung abschirmt. Zusätzlich Verstärkung des Effekts wird durch eine schwache Wasserstoffbrücke zwischen dem H<sup>N</sup>-Thr<sup>10</sup> mit dem CO

des Tyr<sup>7</sup> erzeugt. Die Amidprotonen des cβAA<sup>11</sup> und des D-Trp<sup>8</sup> treten dagegen vollständig in Kontakt mit den Lösungsmittelmolekülen, da sehr hohe Werte von 13.1 ppb/K bzw. 9.2 ppb/K für den Temperaturgradienten ermittelt wurden.

Weitere Bestätigung der in Abbildung 3.18 gezeigten Struktur erhält man durch aussagekräftige <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>-Kopplungskonstanten des *backbones* und der Seitenketten. Die im <sup>1</sup>H-Spektrum für das H<sup>2</sup>-Proton des cβAA<sup>11</sup> gemessenen Kopplungskonstanten von 9.5 Hz und 3.6 Hz stehen für eine *trans*-Stellung zum H<sup>N</sup> (<sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>-Kopplungskonstante: 9.9 Hz) und eine *cis*-Stellung zum H<sup>1</sup> des cβAA<sup>11</sup>. Die Anordnung des cβAA<sup>11</sup> im Cyclus ist damit eindeutig festgelegt. Für die H<sup>β</sup> des Tyr, die stereospezifisch zugeordnet werden konnten, ergeben sich Konstanten von 9.5 Hz und 4.6 Hz. Dies deutet zusammen mit den entsprechenden ROE-Integralen auf eine stark bevorzugte *gauche*<sup>+</sup>-Konformation der Tyr-Seitenkette hin,<sup>[526]</sup> so wie sie in Abbildung 3.18 gezeigt ist. Für die Seitenkette des D-Trp ist eine Festlegung auf ein Seitenketten-Konformer über die Kopplungskonstante nicht möglich, da die Werte der beiden H<sup>β</sup>-Protonen von 7.3 Hz und 7.5 Hz auch durch Mittelung über die NMR-Zeitskala entstanden sein können. Ebenso weisen Verletzungen der Abstände der D-Trp<sup>8</sup>-Seitenkette während der MD-Rechnung auf Flexibilität des Indolrings hin. Das Rückgrat des D-Trp<sup>8</sup> scheint jedoch nicht davon betroffen zu sein, da sich die entsprechenden Abstands-*restraints* in den vorgegebenen Grenzen bewegen. Kopplungskonstanten für die Thr-Seitenkette (über H<sup>α</sup>-Peak im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum) konnten nicht ermittelt werden, da durch Linienverbreiterung – wahrscheinlich durch Flexibilität der Thr<sup>10</sup>-Einheit – eine schlechte Auflösung der Signale vorgefunden wurde. Diese Flexibilität spiegelt sich auch in der geringfügigen Verletzung von Abstands-*restraints* von Thr-*backbone* und -Seitenkette während der MD-Rechnung wieder. Wahrscheinlich beeinflusst die sterisch anspruchsvolle Trt-Gruppe, die laut freien MD-Rechnungen einige Grad um die Etherbindung rotieren kann, die Konformation ihrer Umgebung.

Die Orientierung der D-Trp<sup>8</sup>- und Nle<sup>9</sup>-Seitenkette zueinander gelang über die Messung einer Hochfeldverschiebung einiger Nle<sup>9</sup>-Protonen. So werden anscheinend die  $\gamma$ - und  $\varepsilon$ -Protonen in der Seitenkette vom Aromatensystem des D-Trp<sup>8</sup> beeinflusst, da eine Verschiebung der Signale von -0.5 ppm bzw. -0.2 ppm im Vergleich zu Durchschnittswerten<sup>[527, 528]</sup> stattfindet. Ein weitere Hinweis ist ein ROE-Signal (entspricht ca. 4.3 Å) zwischen der  $\varepsilon$ -Methylgruppe des Nle<sup>9</sup> und dem aromatischen H<sup>6</sup>-Proton des Indolrings. Die Wechselwirkung beider Seitenketten ist anscheinend so stark, dass während freier MD-Rechnung die Anordnung der Gruppen zueinander kaum verändert wird. Die Abweichung der *backbone*-Struktur zwischen freier und mit *restraints* versehener MD-Rechnung beträgt nur 0.13 Å, was auf eine insgesamt sehr stabile Konformation des Peptids hindeutet.



**Abbildung 3.19:** *cβAA* –Einheit der *cyclo(-D-Trp-Nle-Thr(OTrt)-cβAA-Tyr-)*-Struktur mit ROE-restraints (schwarze Linien), die für die DG- und MD-Rechnungen verwendet wurden.

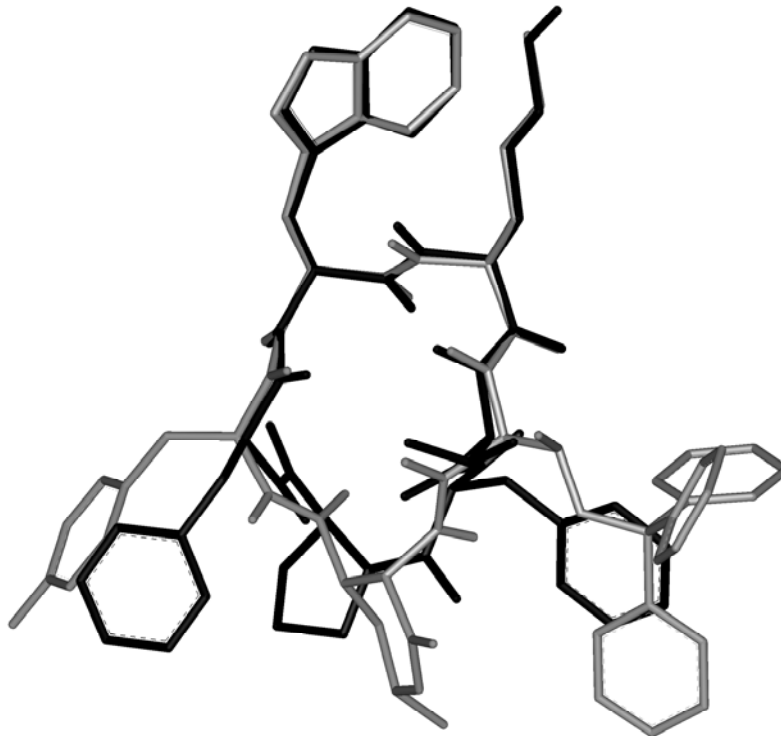
Eine isolierte Strukturbetrachtung der c $\beta$ AA-Einheit des Cyclopeptids **258** ergibt, dass die Konstitution und Konfiguration des substituierten Cyclohexenrings der in Kapitel **3.1.3** vorgestellten Struktur entspricht. Durch den Einbau in ein rigides Cyclopeptid ist es möglich, definierte ROE-Daten der c $\beta$ AA-Protonen zu erhalten, die im Einklang mit der berechneten Peptidstruktur stehen. Die in Abbildung **3.19** eingezeichneten *restraints* können nur erfüllt werden, wenn die Diels-Alder-Reaktion der MCR über die beschriebende Regio-, *endo*- und Enantioselektivität verfügt. Wie bereits vermutet, besitzt der c $\beta$ AA-Baustein durch die Doppelbindung und sein Substitutionsmuster genügend Rigidität, so dass nur eine Konformation des Cyclohexenrings eingenommen wird.

Eine erstaunliche Tatsache ist, dass die  $\beta$ -Aminosäure c $\beta$ AA **220** in der Lage ist, unter Verkürzung der Sequenz um eine Aminosäure in einem cyclischen Hexapeptid die strukturinduzierende Funktion eines  $\beta$ VI-*turn* zu ersetzen. Es wäre interessant herauszufinden, ob c $\beta$ AA **220** generell in der Lage wäre, als  $\beta$ VI-*turn*-Mimetikum zu fungieren. Dies müsste anhand weiterer linearer und cyclischer Testpeptide untersucht werden, die einen  $\beta$ VI-*turn* enthalten. Für eine Weiterentwicklung des *cyclo*(-D-Trp-Nle-Thr(OTrt)-c $\beta$ AA-Tyr-) **258** als antiproliferatives Peptid könnte dazu übergegangen werden, weitere cyclische, rigide  $\beta$ -Aminosäuren (z. B. *cis/trans*-2-Amino-cyclopentansäuren) zu verwenden, um den für die Aktivität idealen Baustein zu finden.

#### 3.4.5 Struktur-Wirkungsbeziehung von *cyclo*(-D-Trp-Nle-Thr(OTrt)-c $\beta$ AA-Tyr-)

Für den Abschluss der Strukturbetrachtungen von *cyclo*(-D-Trp-Nle-Thr(OTrt)-c $\beta$ AA-Tyr-) **258** wurde eine Überlagerung mit der Struktur des Veber-Peptids **247** durchgeführt. Als Grundlage dienten die C $^{\alpha}$ -Atome der Aminosäuren im  $\beta$ -

*turn*. Wie man in Abbildung 3.20 sehr leicht erkennen kann, ist die *backbone*- und Seitenkettenstruktur der D-Trp<sup>8</sup>-Nle/Lys<sup>9</sup>-Einheit mit einem RMSD-Wert von 0.21 Å fast identisch. Abweichungen ergeben sich erst in den Bereichen zu den angrenzenden Aminosäuren Tyr/Phe<sup>7</sup> und Thr<sup>10</sup>. Die  $\beta$ II'-*turn*-artige Struktur, die in den Vergleichszeptiden **247**, **261** und **262** vorkommt, ist somit auch für Peptid **258** ein für die Aktivität wichtiges Schlüsselement. Die Tatsache, dass für Somatostatin-Analoga eine enge Beziehung zwischen Aktivität, Struktur und NMR-Messdaten (Kopplungskonstanten, Temperaturgradienten) besteht, ermöglicht NMR-basiertes *screening* bei Somatostatin-artigen Cyclopeptiden ohne biologische Tests und Strukturaufklärung.



**Abbildung 3.20:** Struktur-Überlagerung von cyclo(-D-Trp-Nle-Thr(OTrt)-c $\beta$ AA-Tyr-) **258** (grau) mit dem Veber-Peptids **247** (schwarz). Als Grundlage diente die Tyr-D-Trp-Nle-Thr-Einheit.

Eine Erklärung, weshalb die Chiralität des Tyr<sup>7</sup> eine untergeordnete Rolle für die Aktivität spielt, lässt sich mit der Lösungsstruktur nicht vollständig aufklären. Vergleicht man die Strukturen von **258** und dem Veber-Peptid **247**, fällt auf, dass die Orientierung der Tyr<sup>7</sup>- bzw. Phe<sup>7</sup>-Seitenkette nicht vollständig übereinstimmt. In einer Publikation von *Goodman et al.* wurde ebenfalls festgestellt, dass die Orientierung der Aminosäure in Position 7 nur sehr wenig Einfluss auf die Bindungsaffinität ausübt.<sup>[523]</sup> Würde man die Chiralität des Tyr<sup>7</sup> in **258** invertieren, hätte dies sicherlich eine Abweichung der Seitenkettenorientierung – und evtl. auch der *backbone*-Konformation – zur Folge. Dass aber dennoch die biologische Aktivität erhalten bleibt (siehe Kapitel 3.4.3), könnte nur damit erklärt werden, dass – im Gegensatz zu anderen Publikationen<sup>[491]</sup> – das Tyr<sup>7</sup> nicht direkt an der Bindung zum Somatostatin-Rezeptor beteiligt ist.

Da nach der Entfernung der Trt-Schutzgruppe von der Thr<sup>10</sup>-Seitenkette keine biologische Aktivität von **260** mehr festgestellt werden kann, kommt man zu der Vermutung, dass ein Phenylring des Trityls direkt an der Bindung zum SST-Rezeptor beteiligt ist. Es gibt mehrere Hinweise in der Literatur, dass nicht das Tyr<sup>7</sup>, sondern ein Aromat in der selben räumlichen Position wie das Phe<sup>11</sup> im Veber-Peptid **247**, als Pharmakophor dient. Zum einen reicht ein weiterer Aromat (entweder Tyr<sup>7</sup> oder Phe<sup>11</sup>) neben dem D-Trp aus, um zu hochaktiven, nichtpeptidischen SSTR2-Agonisten zu gelangen.<sup>[491]</sup> Zum anderen steigt die Aktivität sprunghaft an, wenn an das Peptid *cyclo*(-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-) N-terminal ein D-Phe angehängt wird.<sup>[475, 529]</sup> Weiterhin konnten durch Seitenkettenmethylierungen des Veber-Peptids gezeigt werden, dass besonders am Phe<sup>11</sup> geringfügige Änderungen zum Verlust der Aktivität führen. Daraufhin wurde bereits 1992 ein pharmakophores Modell entwickelt, dass das Tyr<sup>7</sup> nicht berücksichtigt.<sup>[523]</sup> Wie man in Abbildung 3.20 erkennen kann, lässt sich auch im Fall des *cyclo*(-D-Trp-Nle-Thr(OTrt)-cβAA-Tyr-) **247** ein Phenylring des Trityls mit dem Phe<sup>11</sup> des Veber-Peptids zur Deckung bringen. Da die Trt-Gruppe um die Etherbindung rotiert, ist es möglich, dass

ein Trt-Aromat über *induced-fit* in der Rezeptortasche aufgenommen wird. Dass durch die Entfernung der Trt-Gruppe eine völlig anderer *backbone*-Konformation eingenommen wird und es damit zu einer Störung des für die Bindung wichtigen  $\beta$ II'-turns kommt, ist nicht wahrscheinlich, da NMR-Messungen am Trt-freien Peptid **260** keine nennenswerten Veränderungen der chemischen Verschiebung aller Signale erkennen lassen. Chemische Verschiebung und  $^3\text{J}$ -Kopplungskonstanten der D-Trp<sup>8</sup>, Nle<sup>9</sup> und Thr<sup>10</sup>-Amidprotonen von 8.06 ppm (7.5 Hz), 8.62 ppm (7.3 Hz) bzw. 6.96 ppm (kein Wert messbar) passen zur  $\beta$ II'-turn-Konformation der cyclischen Somatostatin-Peptide (siehe Tabelle 3.2).

### 3.5 Das Integrin und seine Liganden

#### 3.5.1 Allgemeine Grundlagen über Integrine und ihre biologische Relevanz

Adhäsive Kontakte von Zellen untereinander sowie zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM) sind für zahlreiche Adhäsions- und Migrationsphänomene verantwortlich (z. B. Embryogenese, Zelldifferenzierung, Hämostase, Wundheilung)<sup>[530-532]</sup> und werden durch Zelloberflächenrezeptoren wie z. B. den Integrinen vermittelt.<sup>[533, 534]</sup> Die Familie der Integrine übernimmt - neben der Verankerung der Zelle - die Aufgabe, Signale in beiden Richtungen zwischen der Zelle und ihrer Umgebung zu übertragen.<sup>[533, 535-540]</sup>

- Durch Bindung eines Integrins an einen Liganden der ECM wird ein Signal in die Zelle übertragen, was zu einer Umorientierung des Cytoskeletts führt. Der als *outside-in signaling* bezeichnete Prozess kann die Veränderung der Zellform, Migration oder verankerungsabhängige Proliferation steuern.

- Der umgekehrte Weg der Signaltransduktion vom Zellinneren nach außen (*inside-out signaling*) ist auch möglich, wobei Faktoren innerhalb der Zelle die Integrine aus einem passiven, schwach adhäsiven in einen aktiven, adhäsiven Zustand umschalten.<sup>[540]</sup> Bei der Aktivierung kann eine scherenartige Öffnung der Integrinrezeptoren beobachtet werden.<sup>[541-543]</sup>

Als erstes Mitglied der Integrinfamilie erlangte der Blutplättchenrezeptor  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  therapeutische Bedeutung, da durch seine Inhibierung Blutplättchenaggregation und Thrombose unterdrückt werden kann.<sup>[544-548]</sup> Das bisher wichtigste, historisch als Vitronektin-Rezeptor bekannte  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin spielt dagegen eine Rolle bei vielen anderen physiologischen und pathologischen Adhäsions-Prozessen, wie z. B. bei der Knochenresorption,<sup>[549, 550]</sup> bei der Phagozytose apoptotischer Zellen,<sup>[551]</sup> bei akutem Nierenversagen,<sup>[552]</sup> bei Arthritis,<sup>[553]</sup> und Restenose.<sup>[554]</sup> In einem Mausmodell konnte weiterhin eine Bedeutung bei der Neovaskularisation in der Netzhaut nachgewiesen werden.<sup>[555]</sup> Auf detaillierte Zusammenhänge wird im Folgenden eingegangen:

Während das  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -Integrin vor allem auf Epithelzellen vorhanden ist und eine Rolle bei der Regulation der Epithelproliferation und Wundheilung spielt,<sup>[556, 557]</sup> findet man die Integrine  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  und  $\alpha\text{v}\beta\text{5}$  auf glatten Muskelzellen, Epithelzellen, und Leukozyten.<sup>[558]</sup> Besonders die Überexprimierung auf unterschiedlichen Krebszellen<sup>[559-564]</sup> führt dazu, dass das Metastasepotential von z. B. Melanomzellen und ihr Migrationsverhalten im negativen Sinn beeinflusst wird.<sup>[565-567]</sup> Vor allem die Anwesenheit von  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrinen auf Endothelzellen im Zusammenhang mit tumorinduzierter Blutgefäßbildung (Neoangiogenese) ist für die Entwicklung von Integrininhibitoren interessant.<sup>[17, 568, 569]</sup> Man weiß, dass zwar durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (z. B. bFGF oder VEGF) das Zellwachstum von Endothelzellen in Richtung neuer Sekundärtumore stimuliert wird,<sup>[570]</sup> dass sich aber keine Blutgefäße bilden können, wenn dabei die überexprimierten  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -



Integrine, die für die zielgerichtete Wanderung und die Anheftung an das umgebende Gewebe zuständig sind,<sup>[565, 571]</sup> blockiert werden.<sup>[572, 573]</sup>

Die Integrine, insbesondere  $\alpha\beta3$  und  $\alpha\beta5$ , spielen auch bei der Apoptose eine entscheidende Rolle,<sup>[574-576]</sup> da Zellen bei Verlust des integrinvermittelten ECM-Kontakts eine für Gewebezellen unnatürliche runde Form annehmen und dadurch den programmierten Zelltod einleiten. Im Gegensatz dazu kann durch Beschichtung von Knochenimplantaten mit  $\alpha\beta3$ - und  $\alpha\beta5$ -Liganden die Adhäsion und Proliferation von Zellen (Osteoblasten) an Oberflächen (z. B. PMMA) vermittelt werden,<sup>[577-582]</sup> da sie sich auf dem ECM-Mimetikum in gewohnter Weisen über die Integrine festhalten und ausbreiten können. Hinzu kommt, dass die für die Osteoporose verantwortliche Knochenresorption über Osteoclasten durch die selben Integrine gesteuert wird und durch  $\alpha\beta3$ -Liganden *in vivo* unterdrückt werden kann.<sup>[583-585]</sup>

### 3.5.2 Struktur von Integrinen

Integrine sind heterodimere transmembrane Glykoproteine, die in unterschiedlicher Kombination aus je einer der 17  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut sind (siehe Tabelle 3.3).<sup>[586]</sup> Durch Assoziation der verschiedenen Untereinheiten ergeben sich 23 bisher bekannte Kombinationen (siehe Tabelle 3.3).<sup>[531, 533, 587, 588]</sup> Die größten Integrinfamilien sind die beiden  $\beta$ -Familien  $\beta1$  (11 Integrine) und  $\beta2$  (4 Integrine), sowie die  $\alpha v$ -Familie mit 5 Integrinen.

**Tabelle 3.3:** Darstellung der bekannten Kombinationen aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit sowie der jeweiligen natürlichen Liganden.<sup>[534, 544, 559, 588]</sup> Grau hinterlegte Felder kennzeichnen Integrine mit RGD-abhängiger Ligand-Bindung.<sup>[589]</sup>

	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 6$	$\beta 7$	$\beta 8$
$\alpha 1$	Col, Ln							
$\alpha 2$	Col, Ln, Fn							
$\alpha 3$	Col, Ln5, Fn							
$\alpha 4$	Fn, In VCAM-1						MAdCAM-1 VCAM-1, Fn	
$\alpha 5$	Fn							
$\alpha 6$	Ln			Ln, Ep				
$\alpha 7$	Ln							
$\alpha 8$	Fn, Vn, Tn							
$\alpha 9$	Col, Ln, Tn							
$\alpha 10$	Col							
$\alpha E$							E-Cadherin	
$\alpha L$		ICAM-1 ICAM-2						
$\alpha M$		iC3b, Fb Faktor X ICAM-1 ICAM-2						
$\alpha X$		iC3b, Fb						
$\alpha D$		ICAM-3 VCAM-1						
$\alpha IIb$			Fb, Fn, Vn vWF, Tsp					
$\alpha v$	Vn, Fn, Opn		Vn, Ln, Fn vWF, Tsp Tn, Opn, Fib, Fbu		Vn, Fn Opn, Fb vWF	Fn Fb Tn		Vn

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

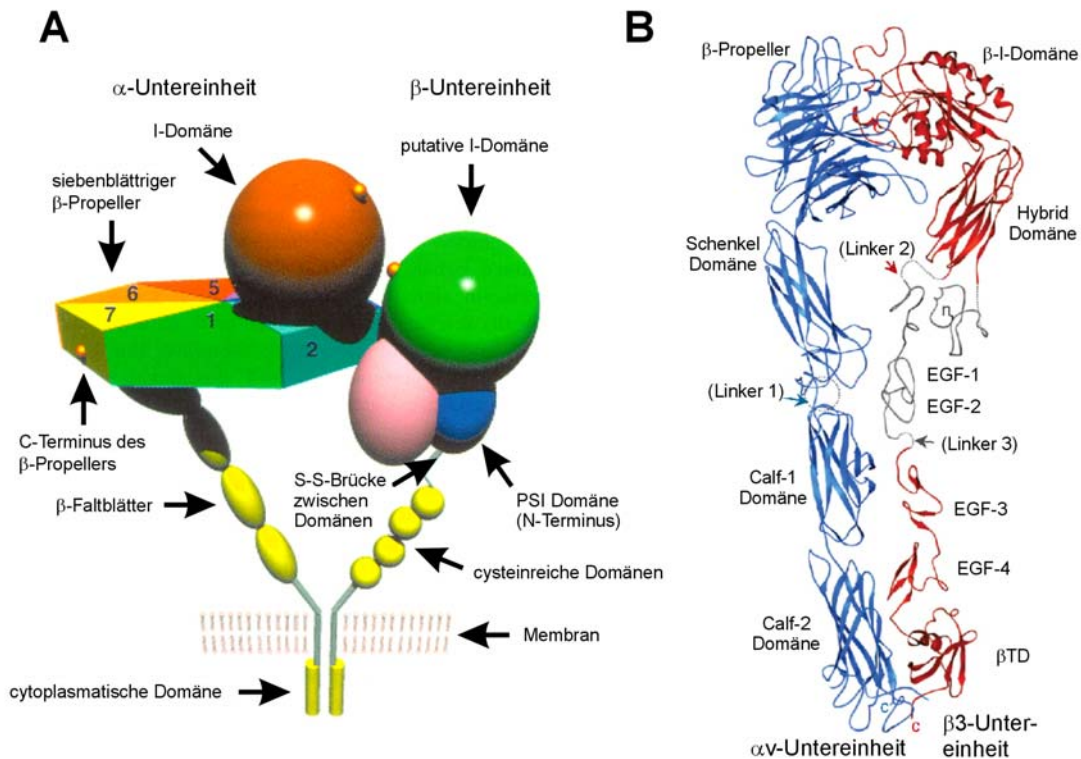
Die Untereinheiten sind nichtkovalent miteinander verknüpft und müssen zunächst *N*-glycosyliert werden, bevor sie im endoplasmatischen Retikulum  $\alpha\beta$ -Heterodimere ausbilden können.<sup>[534]</sup> Die größere  $\alpha$ -Untereinheit besitzt etwa 1100 Aminosäuren und besteht aus zwei meist unterschiedlich langen Aminosäureketten, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Der extrazelluläre Teil der  $\alpha$ -Einheit ist durch drei bis vier Bereiche von ca. 12 bis 15 Aminosäuren am *N*-Terminus gekennzeichnet, die divalente Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) binden.

Die  $\beta$ -Untereinheit besteht mit Ausnahme von  $\beta 4$  (ca. 1750 Aminosäuren)<sup>[590]</sup> aus knapp 800 Aminosäuren. Sie enthält vier hoch konservierte, cysteinreiche Domänen von je ca. 40 Aminosäuren in der Nähe der transmembranen Region, sowie einen großen *loop* am *N*-Terminus des extrazellulären Teils. Beide Untereinheiten besitzen eine kurze membranständige Region aus 20 bis 30 Aminosäuren und eine cytoplasmatische Domäne aus 20 bis 50 Aminosäuren, die für die Heterodimerbildung jedoch nicht essentiell sind.<sup>[591-593]</sup>

Der *C*-Terminus der  $\beta$ -Untereinheit<sup>[531, 594]</sup> verbindet über intrazelluläre Proteine wie Talin,<sup>[595]</sup> Vinculin<sup>[596, 597]</sup> und  $\alpha$ -Actinin<sup>[598]</sup> den Rezeptor mit dem Aktinfilament des Cytoskeletts. Damit ermöglichen die Integrine sowohl eine feste Bindung der Zellen an die extrazelluläre Matrix als auch die Signalübertragung in das Zellinnere.

Die *N*-terminalen Regionen aller  $\alpha$ -Untereinheiten enthalten die Struktur eines sieben-blättrigen  $\beta$ -Propellers (siehe Abbildung 3.21).<sup>[173, 599]</sup> Einige  $\alpha$ -Untereinheiten (z.B. in  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha M\beta 2$ ,  $\alpha L\beta 2$ ,  $\alpha 1\beta 1$ ) enthalten zwischen dem zweiten und dritten Propellerblatt eine zusätzliche, ca. 200 Aminosäuren lange I-Domäne (*inserted domain*). Oberhalb der  $\beta$ -Faltblätter befindet sich eine Bindungsstelle für divalente Kationen, die als MIDAS (*metal ion dependent adhesion site*) bezeichnet wird. Das Kation ist von fünf Aminosäureresten des Integrins umgeben, während an die sechste, freie Koordinationsstelle möglicherweise ein Carbonsäurerest des Liganden koordinieren kann.<sup>[600]</sup>

Es gibt jedoch auch Integrine mit einer sog. putativen I-Domäne in der  $\beta$ -Untereinheit, wie z. B. die  $\alpha_v$ -Einheit. Auch bei der  $\beta$ -Untereinheit wurde eine ca. 200 Aminosäuren lange hochkonservierte Region mit einem MIDAS-Bindungsmotiv ähnlich dem der  $\alpha$ -Untereinheit gefunden.<sup>[172, 599, 600]</sup> Das bedeutet, dass Liganden dieser Integrine analog auch an die Metallbindungsstellen der  $\beta$ -Untereinheiten binden können.



**Abbildung 3.21:** A) Schematische Darstellung des Aufbaus der Integrine. Die  $\alpha$ -Untereinheit enthält einen sieben-blättrigen  $\beta$ -Propeller und meist eine I-Domäne, die auch für die  $\beta$ -Untereinheit postuliert wird.<sup>[599]</sup> B) Korrigierte Röntgenkristallstruktur des extra-zellulären Teils von  $\alpha\beta_3$  mit 4 Domänen der  $\alpha$ -Untereinheit und 8 Domänen der  $\beta$ -Untereinheit.<sup>[172]</sup>

### 3.5.3 Entwicklung von $\alpha v\beta 3$ -selektiven Integrinliganden

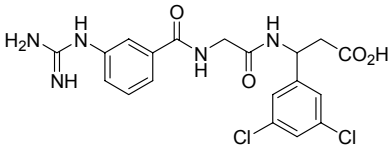
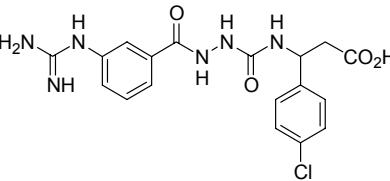
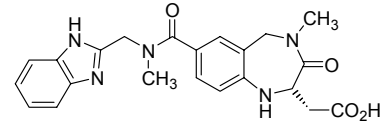
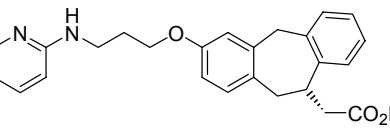
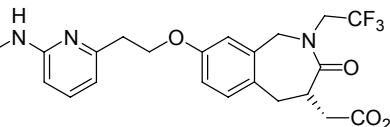
Die Integrine können mit verschiedenen ECM-, Zelloberflächen- und Plasmaproteinen (z. B. Laminin, Fibronectin, Fibrinogen und Vitronectin) mehr oder weniger selektiv in Wechselwirkung treten, wobei für diese Bindung beide Integrin-Untereinheiten beteiligt sind (Tabelle 3.3).<sup>[530,533,594,601]</sup> Die Sequenz Arg-Gly-Asp (RGD) spielt dabei eine große Rolle, da es in einem Großteil der Matrixproteine vorkommt (siehe grau hinterlegte Felder in Tabelle 3.3) und von vielen Integrinen (besonders von  $\alpha v$ -Integrinen) erkannt wird.<sup>[587, 589, 602]</sup> Aufgrund des in Kapitel 3.5.1 geschilderten hohen pharmazeutischen Potenzials der Integrine, wurden in den letzten Jahren große Anstrengungen unternommen, ausgehend von der RGD-Leitstruktur hochaffine und hochselektive  $\alpha IIb\beta 3$ - und  $\alpha v\beta 3$ -Antagonisten zu entwickeln.

Die RGD-Sequenz wurde in unserem Arbeitskreis in cyclische Peptide eingebaut und führte mit dem Cyclopeptid *cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)* (**263**) zu dem ersten synthetischen,  $\alpha v\beta 3$ -selektiven Inhibitor, der bereits in zahlreichen Tiermodellen untersucht wurde.<sup>[572,573,603-605]</sup> Systematische Derivatisierung dieser Cyclopeptid-Leitstruktur führte schließlich zu dem *N*-methylierten Cyclopeptid *cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-(NMe)Val-)* (**264**), einer hochaffinen und selektiven Verbindung, die die Bindung von Vitronectin an  $\alpha v\beta 3$  mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 0.6 nM inhibiert.<sup>[333,606]</sup> Diese Verbindung befindet sich momentan in klinischen Phase-II-Studien als Angiogenese-Inhibitor (Cilengitide, EMD 121974, *Merck KGaA*).

*Wermuth*<sup>[607]</sup> und *Schmitt*<sup>[608]</sup> konnten zudem zeigen, dass das Glycin der Cyclopeptide **263** und **264** ohne Aktivitätsverlust gegen aza-Glycin ausgetauscht werden kann (siehe Verbindungen **265** und **266**). Das von der Firma *Searle/Monsanto* entwickelte Peptidomimetikum **267** zeigt *in vitro* bei moderater Selektivität eine sehr gute Affinität zu  $\alpha v\beta 3$ . Zudem inhibiert diese Verbindung *in vivo* die bFGF-induzierte Angiogenese, sowie auch das

Tumorwachstum bei Ratten bzw. Mäusen.<sup>[609, 610]</sup> Darauf aufbauend wurde in unserem Arbeitskreis das aza-Peptidomimetikum **268** entwickelt, das neben sehr hoher Aktivität und Selektivität auch eine verbesserte Bioverfügbarkeit besitzt.<sup>[611]</sup>

**Tabelle 3.4:** Übersicht ausgewählter, selektiver  $\alpha v \beta 3$ -Antagonisten.

Nr.	Struktur	IC <sub>50</sub> [nM]			Ref.
		$\alpha v \beta 3$	$\alpha v \beta 5$	$\alpha II b \beta 3$	
<b>263</b>	<i>cyclo</i> (-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)	2.5	—	1700	[333]
<b>264</b>	<i>cyclo</i> (-Arg-Gly-Asp-D-Phe-(NMe)Val-)	0.6	—	860	[333]
<b>265</b>	<i>cyclo</i> (-Arg-azaGly-Asp-D-Phe-Val-)	4	500	6000	[619]
<b>266</b>	<i>cyclo</i> (-Arg-azaGly-Asp-D-Phe-(NMe)Val-)	10	40	2800	[619]
<b>267</b>		1.1	—	152	[610]
<b>268</b>		0.1	100	5500	[611]
<b>269</b>		2 <sup>a</sup>	—	30000 <sup>a</sup>	[618]
<b>270</b>		4 <sup>a</sup>	1.3 <sup>a</sup>	9000 <sup>a</sup>	[618]
<b>271</b>		1.2 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>	3800 <sup>a</sup>	[618, 620]

<sup>a</sup> Hierbei handelt es sich nicht um den IC<sub>50</sub>-Wert, sondern um die Bindungskonstante K<sub>i</sub>.

Die Firma GlaxoSmithKline entwickelte ein 3-Oxo-1,4-benzodiazepin, das eine hohe Affinität und Selektivität zu dem Blutplättchenrezeptor  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  aufweist.<sup>[546,612]</sup> Dieser  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Antagonist diente als Leitstruktur bei der Entwicklung einer Reihe von  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Antagonisten, von denen das 3-Oxo-1,4-benzodiazepin **269** mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 2 nM für den  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Rezeptor und einer ca. 10000-fachen Selektivität gegenüber dem  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin die besten Bindungseigenschaften besitzt.<sup>[613, 614]</sup> Kurze Zeit später gelang es durch Einbau von Guanidinmimetika<sup>[614-616]</sup> die Verbindungen **270** und **271** mit stark reduziertem Heteroatomanteil unter Erhalt der Aktivität und Selektivität abzuleiten.<sup>[617, 618]</sup> Diese Verbindung zeigt im Vergleich zu **269** ein deutlich verbessertes pharmakokinetisches Profil.

#### 3.5.4 Struktur-Wirkungs-Beziehung von $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrinliganden

Inzwischen ist in der Literatur eine enorme Zahl peptidischer und nichtpeptidischer  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ - und  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrinantagonisten beschrieben,<sup>[559, 618, 621-623]</sup> mit deren biologischer Daten Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden konnten. Es wurden eine saure und eine basische Gruppe als essentiellm Pharmakophor identifiziert. Für eine hohe  $\beta\text{3}$ -Integrinaffinität benötigt man eine Carbonsäuregruppe z. B. eine Asp-Seitenkette. Für die Bindung an das  $\alpha\text{IIb}$ -Untereinheit werden starke basische Gruppen, wie Amin, Amidin oder Guanidin benötigt.<sup>[624]</sup> Für die Bindung an die  $\alpha\text{v}$ -Untereinheit muss jedoch unbedingt ein Guanidin oder Guanidinmimetikum vorhanden sein.<sup>[618, 625]</sup> Im Fall von  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  geht man von einer *side-on*-Bindung des Guanidins an den Rezeptor aus.<sup>[626]</sup> Im Gegensatz dazu nimmt man für den  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrinrezeptor eine *end-on*-Bindung des Guanidins an.

Von großer Bedeutung für die Selektivität zu diesen beiden Integrinrezeptoren ist – neben der Art der Base – die Konformation der Sequenz bzw. der Abstand der Pharmakophore (Säure und Base) voneinander.<sup>[627-629]</sup> Weiterhin ist ein

aromatischer Rest in der Nähe der Säurefunktion entscheidend für höhere Affinität.<sup>[630]</sup>

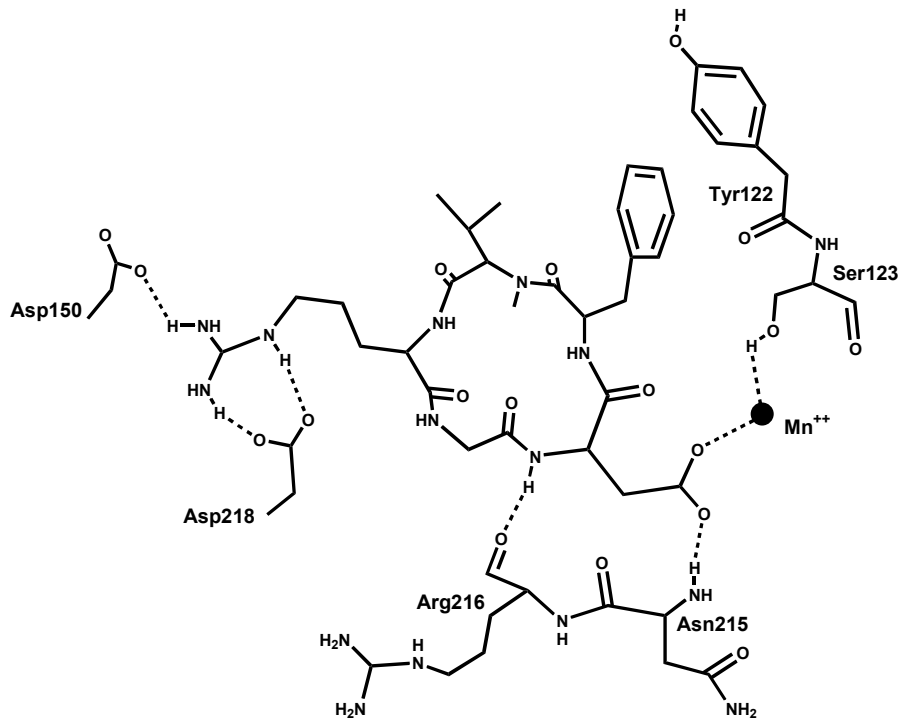
Hilfreich für das Design weiterer RGD-Mimetika ist die vor kurzem publizierte Kristallstruktur der extrazellulären  $\alpha v\beta 3$ -Domäne mit gebundenem Liganden.<sup>[172]</sup> Beim Liganden handelt es sich um *cyclo*(-RGDf(NMe)V-) **264**, der die beiden Integrin-Untereinheiten wie durch eine Klammer am oberen Ende zusammenhält. Eine den ligandengebundenen Komplex stabilisierende Interaktion spielt dabei eine Kationen- $\pi$ -Wechselwirkung der Arg<sup>261</sup>-Seitenkette in der  $\beta$ -Untereinheit, die in die Mitte des  $\beta$ -Propellers der  $\alpha$ -Untereinheit eintaucht. Die Bindungstasche für den RGD-Liganden ist relativ flach, so dass gerade genügend Platz für die Methylengruppe des Gly zur Verfügung steht, um mit der Integrinoberfläche in hydrophobe Interaktion zu treten. Das Proton der Gly-Asp-Amidbindung koordiniert dabei mit dem Carbonylsauerstoff des Arg<sup>216</sup> der  $\beta$ -Untereinheit.

Die beiden flankierenden Reste binden über ionische Wechselwirkungen in etwas tiefere Rezeptortaschen; das Asp an ein zweiwertiges Ion (Mn<sup>2+</sup> oder Ca<sup>2+</sup>) in der MIDAS-Region des  $\beta 3$  und an des NH des Asn<sup>215</sup>. Das Arg bindet über das Asp<sup>150</sup> und über *side-on*-Koordinierung mit dem Asp<sup>218</sup> des  $\alpha v$ . Eine weitere Komplexstabilisierung erfolgt durch die D-Phe-Seitenkette, die sich in einer hydrophoben Seitentasche des Rezeptors befindet und die mit dem Tyr<sup>122</sup> des  $\beta 3$  eine  $\pi$ -Wechselwirkung eingeht. Das Val, das bekanntermaßen gegen viele andere Aminosäuren ausgetauscht werden kann, ist an der Bindung nicht beteiligt.

Die Spezifität der Integrinliganden zwischen  $\alpha v\beta 3$  und  $\alpha IIb\beta 3$  beruht wahrscheinlich auf dem Abstand der Asp- und Arg-Seitenkette, der durch eine geknickte bzw. lineare Anordnung der RGD-Sequenz gekennzeichnet ist. Diese Annahme konnte durch umfassende Untersuchungen mit cyclischen Penta- und Hexapeptiden bestätigt werden.<sup>[297,572,573,603,604,631]</sup> Für  $\alpha v\beta 3$  beträgt der Abstand zwischen dem C $\beta$ (Arg) und C $\beta$ (Asp) 8-8.5 Å, für  $\alpha IIb\beta 3$  liegt er über



9 Å. Im Fall von *cyclo*(-RGDf(NMe)V-) **264** bewirkt die N-Methylierung der D-Phe-Val-Amidbindung einer leicht geöffneten Konformation des  $\gamma$ -turns der RGD-Sequenz, was sich in einer vierfach höheren Aktivität im Vergleich zum nicht methylierten *cyclo*(-RGDfV-) **263** widerspiegelt.<sup>[333]</sup>



**Abbildung 3.22:** Schematische Darstellung des *cyclo*(-RGDf(NMe)V-)- $\alpha$ v $\beta$ 3-Komplexes. Gestrichelte Linien stehen für Wasserstoffbrückenbindungen.

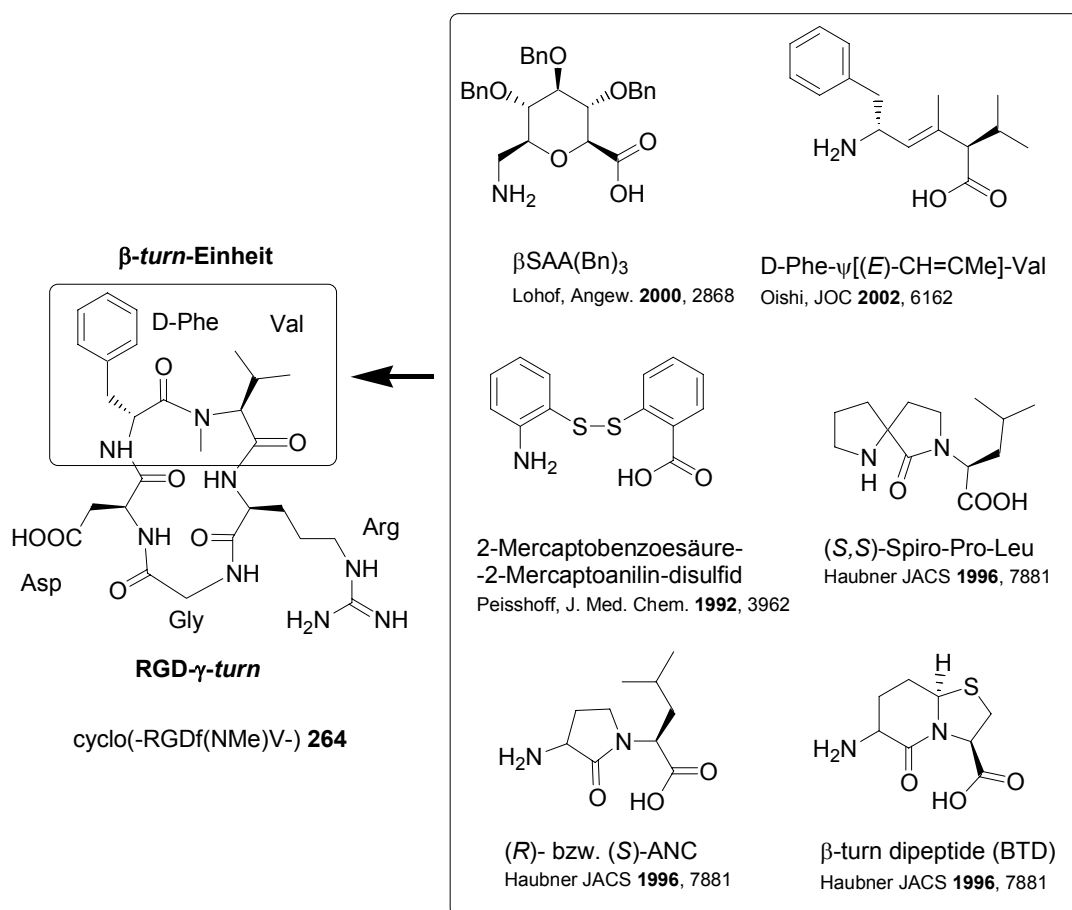
## 3.6 Synthese von Integrinliganden mit c $\beta$ AA und ATUA

### 3.6.1 Vorarbeiten und Aufgabenstellung

Die Struktur des oben beschriebenen *cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)* **263** besitzt die für Pentacyclopeptide mit einer D-Aminosäure typische  $\beta$ II'/ $\gamma$ -turn-Konformation mit dem D-Phe in der i+1-Position des  $\beta$ II'-turns.<sup>[604]</sup> Jedoch ist dabei die Konformation des für die  $\alpha$ v $\beta$ 3-Aktivität wichtigen  $\gamma$ -turns der RGD-Sequenz nicht eindeutig definiert, da in diesem Teil des Cyclus eine Restflexibilität erhalten bleibt.<sup>[333]</sup> Aus diesem Grund ist es ein Anliegen, den konformationellen Raum des Peptids durch stabilisierende Elemente einzuschränken, da man davon ausgeht, dass eine möglichst starre Konformation aus entropischen Gründen zu besseren Aktivitäten und  $\alpha$ v $\beta$ 3-Selektivitäten führt.<sup>[279]</sup>

Da der  $\beta$ -turn der D-Phe-Val-Einheit maßgeblich für die Ausbildung des gegenüberliegenden  $\gamma$ -turns der RGD-Sequenz verantwortlich ist, wurden bereits vielfältige Versuche unternommen, um durch den Einbau von  $\beta$ -turn-Mimetika an dieser Stelle aktive und selektive Integrin-Liganden zu erhalten. Darunter befinden sich RGD-Cyclen mit den in Abbildung **3.23** dargestellten Dipeptidisosteren,<sup>[436, 632-634]</sup> die in manchen Fällen relativ gute Aktivität und Selektivität erzielt haben, jedoch nicht an die Eigenschaften von *cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)* **263** heranreichen.

Über den Bindungsmodus mancher Peptide und Peptidomimetika an den  $\alpha$ v $\beta$ 3-Rezeptor wurde in unserem Arbeitskreis vor kurzen *docking*-Rechnungen durchgeführt, die Aufschluss über die Wechselwirkung der pharmakophoren Gruppen mit dem Rezeptor gibt (*L. Marinelli*, unveröffentlichte Ergebnisse).



**Abbildung 3.23:**  $\beta$ -turn-Mimetika, die für den Einbau in cyclische RGD-Peptide anstelle der D-Phe-Val-Einheit verwendet wurden.

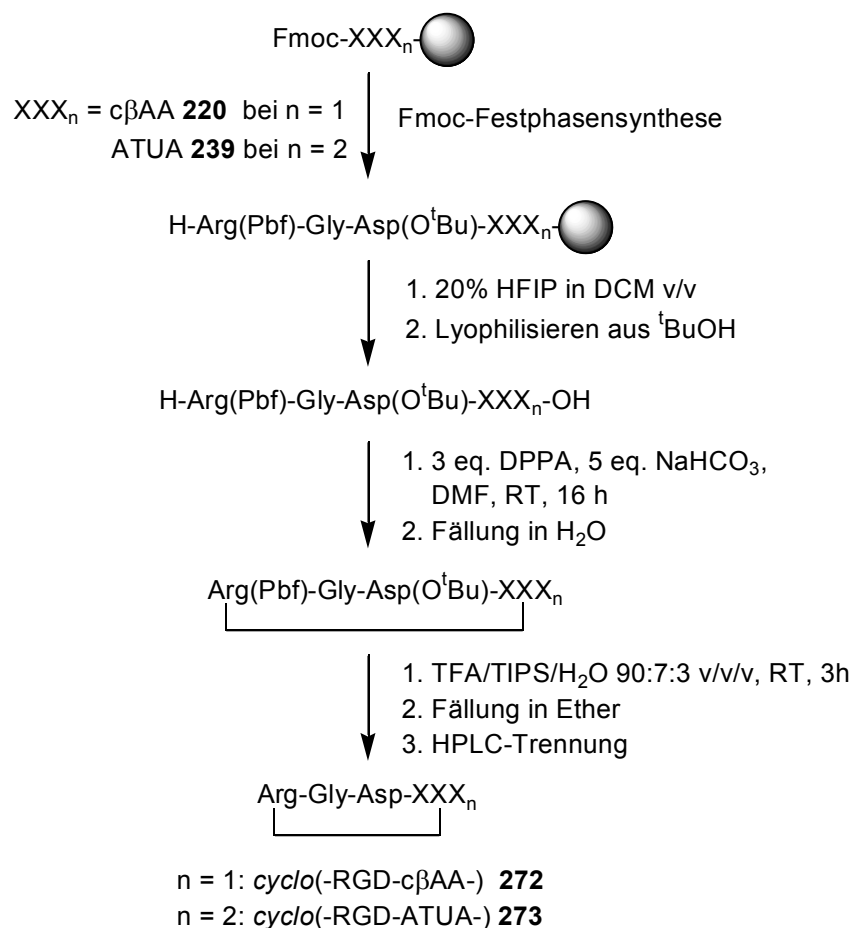
Im umgekehrten Fall kann das Cyclopeptid **263**, dessen biologische und strukturelle Eigenschaften genau bekannt sind, auch dazu verwendet werden, um Mimetika auf ihre  $\beta$ -turn-induzierende Wirkung hin zu untersuchen. Das Mimetikum tritt in Konkurrenz mit den anderen Aminosäuren des RGD-Cyclus um die Lage des  $\beta$ -turns,<sup>[633]</sup> da bekanntermaßen auch das Gly als eine Art „D-Aminosäure“ fungieren und dabei die i+1-Position eines  $\beta$ -turns besetzen kann.<sup>[635]</sup> Sollte dies der Fall sein, können über biologische Tests und Strukturvergleiche leicht Aussagen über Rigidität und Wirkungsweise des Mimetikums getroffen werden, da nur bei Ausbildung der typischen  $\beta$ II'/ $\gamma$ -

*turn*-Konformation mit einer stark abgewinkelter RGD-Sequenz selektive  $\alpha\beta$ 3-Liganden entstehen.

Die Aufgabenstellung in Bezug auf die beiden Bausteine c $\beta$ AA **200** und AUTA **239** beziehen sich auf die beiden oben genannten Ansätze. Für die durch den Cyclohexenring konformationell eingeschränkte  $\beta$ -Aminosäure c $\beta$ AA **220** stand im Vordergrund, herauszufinden, ob durch Einbau in ein cyclisches RGD-Peptid ein stabiler  $\gamma$ -*turn* der RGD-Sequenz ausgebildet wird und ob dieses Peptid dadurch erhöhte Aktivität gegenüber  $\alpha\beta$ 3-Integrinen zeigt. Darüber hinaus sollte ein Strukturvergleich mit *cyclo*(-RGDfV-) **263** Aufschluss darüber geben, in wieweit die Struktur von *cyclo*(-RGD-c $\beta$ AA-) **272** Einfluss auf die biologische Wirkung ausübt. Im Fall von ATUA **239** stand im Vordergrund, ob die postulierte  $\beta$ -*turn*-Eigenschaft auch durch Einbau in ein cyclisches Peptid erhalten bleibt. Hier soll insbesondere die Struktur- und biologische Analyse von *cyclo*(-RGD-AUTA-) **273** im Vergleich mit *cyclo*(-RGDfV-) **263** Vergleiche über die entsprechenden  $\gamma$ - und  $\beta$ II'-*turns* zulassen, die die RGD-Sequenz bzw. das *turn*-Mimetikum ATUA **239** einschließen.

### 3.6.2 Synthese der RGD-Peptide

Der Einbau von ATUA **239** und c $\beta$ AA **220** erfolgt mit Hilfe von Standard-Fmoc-Festphasensynthese, wobei die beiden Bausteine als erstes über den Trityllinker an die feste Phase gebunden werden, um nur geringe Substanzmengen für die Synthese zu verbrauchen. Nach linearem Aufbau der Sequenz und Abspaltung vom Harz mit 20% HFIP in DCM (v/v) wurde mit Hilfe der DPPA-Methode in Lösung cyclisiert und die Schutzgruppen mit TFA abgespalten. Die HPLC-gereinigten Peptide **272** und **273** wurden biologisch getestet und über NMR/Modelling-Techniken strukturell aufgeklärt.



**Abbildung 3.24:** Synthese von cyclischen RGD-Peptiden mit den Bausteinen ATUA **239** und cβAA **220**.

### 3.6.3 Biologische Testergebnisse

Die Peptide **272** und **273** wurden mit einem in der Literatur beschriebenen Rezeptor-Bindungs-Assay unter Verwendung isolierter Integrine durchgeführt.<sup>[611]</sup> Die Fähigkeit der RGD-Peptide, gebundenes, biotinyliertes Vitronectin bzw. Fibrinogen von immobilisierten αvβ3- oder αIIbβ3-Integrinen zu verdrängen, wurde mit den Standardpeptiden GRGDSPK und *cyclo*(-RGDfV-) verglichen. In Tabelle **3.5** sind die Aktivitäten (IC<sub>50</sub>-Werte) der RGD-Peptide angegeben, ebenso auch die Werte von zwei Peptiden, die die *turn*-Mimetika (R)-ANC **275** und βSAA(Bn)<sub>3</sub> **274** enthalten.

**Tabelle 3.5:**  $IC_{50}$ -Werte von RGD-Peptiden mit  $\gamma$ -turn-Mimetika.

<b>RGD-Peptid</b>	<b><math>\alpha v \beta 3</math> IC<sub>50</sub> [nM]</b>	<b><math>\alpha II b \beta 3</math> IC<sub>50</sub> [nM]</b>
GRGDSPK (Referenz)	1000	>10 <sup>4</sup>
<i>cyclo</i> (-RGDfV-) <b>263</b>	2	850
<i>cyclo</i> (-RGDf(NMe)V-) <b>264</b>	0.6	876
<i>cyclo</i> (-RGD-c $\beta$ AA-) <b>272</b>	1700	>3000
<i>cyclo</i> (-RGD-ATUA-) <b>273</b>	1000	1000
<i>cyclo</i> (-RGD- $\beta$ SAA(Bn) <sub>3</sub> -) <b>274</b>	25	13.4
<i>cyclo</i> (-RGD-(R)-ANC-) <b>275</b>	0.8	8.5

Wie man aus den Testdaten ersehen kann, besitzt weder **272** noch **273** eine besonders hohe  $\alpha v \beta 3$ -Aktivität oder selektive Abgrenzung gegenüber dem  $\alpha II b \beta 3$ -Rezeptor. Für das ATUA-Peptid **273** mag dies noch verständlich sein, da man sich eine mehr gestreckte Anordnung der RGD-Sequenz statt eines  $\gamma$ -turns aufgrund des langen, linearen ATUA-Moleküls vorstellen kann. Für das Peptid **272** mit der cyclischen  $\beta$ -Aminosäure ist eine Aufweitung der  $\gamma$ -turn-Struktur kaum denkbar, da es nur aus vier Aminosäuren besteht, und somit kaum in der Lage sein sollte, gestreckte Struktureinheiten aufzuweisen.

### 3.6.4 Die NMR-Strukturen von *cyclo*(-RGD-c $\beta$ AA-) und *cyclo*(-RGD-ATUA-)

Die Bestimmung der Struktur von *cyclo*(-RGD-c $\beta$ AA-) **272** und *cyclo*(-RGD-ATUA-) **273** in Lösung wurde durch NMR-Messungen (DQF-COSY,<sup>[503, 504]</sup> <sup>13</sup>C-HSQC,<sup>[505]</sup> TOCSY,<sup>[506]</sup> ROESY<sup>[507-509]</sup>) in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (90:10 v/v) unter Hilfe von M. Heller und J. Furrer in unserer Arbeitsgruppe an Bruker DMX500- und DMX750-Geräten durchgeführt. Nach Zuordnung der <sup>1</sup>H- und

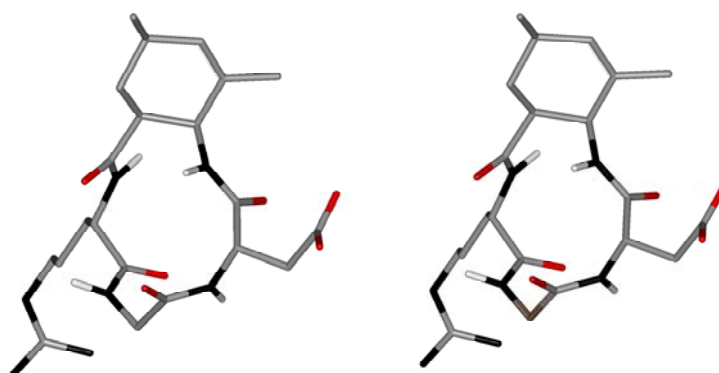
$^{13}\text{C}$ -Verschiebungen und Kreuzpeak-Integration der ROE-Signale wurden Abstands-*restraints* der Protonen unter Annahme der isolierten 2-Spin-Approximation berechnet.<sup>[510-512]</sup> Die *distance geometry*-Rechnungen (DG) (DISGEO-Programm<sup>[513-515]</sup>) und anschließenden *molecular dynamics*-Rechnungen (MD) (Discover-Programm mit CVFF-Kraftfeld<sup>[516]</sup>) in  $\text{H}_2\text{O}$  wurden unter Hilfe von *L. Marinelli* durchgeführt. Zusätzlich wurden über  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen  $^3\text{J}_{\text{H,H}}$ -Kopplungskonstanten<sup>[517-520]</sup> und die Temperaturgradienten der Amidprotonen<sup>[521, 522]</sup> bestimmt, um ergänzende Aussagen über Strukturmerkmale treffen zu können (z. B. Seitenkettenorientierung, Flexibilität, Abschirmung gegenüber Lösungsmittel).

#### 3.6.4.1 Die Struktur von *cyclo(-RGD-c $\beta$ AA-)*

Die NMR-Messungen wurden mit einer Lösung von 0.5 mg Peptid in 0.5 mL  $\text{H}_2\text{O}$  durchgeführt. Für die Berechnung der Lösungsstruktur wurde ein Eichabstand von 1.78 Å zwischen den beiden geminalen H(6) des  $\text{c}\beta\text{AA}$  verwendet, da die entsprechenden ROE-Signale im Spektrum eine deutlich bessere Auflösung als die Gly- $\text{H}^\alpha$ -Protonen aufwiesen. Insgesamt wurden 11 Interprotonenabstände für die Ermittlung der *backbone*-Struktur benutzt. Die Ermittlung der Seitenkettenorientierung von Asp und Arg über Kopplungskonstanten wurde nicht durchgeführt, da die *backbone*-Struktur und die Konstitution und Konfiguration der cyclischen  $\beta$ -Aminosäure im Vordergrund stand. Außerdem war es möglich, aufgrund von ROE-Intensitäten und  $^3\text{J}_{\text{H,H}}$ -Kopplungskonstanten die prochiralen Methylenprotonen  $\text{CH}_2(6)$  des  $\text{c}\beta\text{AA}$  und die  $\text{H}^\alpha$  des Gly stereospezifisch zuzuordnen.

Die Analyse der energieminierten Struktur ergibt, dass die Amidprotonen abwechselnd über bzw. unter der Cyclusebene liegen. Entsprechend stark sind die ROE-Signale zwischen dem  $\text{H}^{\text{N}}$  (i+1-Position) und dem  $\text{H}^\alpha$  der benachbarten Aminosäure (i-Position). Sehr schwache ROE-Signale zwischen den sich gegenüberliegenden Amidprotonen sind ebenfalls erkennbar; der

Abstand liegt bei etwa 5 Å. Die Auswertung der  $^3J_{\text{HN,H}\alpha}$ -Kopplungskonstanten ergibt, dass die großen Werte von 9.5 Hz und 10 Hz für das Asp- bzw. das c $\beta$ AA-Amidproton für einen dihedralen Winkel von um die 180° der Asp-H-N-C $^{\alpha}$ -H- bzw. c $\beta$ AA-H-N-C(2)-H-Bindung stehen. Diese Winkel finden sich auch in der in Abbildung 3.25 gezeigten Struktur. Hinzu kommt, dass das H $^{\text{N}}$  des Gly zwei deutlich unterscheidbare Kopplungskonstanten von 5 Hz und 8 Hz aufweist, die zusammen mit dem kurzen Abstand zwischen dem H $^{\text{N}}$ -Asp und dem H $^{\alpha}_{\text{proR}}$ -Gly von 2.3 Å auf eine starre  $\gamma$ -turn-Anordnung der RGD-Sequenz schliessen lassen. Der ROE-Kreuzpeak zwischen dem H $^{\text{N}}$ -Asp- und dem H $^{\alpha}_{\text{proS}}$ -Gly ist bedeutend schwächer.

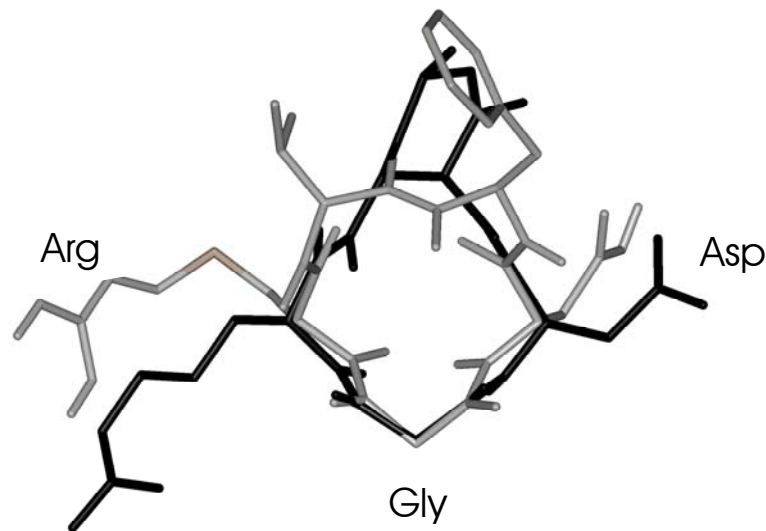


**Abbildung 3.25:** Stereobild der energieminierten Struktur von *cyclo(-RGD-c $\beta$ AA-)* 272.

Um eine Interpretation der biologischen Daten zu ermöglichen, wurde die Struktur von 272 mit der Struktur von *cyclo(-RGDfV-)* 263 überlagert. Maßgeblich dabei waren die C $^{\alpha}$ -Atome der RGD-Sequenz. Wie man in Abbildung 3.26 deutlich erkennen kann, stimmt der Abstand zwischen dem Asp-C $^{\alpha}$  und Arg-C $^{\alpha}$  in beiden Peptiden überein. Die Amidbindungen dazwischen weisen die selbe Orientierung auf, sind aber leicht gegeneinander verdreht. Besonders auffällig ist, dass sich die C $^{\alpha}$ -C $^{\beta}$ -Vektoren der Asp- und Arg-Seitenkette deutlich in ihrer Orientierung unterscheiden. Es kommt so zu



einem Platzwechsel der pharmakophoren funktionellen Gruppen, was wahrscheinlich für die schlechte Aktivität des *cyclo(-RGD-cβAA-)* **272** verantwortlich ist. Ebenso ist zu erwarten, dass durch das Fehlen einer aromatischen Gruppe, die im *cyclo(-RGDfV-)* **263** durch das D-Phe gestellt wird, die Affinität zum Vitronektin-Rezeptor verschlechtert wird. Die cβAA-Einheit kann darüber hinaus mit der Rezeptoroberfläche zusammenstoßen und dadurch die Bindung des Liganden an den  $\alpha\beta 3$ -Rezeptor weiter herabsetzen.

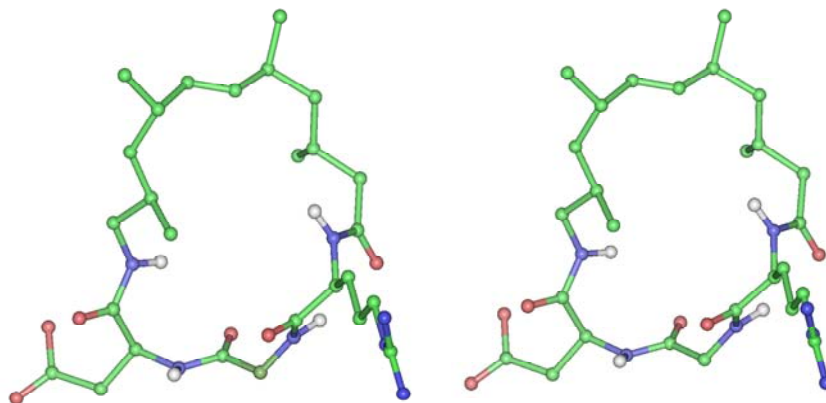


**Abbildung 3.26:** backbone-Überlagerung der RGD-Sequenz von *cyclo(-RGD-cβAA-)* **272** (schwarz) mit *cyclo(-RGDfV-)* **263** (grau). Der Abstand von Arg- $C^\alpha$  zu Asp- $C^\alpha$  ist in beiden Strukturen gleich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Einbau einer konformationell eingeschränkten  $\beta$ -Aminosäure in ein cyclisches RGD-Peptid nicht geeignet ist, um die richtige Anordnung der pharmakophoren Gruppen zu gewährleisten. Es kann zwar so ein Cyclus gebildet werden, der zur Stabilisierung des  $\gamma$ -turns der RGD-Sequenz führt, jedoch wird dadurch eine Umorientierung der Asp- und Arg-Seitenketten erzwungen.

### 3.6.4.2 Die Struktur von *cyclo(-RGD-ATUA-)*<sup>[636]</sup>

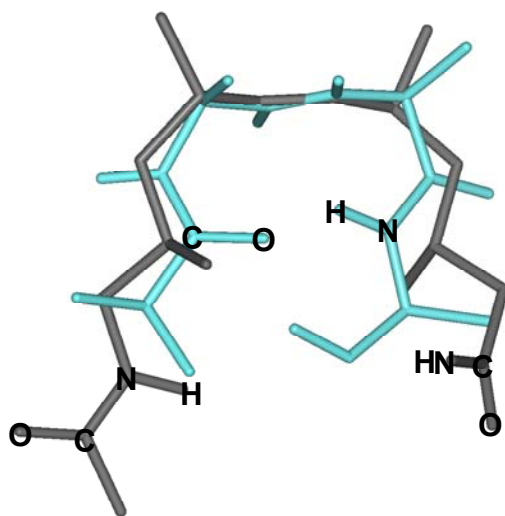
Die NMR-Messungen wurden mit einer Lösung von 0.6 mg Peptid in 0.5 mL H<sub>2</sub>O durchgeführt. Für die Berechnung der Lösungsstruktur wurde ein Eichabstand von 2.6 Å zwischen dem H<sup>α</sup> von Asp und dem H<sup>N</sup> von ATUA verwendet. Die H<sup>α</sup>-ROE-Signale des Gly konnten nicht als Eichabstand für die Abstand-*restraints* verwendet werden, da sie anscheinend zu flexibel sind und in ersten Berechnungen zu inkonsistenten Strukturen geführt haben. Insgesamt wurden 28 Interprotonenabstände und zwei <sup>3</sup>J<sub>HN,Hα</sub>-Kopplungskonstanten der Arg- und Asp-Amidprotonen (6.2 Hz bzw. 7.7 Hz) für DG-Rechnungen benutzt. Außerdem war es möglich, aufgrund von ROE-Intensitäten und <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>-Kopplungskonstanten die prochiralen Methylenprotonen CH<sub>2</sub>(4) und CH<sub>2</sub>(9) des ATUA stereospezifisch zuzuordnen.



**Abbildung 3.27:** Stereobild der am meisten populierten Struktur von *cyclo(-RGD-AUTA-)* 273. Das Glycin weist einen deformierten  $\gamma$ -turn auf.

Die Analyse der Lösungsstruktur nach MD-Rechnungen verdeutlicht, dass der Mittelteil von ATUA – einschließlich C(3) bis C(10) – eine stabile, um die Doppelbindung C(6)-C(7) symmetrische Konformation ausbildet, die der

vorhergesagtem  $\beta\text{II}'$ -Anordnung entspricht. Dass dem so ist, zeigt auch die Analyse der  $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplungskonstanten von  $\text{H}(4)_{\text{proR}}$  und  $\text{H}(9)_{\text{proR}}$  mit ihren Nachbarn  $\text{H}(3)$  und  $\text{H}(5)$  bzw.  $\text{H}(8)$  und  $\text{H}(10)$ , die bei 3.5 Hz und 10.8 Hz bzw. 11.4 Hz und 3.9 Hz liegen. Dies bedeutet, dass die dihedralen Winkel für die Protonen  $\text{H}(4)_{\text{proR}}$  und  $\text{H}(9)_{\text{proR}}$  fast identisch sind ( $\Phi_1 = \Phi_4$  und  $\Phi_2 = \Phi_3$  in Abbildung 3.11). Die aus der berechneten Struktur über die empirische Karplusgleichung<sup>1)</sup> ermittelten Kopplungskonstanten der Winkel  $\Phi_1$ ,  $\Phi_2$ ,  $\Phi_3$  und  $\Phi_4$  (über die Zeitachse gemittelt) betragen 2.3 Hz, 11.9 Hz, 11.8 Hz und 3.9 Hz. Die Simulation stimmt damit gut mit den experimentellen Daten überein. Die Überlagerung des ATUA-*backbones* von C(3) bis C(10) in *cyclo(-RGD-ATUA-)* 273 mit den entsprechenden Atomen in einem idealen  $\beta\text{II}'$ -turn ergibt einen RMSD-Wert von 0.49 Å (siehe Abbildung 3.28). Bezieht man dagegen alle *backbone*-Atome mit ein, dann steigt der Wert auf 1.0 Å, da sich die ATUA-Struktur in ihren terminalen Regionen aufweitet. Es kommt zu keiner Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem  $\text{H}^{\text{N}}$  und dem CO des ATUA. Insgesamt aber stimmen die Strukturen von ATUA und einem idealen  $\beta\text{II}'$ -turn gut überein.

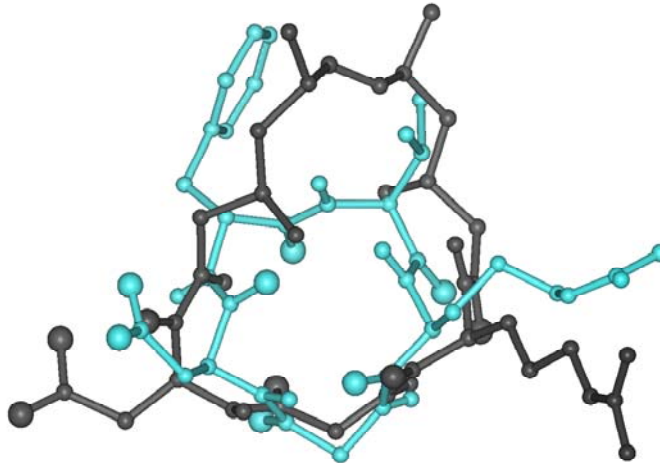


**Abbildung 3.28:** Überlagerung eines idealen  $\beta\text{II}'$ -turns (cyan) mit dem ATUA-Abschnitt von *cyclo(-RGD-ATUA-)* 273 (schwarz).

<sup>1)</sup> Empirische Karplusgleichung:  $^3J = 6.4 - 0.8\cos(\Phi) + 4.96\cos(2\Phi)$ . [637][638].

Die Analyse der MD-Struktur zeigt, dass die größte konformationelle Flexibilität im RGD-Teil des Peptids liegt. Dabei treten drei unterschiedliche  $\gamma$ -turns auf, deren  $i+1$ -Position abwechseln und in etwa gleichen Anteilen von Arg, Gly und Asp (21%, 17% und 13%) eingenommen werden. Diese  $\gamma_i/\gamma/\gamma_i$ -Anordnung entspricht aber den energetischen Rahmenbedingungen und erfüllt fast alle Abstands-*restraints*. Nur der Abstandswert zwischen dem Asp-H<sup>N</sup> und dem ATUA-H<sup>N</sup> ist wahrscheinlich durch die hohe Flexibilität des Asp-H<sup>N</sup> verletzt, wofür auch eine mittlere  $^3J_{\text{HN,H}\alpha}$ -Kopplungskonstante des Asp von 7 Hz spricht. Darüber hinaus zeigt der Temperaturgradient der H<sup>N</sup>-Protonen (alle > 3.3 ppb/°C) keinerlei Beteiligung der Amidprotonen an einer ausgeprägten Wasserstoffbrücke oder Abschirmung vom Lösungsmittel.

Die  $\gamma_i/\gamma/\gamma_i$ -Anordnung der RGD-Sequenz wurde wie bereits geschildert auch in *cyclo*(-RGDf(NMe)V-) **264** gefunden. Jedoch besitzt letzteres eine höhere Aktivität gegenüber dem  $\alpha\beta$ 3-Rezeptor. Dies könnte erklärt werden durch die größere Flexibilität von *cyclo*(-RGD-ATUA-) **273** aufgrund der Tatsache, dass AUTA eine Kette von vier statt zwei Aminosäuren ersetzt. Wie in Abbildung **3.28** gezeigt, ist das  $\beta$ -turn-Mimetikum nicht in der Lage, die für die Aktivität wichtige stark geknickte Anordnung der RGD-Sequenz herbeizuführen. Weiterhin könnte das Fehlen des Aromaten, der in *cyclo*(-RGDf(NMe)V-) **264** durch das D-Phe repräsentiert wird, zur geringen biologischen Aktivität beitragen. Der direkte Vergleich der beiden Strukturen von **263** und **273** macht deutlich, dass hauptsächlich der Asp-CO-Vektors eine unterschiedliche Orientierung besitzt. In *cyclo*(-RGDfV-) **263** zeigt diese Gruppe in die Ringmitte und stabilisiert einen potentiellen  $\gamma$ -turn, wobei in **273** die selbe Gruppe nach außen zeigt, und es somit zu einer Aufweitung des Cyclus und einer mehr gestreckten Anordnung der RGD-Sequenz kommt. Die *backbone*-Überlagerung der beiden RGD-Abschnitte ergibt einen RMSD-Wert von 0.9 Å.



**Abbildung 3.29:** Überlagerung der am meisten populierten Konformation (während der MD-Simulation) von **273** (schwarz) mit cyclo(-RGDfV-) **263** (cyan).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Flexibilität des ATUA-*turn*-Mimetikums – besonders im N- bzw. C-terminalen Bereich – zu einem Ensemble verschiedener, überwiegend linearer Konformationen der RGD-Sequenz führt, was in einer niedrigen Aktivität und Selektivität gegenüber dem Vitronektin-Rezeptor zum Ausdruck kommt. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass ein langes, lineares Molekül durch Verwendung von 2,4-Dimethylpentaneinheiten und dem Allylspannungskonzept sehr wohl in der Lage ist, eine  $\beta$ -*turn*-ähnliche Struktur einzunehmen. Die Wirkungsweise kommt damit der von  $\beta$ -Peptiden gleich, deren Struktur ebenfalls auf Allylspannung und sterischer Hinderung durch Alkylgruppen basiert. Eine Anwendung von ATUA **239** für die Induktion von  $\beta$ -Faltblättern wäre denkbar.

## 4 Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Projekte beschäftigten sich mit der Synthese und Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung von konformationell eingeschränkten Liganden für drei membranständige Zellrezeptoren, die Einfluss auf Metastasierung, Proliferation und Angiogenese von Krebszellen nehmen. Die Liganden bestehen aus proteaseresistenten, peptidischen Cyclen (kleine Ringgröße) mit stabilisierter, definierter Konformation, und bilden damit - ohne Wissen über die Raumstruktur der entsprechenden Rezeptoren - die Grundlage für eine ligandenbasierte Entwicklung von niedermolekularen Wirksubstanzen in der medizinischen Chemie.

Ein Ziel war die Inhibition der Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen der Serinprotease urokinaseartiger Plasminogen-Aktivator (uPA) mit ihrem Zelloberflächenrezeptor uPAR (CD87) durch Disulfidbrücken-cyclisierte Peptide. Ausgehend von der uPA-Rezeptorbindungsdomäne ATF abgeleiteten, peptidischen Leitstruktur *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> **8** wurden C- bzw. N-terminale Modifikationen durchgeführt und darauf aufbauend funktionalisierte uPAR-Antagonisten entwickelt. Für die Untersuchung von kooperativen Effekten bei multivalenten Liganden wurden C-terminal verknüpfte *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>-Dimere über teilgeschützte, cysteinverbrückte Peptidfragmente synthetisiert, die mit Hilfe von linearen Molekülen unterschiedlicher Länge und chemischer Natur verknüpft wurden. Es kommt dadurch zu einer Aktivitätssteigerung, die auf lokale Konzentrationserhöhung auf der Zelloberfläche und nicht auf *clustering* der Rezeptoren schließen lässt. Die Funktionalisierung des N-Terminus über die Seitenkette eines zusätzlichen Lys<sup>20</sup> ermöglichte den Zugang zu aktiven, fluoreszenz- und radiomarkierten Peptiden, mit denen die Untersuchung der uPA/uPAR-Wechselwirkung *in vitro* und *in vivo* studiert werden kann. Insbesondere die Verknüpfung mit einem Polyazamakrocyclus als Chelatligand für dreiwertige Ionen ermöglicht den Einsatz von *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-

uPA<sub>21-30</sub> in der Radionuklidtherapie von uPAR-überexprimierenden Krebszellen. Untersuchungen hierzu sind im Gange. Ferner wurde zur Leitstrukturoptimierung von *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub> ein templatbasiertes Konzept entwickelt, das - aufbauend auf die für die uPAR-Bindung wichtigen Aminosäuren und die Raumstruktur von **8** - verzweigte, cyclische Hexapeptide mit definierten Vorzugskonformationen als Grundgerüst (*scaffold*) verwendet. Als Verzweigungseinheit der Cyclen wurden eine Reihe neuartiger, trifunktionaler  $\alpha$ -Aminosäuren mit orthogonalen Schutzgruppen für die Fmoc-Festphasensynthese synthetisiert, die eine optimierte Cyclisierung am Harz und anschließende Fragmentkupplung ermöglichen.

Im zweiten Teil der Arbeit stand die Synthese von cyclischen Somatostatinrezeptor- und Integrinliganden im Vordergrund, um neuartige, konformationell eingeschränkte Aminosäuren auf ihre strukturinduzierende Eigenschaften hin zu untersuchen. Die Grundlage bilden dabei das vom Peptidhormon Somatostatin abgeleitete, hexacyclische "Veber-Peptid" **247** (*cyclo*(-Pro-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-)) und ein pentacyclisches RGD-Peptid **263** (*cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)), die beide mit hoher Selektivität und Aktivität an ihre jeweiligen Rezeptorensotypen (SSTR2 und  $\alpha v \beta 3$ ) binden. Die Struktur der Bausteine (*building blocks*) c $\beta$ AA **220** und ATUA **236** (Synthese von R. W. Hoffmann) beruht einerseits auf der Substanzklasse der cyclischen  $\beta$ -Aminosäuren, die durch Versteifung mittels zusätzlicher Doppelbindungen und hoher Anzahl an definierten Stereozentren stark strukturinduzierend wirken, und andererseits auf den linearen  $\beta$ -turn-Mimetika, die aufgrund von Allylspannung und Polyketeneinheiten Sekundärstrukturen ausbilden. Die 2-stufige, enantioselektive Synthese der *cis*-substituierten Cyclohexen- $\beta$ -Aminosäure **220** gelang über eine Multikomponentenreaktion (MCR), die eine auxiliargesteuerte Diels-Alder-Reaktion beinhaltet. Die jeweiligen Fmoc-Derivate von **220** und **236** wurden in die Peptide *cyclo*(-RGD-AUTA-) **273**, *cyclo*(-RGD-c $\beta$ AA-) **272** und *cyclo*(-Tyr-D-Trp-Nle-Thr(OTrt)-c $\beta$ AA-) **258** eingebaut und deren Struktur über zweidimensionale NMR-

Techniken und moleküldynamischen Rechnungen ermittelt. Im Fall der Integrinliganden konnten die Strukturen mit den biologischen Testergebnissen in Einklang gebracht werden, wobei im Fall von **272** ein stark ausgeprägter  $\gamma$ -turn der RGD-Sequenz und im Fall von **273** eine eher lineare und flexible Anordnung der selben Region festgestellt wurde. Darüber hinaus zeigt die ATUA-Einheit in **273** eine deutliche Ausprägung der vorhergesagten  $\beta$ II'-turn-Konformation.

Das cyclische Somatostatin-Analogon **258** zeigte in *in vitro*-Tests eine hohe antiproliferative Wirkung auf Tumorzellen ohne zelltoxische Nebeneffekte. Die Struktur ähnelt dabei dem "Veber-Peptid" **247** besonders in der  $\beta$ II'-turn-Region der Tyr-D-Trp-Nle-Thr-Sequenz; die cyclische  $\beta$ -Aminosäure c $\beta$ AA **220** vermag dabei die Phe-Pro-Einheit des **247** in ihrer Funktion als  $\beta$ VI-turn zu ersetzen. Über den Strukturvergleich konnte ein pharmakophores Modell formuliert werden, das die Anwesenheit der Thr(Trt)-Einheit als essentiell erklärt und definiert. Darauf aufbauend kann dieses Wissen für die pharmazeutische Entwicklung weiterer antiproliferativer und proteasestabiler Wirkstoffe herangezogen werden.



## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Allgemeine Arbeitstechniken

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

Die für die Festphasensynthese verwendeten **Harze** wurden von *PepChem* (Tritylchlorid-Polystyrol-Harz) und *NovaBiochem* (Sieber-Amid-Harz) bezogen. Die verwendeten **Aminosäurederivate** stammen, soweit nicht selbst hergestellt, von den Firmen *NovaBiochem*, *Alexis*, *Merck*, *Bachem*, *Neosystem*, *Aldrich*, *Advanced Chemtech*, *Synthetech* und *MultiSynTech*. Alle anderen eingesetzten **Reagenzien** stammen von den Firmen *Aldrich*, *Fluka*, *PerSeptive Macrocyclics* und *Merck*.

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

**Dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle** (DC-Kontrolle) und  $R_f$ -Wert-Bestimmung erfolgte auf mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> beschichteten Aluminiumfolien der Firma *Merck* mit unterschiedlichen Laufmittelgemischen. Die Detektion erfolgte anhand UV-Absorption bei 254 nm sowie durch Eintauchen in Ninhydrin-Reagenz (0.3 g Ninhydrin, 3 g Essigsäure, 100 ml Ethanol) oder Phosphormolybdänsäure-Reagenz (6.25 g Phosphormolybdänsäure, 2.5 g Cer(IV)-Sulfat, 15 ml konz. Schwefelsäure, 235 ml H<sub>2</sub>O) und anschließender Wärmebehandlung.

**Säulenchromatographische Trennungen** wurden mit 50- bis 100-fachem Massenüberschuß an Kieselgel 60 (Korngröße 0.040 - 0.063 mm) der Firma *Merck* bei 0.8 - 1.2 bar Überdruck durchgeführt.

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

**Analytische und präparative RP-HPLC** wurde an zwei Geräten der Firma *Beckman* (Pumpensystem 110B, Gradientenkontrolleinheit Typ 420, *Knauer* Uvicord Detektor, sowie System Gold, Hochdruckpumpenmodul 125, UV-Detektor 166) und an zwei Geräten der Firma *Amersham Pharmacia Biotech* (Äkta Basic 10F mit Autosampler A 900, bzw. Äkta Basic 100F, Pumpensystem P-900, Detektor UV-900, Steuerungssoftware Unicorn) durchgeführt. Die UV-Detektion erfolgte bei der Wellenlänge 220 nm. Es wurden für Analytik ( $\varnothing$  4.6 mm) und semipräparative ( $\varnothing$  20 mm) bzw. präparative Trennungen ( $\varnothing$  30 mm bzw.  $\varnothing$  40 mm) folgende Säulen verwendet: ODS-A C<sub>18</sub> (120 Å, 5 µm, 250 mm × 4.6 mm), ODS-A C<sub>18</sub> (120 Å, 5 bzw. 10 µm, 250 mm × 20 mm), ODS-A C<sub>18</sub> (120 Å, 10 µm, 250 mm × 30 mm) der Firma *Omniscrom YMC*, sowie Nucleosil C<sub>18</sub> (120 Å, 7 µm, 250 mm × 40 mm) der Firma *Macherey & Nagel*. Als Eluent dienten Laufmittelgemische aus H<sub>2</sub>O (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B) mit jeweils 0.1 Vol-% TFA im Gradientenbetrieb. Es wurden unterschiedliche lineare Gradientenprofile innerhalb von 30 Minuten verwendet. Im Fall der Anlage Äkta Basic 100F der Firma *Amersham Pharmacia Biotech* bestand Laufmittel B gerätebedingt aus 90 % Acetonitril und 10 % H<sub>2</sub>O mit jeweils 0.1 Vol-% TFA. Die Flussraten betragen 1 mL/min (analytisch), 8 mL/min (semipräparativ) und 25 mL/min (präparativ).

**ESI-Massenspektren** sowie LC-MS-Untersuchungen wurden an einem Gerät der Firma *Finnigan* vom Typ LCQ in Kombination mit dem HPLC-System *Hewlett Packard HP 1100* (Säulenmaterial: *Omniscrom YMC ODS-A C18* (120

Å, 3 µm, 125 mm × 2 mm), Flußrate 0.2 mL/min) durchgeführt. Als Eluent dienten Laufmittelgemische aus H<sub>2</sub>O und Acetonitril mit jeweils 0.1 Vol-% Ameisensäure im Gradientenbetrieb. Es wurden unterschiedliche lineare Gradientenprofile innerhalb von 15 Minuten verwendet.

Die **NMR-Spektren** der Aminosäurederivate, Schutzgruppen und Cyclopeptide wurden an den Geräten der Firma *Bruker* AC 250, DMX 500, DMX 600 und DMX 750 bei 300 K aufgenommen. Die verwendeten Pulsprogramme für verschiedene 2D-Experimente (TOCSY (Mischzeit: 40 ms), DQF-COSY, HSQC, ROESY (Mischzeit: 250 ms)) stammen aus der *Bruker* Bibliothek oder wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe geschrieben. Interner Standard für chemische Verschiebungen von <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C war das Lösungsmittelsignal von DMSO-d<sub>5</sub> für <sup>1</sup>H ( $\delta = 2.49$  ppm) und DMSO-d<sub>6</sub> für <sup>13</sup>C ( $\delta = 39.5$  ppm) bzw. CHCl<sub>3</sub> für <sup>1</sup>H ( $\delta = 7.24$  ppm) und CDCl<sub>3</sub> für <sup>13</sup>C ( $\delta = 77.0$  ppm). Für Messungen in D<sub>2</sub>O wurde als interner Standard <sup>t</sup>BuOH verwendet, dessen Signale für <sup>13</sup>C ( $\delta = 30.3$  ppm) und <sup>1</sup>H ( $\delta = 1.24$  ppm) zur Eichung der Spektren verwendet wurden. <sup>13</sup>C-NMR-Spektren wurden mit <sup>1</sup>H-Breitbandentkopplung aufgenommen. Die Unterdrückung des Wassersignals für die Messung von Peptiden in D<sub>2</sub>O/ H<sub>2</sub>O-Gemischen als Lösungsmittel wurde durch die WATERGATE-Methode<sup>[639]</sup> ermöglicht. Temperaturgradienten der Amidprotonen (in ppb/K) wurden ermittelt durch Messung der temperaturabhängigen Peakverschiebung in 1D-<sup>1</sup>H-Spektren bei 283 K, 288 K, 293 K, 298 K und 303 K.

Die **Strukturberechnungen** der Cyclopeptide wurde auf *Origin-200* Computern durchgeführt. Die Integration der ROESY-Spektren erfolgte mit XWIN-NMR (Version 3.0, *Bruker*), wobei darauf geachtet wurde, nur gut isolierte Signale zu verwenden. Die mathematische Umwandlung der ROE-Peakintegrale in Abstands-*restraints* unter Vernachlässigung der Spindiffusion bei einer ROESY-Mischzeit von 250 ms erfolgte nach  $r_i = r_{\text{ref}} (I_{\text{ref}}/ I_i)^{1/6}$  mit dem entsprechenden Referenzintegral  $I_{\text{ref}}$  und Referenzabstand  $r_{\text{ref}}$ . Die

Berechnung der Ober- bzw. Untergrenze der *restraints* erfolgte durch einen 10%igen Auf- bzw. Abschlag. Für die Distanzgeometrierechnungen (DG) wurde eine modifizierte Version des DISGEO-Programms verwendet. Die eingeschränkten und freien Moleküldynamikrechnungen (150 ps) unter Verwendung eines lösungsmittelgefüllten Kastens (Kantenlänge 40 Å) mit anschließender Energieminimierung wurden mit dem DISCOVER-Programm im CVFF-Kraftfeld durchgeführt.

## 5.2 Liste der synthetisierten Verbindungen

### 5.2.1 Aminosäurederivate (geordnet nach Aminosäuren) und Schutzgruppen

[2*S*]-2-Amino-3-[(4-methoxy-phenyl)-diphenyl-methylsulfanyl]-propionsäure (**18**)

[2*S*]-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-3-[(4-methoxy-phenyl)-diphenylmethylsulfanyl]-propionsäure (**19**)

2-(3-Methylbutyryl)-dimedon (Ddv) (**185**)

4-{N-[1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl]amino}-benzylalkohol (Dmab-OH) (**187**)

*rac*-Asparaginsäure-4-benzylester (**206**)

N-Fmoc-D-asparaginsäure-1-*tert*-butylester-4-Dmab-ester (**194**)

N-Fmoc-D-asparaginsäure-4-*tert*-butylester-1-Dmab-ester (**195**)

N-Fmoc-D-asparaginsäure-4-Dmab-ester (**200**)

N-Fmoc-D-asparaginsäure-1-Dmab-ester (**201**)

D-Glutaminsäure-5-benzylester (**207**)

D-Glutaminsäure-5-benzylester-1-*tert*-butylester (**214**)

D-Glutaminsäure-1-*tert*-butylester (**213**)

N-Fmoc-D-glutaminsäure-1-*tert*-butylester (**190**)

N-Fmoc-D-glutaminsäure-1-*tert*-butylester-5-Dmab-ester (**196**)

N-Fmoc-D-glutaminsäure-5-*tert*-butylester-1-Dmab-ester (**197**)

N-Fmoc-D-glutaminsäure-5-Dmab-ester (**202**)

N-Fmoc-D-glutaminsäure-1-Dmab-ester (**203**)

N-Fmoc-D-glutaminsäure-5-benzylester (**210**)

N-Fmoc-D-glutaminsäure-5-benzylester-1-*tert*-butylester (**212**)

*rac*-2-Amino-adipinsäure (**181**)

*rac*-2-Amino-adipinsäure-6-benzylester (**208**)

- rac*-2-Amino-adipinsäure-6-benzylester-1-*tert*-butylester (215)  
*rac*-2-Amino-adipinsäure-1-*tert*-butylester (217)  
*rac*-N-Fmoc-2-amino-adipinsäure-1-*tert*-butylester (192)  
*rac*-N-Fmoc-2-amino-adipinsäure-1-*tert*-butylester-6-Dmab-ester (198)  
*rac*-N-Fmoc-2-amino-adipinsäure-6-Dmab-ester (204)  
*rac*-2-Amino-pimelinsäure (182)  
*rac*-2-Amino-pimelinsäure-7-benzylester (209)  
*rac*-2-Amino-pimelinsäure-7-benzyl-ester-1-*tert*-butylester (216)  
*rac*-2-Amino-pimelinsäure-1-*tert*-butylester (218)  
*rac*-N-Fmoc-2-amino-pimelinsäure-1-*tert*-butylester (193)  
*rac*-N-Fmoc-2-amino-pimelinsäure-1-*tert*-butylester-7-Dmab-ester (199)  
*rac*-N-Fmoc-2-amino-pimelinsäure-7-Dmab-ester (205)
- (-)-Menthylacrylat (223)  
(-)-8-Phenylmenthylacrylat (224)  
[1*S*, 2*S*, 5*R*]-2-Acetylamino-3,5-diethyl-cyclohex-3-en-carbonsäure-menthylester (231)  
[1*S*, 2*S*, 5*R*]-2-Acetylamino-3,5-diethyl-cyclohex-3-en-carbonsäure(-)-8-phenylmenthylester (232)  
[1*S*, 2*S*, 5*R*]-2-Benzylloxycarbonylamino-3,5-diethyl-cyclohex-3-en-carbonsäure-menthylester (233)  
[1*S*, 2*S*, 5*R*]-2-Benzylloxycarbonylamino-3,5-diethyl-cyclohex-3-en-carbonsäure(-)-8-phenylmenthylester (234)  
[1*S*, 2*S*, 5*R*]-2-Benzylloxycarbonylamino-3,5-dibenzyl-cyclohex-3-en-carbonsäure(-)-8-phenylmenthylester (235)  
[1*S*, 2*S*, 5*R*]-3,5-Diethyl-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-cyclohex-3-en-carbonsäure (236)  
[3*R*,5*S*,6*E*,8*S*,10*R*]-11-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3,5,8,10-tetramethyl-undec-6-ensäure (241)

5.2.2 *cyclo*[21,29][D-Cys<sup>21</sup>, Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>-Modifikationen

Tabelle 5.1: Teil 1

	Sequenz	analyt. HPLC		ESI-MS m/z =	Summen- formel
		Gradient in %	R <sub>t</sub> in min		
<b>C/N-terminale Modifikationen</b>					
<b>9</b>	<i>cyclo</i> [2, 10]-Val-D-Cys-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp	20 - 70	14.55	1374.7 [m+H] <sup>+</sup>	C <sub>63</sub> H <sub>87</sub> N <sub>15</sub> O <sub>16</sub> S <sub>2</sub>
<b>10</b>	<i>cyclo</i> [2, 10]-Ac-Val-D-Cys-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp	20 - 50	19.67	1416.8 [m+H] <sup>+</sup>	C <sub>65</sub> H <sub>89</sub> N <sub>15</sub> O <sub>17</sub> S <sub>2</sub>
<b>12</b>	<i>cyclo</i> [1, 9]-Ac-D-Cys-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp-NH <sub>2</sub>	20 - 50	15.98	1316.5 [m+H] <sup>+</sup>	C <sub>60</sub> H <sub>81</sub> N <sub>15</sub> O <sub>15</sub> S <sub>2</sub>
<b>13</b>	<i>cyclo</i> [1, 9]-D-Cys-Asn-Nle-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp	20 - 70	20.27	1260.5 [m+H] <sup>+</sup>	C <sub>58</sub> H <sub>77</sub> N <sub>13</sub> O <sub>15</sub> S <sub>2</sub>
<b>14</b>	<i>cyclo</i> [1, 9]-D-Cys-Asn-Nle-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp-Ahx-Ahx	20 - 90	13.92	1486.8 [m+H] <sup>+</sup>	C <sub>70</sub> H <sub>99</sub> N <sub>15</sub> O <sub>17</sub> S <sub>2</sub>
<b>15</b>	<i>cyclo</i> [1, 9]-D-Cys-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp-Ahx	25 - 50	16.51	1388.6 [m+H] <sup>+</sup>	C <sub>64</sub> H <sub>89</sub> N <sub>15</sub> O <sub>16</sub> S <sub>2</sub>

Tabelle 5.1: Teil 2

Monomere und Dimere						
17	<i>cyclo</i> [1, 9]-Boc-D-Cys-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Tyr( <sup>t</sup> Bu)-Phe-Ser( <sup>t</sup> Bu)-Asn(Trt)-Ile-Cys-Trp(Boc)-Ahx	90 – 100	15.61	2306.8 [m+Na] <sup>+</sup>	C <sub>125</sub> H <sub>157</sub> N <sub>15</sub> O <sub>22</sub> S <sub>2</sub>	
24	<i>cyclo</i> [1, 9]-D-Cys-Asn-Lys(Z)-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp-Ahx	20 - 50	27.25	1522.8 [m+H] <sup>+</sup>	C <sub>72</sub> H <sub>95</sub> N <sub>15</sub> O <sub>18</sub> S <sub>2</sub>	
25	<i>cyclo</i> [1, 9]-D-Cys-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp-Ahx-Ahx	20 – 60	16.02	1501.6 [m+H] <sup>+</sup>	C <sub>70</sub> H <sub>100</sub> N <sub>16</sub> O <sub>17</sub> S <sub>2</sub>	
26	<i>cyclo</i> [1, 9]-D-Cys-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp-Ahx-Ahx-ADO	20 – 60	15.43	1646.6 [m+H] <sup>+</sup>	C <sub>76</sub> H <sub>111</sub> N <sub>17</sub> O <sub>20</sub> S <sub>2</sub>	
27	<i>cyclo</i> [1, 9]-D-Cys-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp-HEGAS	20 – 60	15.59	1596.5 [m+H] <sup>+</sup>	C <sub>72</sub> H <sub>105</sub> N <sub>15</sub> O <sub>22</sub> S <sub>2</sub>	
28	2,2'-(Ethylendioxy)-diethyl-N,N'-( <i>cyclo</i> [1, 9]-D-Cys-Asn-Lys(Z)-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp-Ahx)-amid	30 – 55	23.85	3178.3 [m+Na] <sup>+</sup>	C <sub>150</sub> H <sub>202</sub> N <sub>32</sub> O <sub>36</sub> S <sub>4</sub>	
29	2,2'-(Ethylendioxy)-diethyl-N,N'-( <i>cyclo</i> [1, 9]-D-Cys-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp-Ahx-Ahx)-amid	30 – 60	12.48	3114.5 [m+H] <sup>+</sup>	C <sub>146</sub> H <sub>212</sub> N <sub>34</sub> O <sub>34</sub> S <sub>4</sub>	
30	2,2'-(Ethylendioxy)-diethyl-N,N'-( <i>cyclo</i> [1, 9]-D-Cys-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp-(Ahx) <sub>2</sub> -ADO)-amid	10 – 50	24.67	1703.1 [m+2H] <sup>2+</sup>	C <sub>158</sub> H <sub>234</sub> N <sub>36</sub> O <sub>40</sub> S <sub>4</sub>	



Tabelle 5.1: Teil 3

<b>31</b>	2,2'-(Ethylendioxy)-diethyl-N,N'-(cyclo[1, 9]-D-Cys-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp-HEGAS)-amid	10 – 50	25.46	1653.0 [m+2H] <sup>2+</sup>	C <sub>150</sub> H <sub>222</sub> N <sub>32</sub> O <sub>44</sub> S <sub>4</sub>
<b>32</b>	cyclo[1, 9]-D-Cys-Asn-Lys(Z)-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp-Ahx-NH-(CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O) <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	30 – 55	13.86	1652.8 [m+H] <sup>+</sup>	C <sub>78</sub> H <sub>109</sub> N <sub>17</sub> O <sub>19</sub> S <sub>2</sub>
<b>35</b>	cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(cyclo[1, 9]-D-Cys-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp-Ahx-ADO-)-)	10 – 70	17.39	1117.0 [m+2H] <sup>2+</sup>	C <sub>103</sub> H <sub>152</sub> N <sub>26</sub> O <sub>26</sub> S <sub>2</sub>
<b>mit N-terminalem Lys(X)</b>					
<b>36</b>	cyclo[2, 10]-Lys(2-Naphthoyl)-D-Cys-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp	10 – 90	16.99	1557.6 [m+H] <sup>+</sup>	C <sub>75</sub> H <sub>96</sub> N <sub>16</sub> O <sub>17</sub> S <sub>2</sub>
<b>37</b>	cyclo[2, 10]-Lys(NH <sub>2</sub> -Lys-Lys-Gly-Ser-Gly)-D-Cys-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp	10 – 90	12.62	1860.8 [m+H] <sup>+</sup>	C <sub>83</sub> H <sub>125</sub> N <sub>23</sub> O <sub>22</sub> S <sub>2</sub>
<b>38</b>	cyclo[2, 10]-Lys(FITC)-D-Cys-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp	10 – 90	16.33	1792.3 [m+H] <sup>+</sup>	C <sub>85</sub> H <sub>101</sub> N <sub>17</sub> O <sub>21</sub> S <sub>2</sub>
<b>39</b>	cyclo[2, 10]-Lys(DOTA)-D-Cys-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-Cys-Trp	10 – 90	13.23	895.7 [m+2H] <sup>2+</sup>	C <sub>80</sub> H <sub>116</sub> N <sub>20</sub> O <sub>23</sub> S <sub>2</sub>

## 5.2.3 Cyclische Templatpeptide

Tabelle 5.2:

<i>Teil</i>	Sequenz	ESI-MS m/z = [m+H] <sup>+</sup>	HPLC- R <sub>t</sub> / Gradient	Summen- formel
40	<i>cyclo</i> (-Ser-Ile-Asn-Lys-D-Tyr-Phe-)	753.5	15.53 min 10 – 60%	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> N <sub>8</sub> O <sub>9</sub>
41	<i>cyclo</i> (-Ser-Asn-Ile-Lys-D-Tyr-Phe-)	753.5	14.37 min 10 – 60%	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> N <sub>8</sub> O <sub>9</sub>
42	<i>cyclo</i> (-Ser-D-Ile-Asn-Lys-Tyr-Phe-)	753.5	15.00 min 10 – 60%	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> N <sub>8</sub> O <sub>9</sub>
43	<i>cyclo</i> (-Ser-D-Asn-Ile-Lys-Tyr-Phe-)	753.5	14.78 min 10 – 60%	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> N <sub>8</sub> O <sub>9</sub>
44	<i>cyclo</i> (-D-Ser-Ile-Asn-Lys-Tyr-Phe-)	753.5	15.57 min 10 – 60%	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> N <sub>8</sub> O <sub>9</sub>
45	<i>cyclo</i> (-D-Ser-Asn-Ile-Lys-Tyr-Phe-)	753.5	15.02 min 10 – 60%	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> N <sub>8</sub> O <sub>9</sub>
46	<i>cyclo</i> (-D-Ser-Ile-Asn-D-Lys-Tyr-Phe-)	753.5	16.22 min 10 – 60%	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> N <sub>8</sub> O <sub>9</sub>
47	<i>cyclo</i> (-Ser-Asn-Ile-D-Lys-Tyr-Phe-)	753.5	15.84 min 10 – 60%	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> N <sub>8</sub> O <sub>9</sub>
48	<i>cyclo</i> (-Ser-D-Ile-Asn-Lys-D-Tyr-Phe-)	753.5	15.20 min 10 – 60%	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> N <sub>8</sub> O <sub>9</sub>
49	<i>cyclo</i> (-Ser-D-Asn-Ile-Lys-D-Tyr-Phe-)	753.5	14.08 min 10 – 60%	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> N <sub>8</sub> O <sub>9</sub>
50	<i>cyclo</i> (-D-Ser-Ile-Asn-D-Lys-Tyr-Phe-)	753.5	15.21 min 10 – 60%	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> N <sub>8</sub> O <sub>9</sub>
51	<i>cyclo</i> (-D-Ser-Asn-Ile-D-Lys-Tyr-Phe-)	753.5	16.58 min 10 – 60%	C <sub>37</sub> H <sub>52</sub> N <sub>8</sub> O <sub>9</sub>
52	<i>cyclo</i> (-D-Pro-Ile-Asn-Lys-Tyr-Phe-)	763.5	20.31 min 10 – 60%	C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub>

<i>Teil2</i>	Sequenz	ESI-MS m/z = [m+H] <sup>+</sup>	HPLC- R <sub>t</sub> / Gradient	Summen- formel
<b>53</b>	<i>cyclo</i> (-D-Pro-Asn-Ile-Lys-Tyr-Phe-)	763.5	19.87 min 10 – 60%	C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub>
<b>54</b>	<i>cyclo</i> (-D-Pro-Ile-Asn-D-Lys-Tyr-Phe-)	763.5	19.18 min 10 – 60%	C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub>
<b>55</b>	<i>cyclo</i> (-D-Pro-Asn-Ile-D-Lys-Tyr-Phe-)	763.5	17.38 min 10 – 60%	C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub>
<b>56</b>	<i>cyclo</i> (-Ser-Pro-Ile-Lys-Tyr-Phe-)	736.5	19.06 min 10 – 60%	C <sub>38</sub> H <sub>53</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub>
<b>57</b>	<i>cyclo</i> (-Ser-Pro-Ile-D-Lys-Tyr-Phe-)	736.5	18.99 min 10 – 60%	C <sub>38</sub> H <sub>53</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub>
<b>58</b>	<i>cyclo</i> (-Asn-Ile-Lys-Asn-Tyr-Phe-)	780.4	15.02 min 10 – 60%	C <sub>38</sub> H <sub>53</sub> N <sub>9</sub> O <sub>9</sub>
<b>59</b>	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Ile-Asn-Tyr-Phe-)	780.4	14.53 min 10 – 60%	C <sub>38</sub> H <sub>53</sub> N <sub>9</sub> O <sub>9</sub>
<b>60</b>	<i>cyclo</i> (-Ile-Lys-Tyr-Phe-Ser-L/D-Asp(-Ile-Cys-Trp)-)	1156.5	29.54 min	C <sub>57</sub> H <sub>77</sub> N <sub>11</sub> O <sub>13</sub> S
<b>61</b>			20 – 40%	
<b>62</b>	<i>cyclo</i> (-Ile-Lys-Tyr-Phe-D-Ser-L/D-Asp(-Ile-Cys-Trp)-)	1156.5	29.09/	C <sub>57</sub> H <sub>77</sub> N <sub>11</sub> O <sub>13</sub> S
<b>63</b>			30.85 min 20 – 40%	
<b>64</b>	<i>cyclo</i> (-Ile-Lys-Tyr-D-Phe-Ser-L/D-Asp(-Ile-Cys-Trp)-)	1156.5	27.48/	C <sub>57</sub> H <sub>77</sub> N <sub>11</sub> O <sub>13</sub> S
<b>65</b>			31.02 min 20 – 40%	
<b>66</b>	<i>cyclo</i> (-Ile-Lys-D-Tyr-Phe-Ser-L/D-Asp(-Ile-Cys-Trp)-)	1156.5	29.17/	C <sub>57</sub> H <sub>77</sub> N <sub>11</sub> O <sub>13</sub> S
<b>67</b>			30.10 min 20 – 40%	
<b>68</b>	<i>cyclo</i> (-Ile-D-Lys-Tyr-Phe-Ser-L/D-Asp(-Ile-Cys-Trp)-)	1156.5	30.20/	C <sub>57</sub> H <sub>77</sub> N <sub>11</sub> O <sub>13</sub> S
<b>69</b>			31.25 min 20 – 40%	

<i>Teil3</i>		ESI-MS	HPLC-	Summen-
Sequenz		m/z =	R <sub>t</sub> /	formel
		[m+H] <sup>+</sup>	Gradient	
<b>70</b>	<i>cyclo</i> (-D-Ile-Lys-Tyr-Phe-Ser-L/D-Asp(-Ile-Cys-Trp)-)	1156.5	29.25/	C <sub>57</sub> H <sub>77</sub> N <sub>11</sub> O <sub>13</sub> S
<b>71</b>			30.20 min 20 – 40%	
<b>72</b>	<i>cyclo</i> (-Lys-Tyr-Phe-Ser-Ile-L/D-Asp(-Ile-Trp)-)	1053.5	29.59 min	C <sub>54</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
<b>73</b>			20 – 40%	
<b>74</b>	<i>cyclo</i> (-Lys-Tyr-Phe-Ser-D-Ile-L/D-Asp(-Ile-Trp)-)	1053.5	27.23/	C <sub>54</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
<b>75</b>			28.93 min 20 – 40%	
<b>76</b>	<i>cyclo</i> (-Lys-Tyr-Phe-D-Ser-Ile-L/D-Asp(-Ile-Trp)-)	1053.5	32.00/	C <sub>54</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
<b>77</b>			33.81 min 20 – 40%	
<b>78</b>	<i>cyclo</i> (-Lys-Tyr-D-Phe-Ser-Ile-L/D-Asp(-Ile-Trp)-)	1053.5	28.73/	C <sub>54</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
<b>79</b>			30.07 min 20 – 40%	
<b>80</b>	<i>cyclo</i> (-Lys-D-Tyr-Phe-Ser-Ile-L/D-Asp(-Ile-Trp)-)	1053.5	28.31/	C <sub>54</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
<b>81</b>			29.91 min 20 – 40%	
<b>82</b>	<i>cyclo</i> (-D-Lys-Tyr-Phe-Ser-Ile-L/D-Asp(-Ile-Trp)-)	1053.5	30.10/	C <sub>54</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
<b>83</b>			31.87 min 20 – 40%	
<b>84</b>	<i>cyclo</i> (-D-Lys-Tyr-Phe-Ser-Ile-Asp(-Lys-Trp)-)	1068.4	20.00 min 20 – 40%	C <sub>54</sub> H <sub>73</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>
<b>85</b>	<i>cyclo</i> (-D-Lys-Tyr-Phe-Ser-Ile-D-Asp(-Lys-Trp)-)	1068.4	22.37 min 20 – 40%	C <sub>54</sub> H <sub>73</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>
<b>86</b>	<i>cyclo</i> (-D-Lys-Tyr-Phe-Ser-Ile-γ-Asp)-Lys-Trp	1068.4	20.44 min 20 – 40%	C <sub>54</sub> H <sub>73</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>
<b>87</b>	<i>cyclo</i> (-D-Lys-Tyr-Phe-Ser-Ile-γ-D-Asp)-Lys-Trp	1068.4	19.00 min 20 – 40%	C <sub>54</sub> H <sub>73</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>
<b>88</b>	<i>cyclo</i> (-D-Lys-Tyr-Phe-D-Ser-Ile-Asp(-Lys-Trp)-)	1068.4	17.35 min 20 – 40%	C <sub>54</sub> H <sub>73</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>

<i>Teil4</i>	Sequenz	ESI-MS m/z = [m+H] <sup>+</sup>	HPLC- R <sub>t</sub> / Gradient	Summen- formel
<b>89</b>	<i>cyclo</i> (-D-Lys-Tyr-Phe-D-Ser-Ile-Asp(-Ile-Trp)-)	1053.4	29.39 min 20 – 40%	C <sub>54</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
<b>90</b>	<i>cyclo</i> (-D-Lys-Tyr-Phe-Ser-Ile-Asp(-Ile-Trp)-)	1053.4	24.39 min 20 – 40%	C <sub>54</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
<b>91</b>	<i>cyclo</i> (-D-Lys-Tyr-Phe-Ser-Ile-D-Asp(-Ile-Trp)-)	1053.4	24.82 min 20 – 40%	C <sub>54</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
<b>92</b>	<i>cyclo</i> (-D-Lys-Tyr-Phe-Ser-Ile-γ-Asp(-)-Ile-Trp)	1053.4	27.14 min 20 – 40%	C <sub>54</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
<b>93</b>	<i>cyclo</i> (-D-Lys-Tyr-Phe-Ser-Ile-γ-D-Asp(-)-Ile-Trp)	1053.4	26.81 min 20 – 40%	C <sub>54</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
<b>94</b>	<i>cyclo</i> (-D-Lys-Tyr-Phe-Pro-Ile-Asp(-Lys-Trp)-)	1078.4	22.92 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>75</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub>
<b>95</b>	<i>cyclo</i> (-D-Lys-Tyr-Phe-Pro-Ile-Asp(-Ile-Trp)-)	1063.5	33.95 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>74</sub> N <sub>10</sub> O <sub>11</sub>
<b>96</b> <b>97</b>	<i>cyclo</i> (-D-Lys-Tyr-Phe-D-Ser-D-Ile-γ-L/D-Asp(-)-Ile-Trp)	1053.4	14.07 min 30 – 60%	C <sub>54</sub> H <sub>72</sub> N <sub>10</sub> O <sub>12</sub>
<b>98</b>	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asp(-Ile-Cys-Trp)-)	1157.3	23.04 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
<b>99</b>	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-D-Asp(-Ile-Cys-Trp)-)	1157.7	23.54 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
<b>100</b>	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-Phe-D-Ser-Asp(-Ile-Cys-Trp)-)	1157.3	23.48 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
<b>101</b>	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-D-Phe-Ser-Asp(-Ile-Cys-Trp)-)	1157.3	21.94 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
<b>102</b>	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-D-Tyr-Phe-Ser-Asp(-Ile-Cys-Trp)-)	1157.3	22.99 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
<b>103</b>	<i>cyclo</i> (-Asn-D-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asp(-Ile-Cys-Trp)-)	1157.3	23.21 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S

<i>Teil5</i>	Sequenz	ESI-MS m/z = [m+H] <sup>+</sup>	HPLC- R <sub>t</sub> / Gradient	Summen- formel
104	<i>cyclo</i> (-D-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asp(-Ile-Cys-Trp)-)	1157.3	24.28 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
105	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-γ-Asp(-)-Ile-Cys-Trp)	1157.7	23.54 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
106	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-γ-D-Asp(-)-Ile-Cys-Trp)	1157.7	25.89 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
107	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-Phe-D-Ser-γ-Asp(-)-Ile-Cys-Trp)	1157.7	24.46 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
108	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-D-Phe-Ser-γ-Asp(-)-Ile-Cys-Trp)	1157.7	26.16 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
109	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-D-Tyr-Phe-Ser-γ-Asp(-)-Ile-Cys-Trp)	1157.7	27.15 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
110	<i>cyclo</i> (-Asn-D-Lys-Tyr-Phe-Ser-γ-Asp(-)-Ile-Cys-Trp)	1157.7	25.85 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
111	<i>cyclo</i> (-D-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-γ-Asp(-)-Ile-Cys-Trp)	1157.7	25.05 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
112	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Glu(-Ile-Cys-Trp)-)	1171.4	25.10 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
113	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-D-Glu(-Ile-Cys-Trp)-)	1171.4	25.86 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
114	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-Phe-D-Ser-Glu(-Ile-Cys-Trp)-)	1171.4	25.02 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
115	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-D-Phe-Ser-Glu(-Ile-Cys-Trp)-)	1171.4	25.12 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
116	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-D-Tyr-Phe-Ser-Glu(-Ile-Cys-Trp)-)	1171.4	25.73 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
117	<i>cyclo</i> (-Asn-D-Lys-Tyr-Phe-Ser-Glu(-Ile-Cys-Trp)-)	1171.4	24.68 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S

<i>Teil6</i>	Sequenz	ESI-MS m/z = [m+H] <sup>+</sup>	HPLC- R <sub>t</sub> / Gradient	Summen- formel
118	<i>cyclo</i> (-D-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Glu(-Ile-Cys-Trp)-)	1171.4	21.83 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
119	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-δ-Glu-)-Ile-Cys-Trp	1171.4	24.00 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
120	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-δ-D-Glu-)-Ile-Cys-Trp	1171.4	25.16 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
121	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-Phe-D-Ser-δ-Glu-)-Ile-Cys-Trp	1171.4	25.23 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
122	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-D-Phe-Ser-δ-Glu-)-Ile-Cys-Trp	1171.4	24.39 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
123	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-D-Tyr-Phe-Ser-δ-Glu-)-Ile-Cys-Trp	1171.4	26.60 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
124	<i>cyclo</i> (-Asn-D-Lys-Tyr-Phe-Ser-δ-Glu-)-Ile-Cys-Trp	1171.4	23.27 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
125	<i>cyclo</i> (-D-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-δ-Glu-)-Ile-Cys-Trp	1171.4	24.05 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
126	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-ζ-L/D-APS-)-Ile-Cys-Trp	1199.6	19.67/ 20.40 min 20 – 50%	C <sub>58</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub> S
128	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-Phe-D-Ser-ζ-L/D-APS-)-Ile-Cys-Trp	1199.6	19.79/ 20.73 min 20 – 50%	C <sub>58</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub> S
130	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-Tyr-D-Phe-Ser-ζ-L/D-APS-)-Ile-Cys-Trp	1199.6	19.51 min 20 – 50%	C <sub>58</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub> S
131				
132	<i>cyclo</i> (-Asn-Lys-D-Tyr-Phe-Ser-ζ-L/D-APS-)-Ile-Cys-Trp	1199.6	19.87/ 21.58 min 20 – 50%	C <sub>58</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub> S
133				

<i>Teil7</i>	Sequenz	ESI-MS m/z = [m+H] <sup>+</sup>	HPLC- R <sub>t</sub> / Gradient	Summen- formel
134 135	<i>cyclo</i> (-Asn-D-Lys-Tyr-Phe-Ser-ζ-L/D-APS-)-Ile-Cys-Trp	1199.6	19.04/ 19.38 min 20 – 50%	C <sub>58</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub> S
136 137	<i>cyclo</i> (-D-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-ζ-L/D-APS-)-Ile-Cys-Trp	1199.6	19.29 min 20 – 40%	C <sub>58</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>14</sub> S
150 151	<i>cyclo</i> (-ε-Lys-Lys-Tyr-Phe-Ser-γ-L/D-Asp-)-Ile-Cys-Trp	1171.6	21.35/ 22.87 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
152 153	<i>cyclo</i> (-ε-Lys-Lys-Tyr-Phe-D-Ser-γ-L/D-Asp-)-Ile-Cys-Trp	1171.6	20.34/ 22.11 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
154 155	<i>cyclo</i> (-ε-Lys-Lys-Tyr-D-Phe-Ser-γ-L/D-Asp-)-Ile-Cys-Trp	1171.6	22.39/ 24.40 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
156 157	<i>cyclo</i> (-ε-Lys-Lys-D-Tyr-Phe-Ser-γ-L/D-Asp-)-Ile-Cys-Trp	1171.6	23.81 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
158 159	<i>cyclo</i> (-ε-Lys-D-Lys-Tyr-Phe-Ser-γ-L/D-Asp-)-Ile-Cys-Trp	1171.6	22.66/ 23.20 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
160 161	<i>cyclo</i> (-ε-D-Lys-Lys-Tyr-Phe-Ser-γ-L/D-Asp-)-Ile-Cys-Trp	1171.6	23.18/ 23.67 min 20 – 40%	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
162 163	<i>cyclo</i> (-δ-Orn-Lys-Tyr-Phe-Ser-γ-L/D-Asp-)-Ile-Cys-Trp	1157.7	22.03/ 23.09 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
164 165	<i>cyclo</i> (-δ-Orn-Lys-Tyr-Phe-D-Ser-γ-L/D-Asp-)-Ile-Cys-Trp	1157.7	21.98/ 22.91 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S



<i>Teil8</i>	Sequenz	ESI-MS m/z = [m+H] <sup>+</sup>	HPLC- R <sub>t</sub> / Gradient	Summen- formel
166 167	<i>cyclo</i> (-δ-Orn-Lys-Tyr-D-Phe-Ser-γ-L/D- Asp-)-Ile-Cys-Trp	1157.7	22.94/ 23.47 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
168 169	<i>cyclo</i> (-δ-Orn-Lys-D-Tyr-Phe-Ser-γ-L/D- Asp-)-Ile-Cys-Trp	1157.7	24.89/ 25.59 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
170 171	<i>cyclo</i> (-δ-Orn-D-Lys-Tyr-Phe-Ser-γ-L/D- Asp-)-Ile-Cys-Trp	1157.7	23.46/ 23.88 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S
172 173	<i>cyclo</i> (-δ-D-Orn-Lys-Tyr-Phe-Ser-γ-L/D- Asp-)-Ile-Cys-Trp	1157.7	22.83 min 20 – 40%	C <sub>57</sub> H <sub>78</sub> N <sub>12</sub> O <sub>13</sub> S

### 5.2.4 Rezeptorliganden

Tabelle 5.3:

	Sequenz	ESI-MS m/z = [m+H] <sup>+</sup>	HPLC- R <sub>t</sub> / Gradient	Summen- formel
<b>Somatostatin-Analoga:</b>				
258	<i>cyclo</i> (-D-Trp-Nle-Thr(Trt)-cβAA-Tyr-)	957.6	29.05 min 10 – 90%	C <sub>58</sub> H <sub>64</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub>
259	<i>cyclo</i> (-D-Trp-Nle-Thr(Trt)-cβAA-D-Tyr-)	957.6	28.73 min 10 – 90%	C <sub>58</sub> H <sub>64</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub>
260	<i>cyclo</i> (-D-Trp-Nle-Thr-cβAA-Tyr-)	715.4	18.71 min 10 – 90%	C <sub>39</sub> H <sub>50</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub>
<b>Integrin-Liganden</b>				
272	<i>cyclo</i> (-Arg-Gly-Asp-cβAA-)	480.4	11.71 min 10 – 60%	C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>
273	<i>cyclo</i> (-Arg-Gly-Asp-ATUA-)	566.5	22.20 min 0 – 80%	C <sub>27</sub> H <sub>47</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>

### 5.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften und spezielle Peptidsynthesen

#### *AAV1: Kupplung der ersten Aminosäure an TCP-Harz*

1 g TCP-Harz (maximale Belegungsdichte ca. 1 mmol/g Harz) werden mit 1.2 eq. Aminosäurederivat und 153  $\mu$ l DIPEA in 10 mL trockenem DCM unter Schütteln gemischt. Nach fünf Minuten werden weitere 356  $\mu$ l DIPEA zugegeben und zwei Stunden geschüttelt. Nach Zugabe von 1 mL MeOH wird weitere 30 min geschüttelt, abfiltriert und nacheinander mit zweimal 10 mL DCM, dreimal 10 mL NMP und dreimal mit 20 mL MeOH (Ultraschall um Klumpen aufzulösen) gewaschen. Anschließend wird im HV getrocknet und der Belegungsgrad gravimetrisch nach folgender Formel bestimmt:

$$n = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 1000}{(MG_{X_{aa}} - 36.461) \cdot m_2}$$

$n$  = Mol Aminosäure am Harz

$m_1$  = Masse des unbelegten TCP-Harzes [g]

$m_2$  = Masse des belegten Harzes [g]

$MG_{X_{aa}}$  = Molgewicht der Aminosäure [g / mol]

#### *AAV2: Fmoc-Entschützung an fester Phase*

Zur Fmoc-Entschützung wird das mit NMP gewaschene Harz zweimal 10 min mit 1 mL/ 0.1 g (Harz) einer Lösung aus NMP und Piperidin (80:20, v/v) geschüttelt und anschließend fünfmal mit NMP gewaschen.

#### *AAV3: Festphasensynthese von Peptiden mit Fmoc<sup>t</sup>Bu-Schutzgruppenstrategie für belegtes TCP-Harz und Sieber-Amid-Harz*

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe (**AAV2**) der harzgebundenen Aminosäure bzw. des Peptids und die Kupplung einer weiteren Fmoc-Aminosäure (AS) erfolgt nach folgendem Schema:

Operation	Reagenzien (10 mL/g Harz)	Zeit [min]	Anzahl	
1	Quellung	NMP	30	1
2	Entschützen	20% Piperidin in NMP	5	1
3	Waschen	NMP	1	1
4	Entschützen	20% Piperidin in NMP	15	1
5	Waschen	NMP	1	5
6	Kuppeln	Fmoc-AS-OH/TBTU/HOBt/DIPEA oder Fmoc-AS-OH/HATU/HOAt/Collidin	60	1
7	Waschen	NMP	1	1
8	Kuppeln	Fmoc-AS-OH/TBTU/HOBt/DIPEA oder Fmoc-AS-OH/HATU/HOAt/Collidin	45	1
9	Waschen	NMP	1	3
10	Waschen	DCM	1	3
11	Trocknen	HV		

Die Schritte 10 und 11 erfolgen nur, wenn die Peptid-Festphasensynthese für mehrere Tage unterbrochen wird.

Je nach Kupplungseffizienz und Verfügbarkeit des Aminosäurederivats werden die Schritte 2-7 bzw. 2-9 für jede zu kuppelnde Aminosäure wiederholt. Die Kupplung der Fmoc-Aminosäure erfolgt entweder nach der TBTU- oder HATU-Methode:

Je 3 eq. geschützter Fmoc-Aminosäure, 3 eq. Kupplungsreagenz, 3 eq. Additiv und 8.4 eq. DIPEA (TBTU) bzw. 20 eq. Collidin (HATU!) werden in Konzentrationen größer 0.3 M in NMP gelöst, zu dem N-terminal entschützten Peptidyl-Harz gegeben, eine Stunde geschüttelt und bei Bedarf (HPLC-Kontrolle) nachgekuppelt.

Bei Aminosäuren, die nur in geringen Mengen vorliegen, kann auch mit nur 1.8 eq. Fmoc-Aminosäure gekuppelt werden (Collidin als Base!). Die Mengen der anderen Reagenzien verringern sich proportional dazu.

Je nach Verwendungszweck wird für die letzte Aminosäure ein N-terminaler Boc-Schutz (**AAV10**) verwendet oder vor dem Abspalten vom Harz die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten (**AAV2**).

**AAV4:** *Abspaltung seitenkettengeschützter Peptide vom TCP-Harz*

Die Abspaltung der geschützten Peptide vom TCP-Harz erfolgt nach folgendem Schema:

	Operation	Reagenzien (10 mL/g Harz)	Zeit[min]	Anzahl
1	Quellung	DCM	10	1
2	Abspalten	DCM / HFIP (4:1, v/v)	15	1
3	Abspalten	DCM / HFIP (4:1, v/v)	15	1
4	Abspalten	DCM / HFIP (4:1, v/v)	15	1

Die vereinigten Filtrate aus den Schritten 2-4 werden am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt (Bad maximal 30 °C) und das zurückbleibende Peptid wird aus <sup>t</sup>BuOH oder Dioxan lyophilisiert. Bei stark säurelabilen Schutzgruppen (z. B. Trt-Ether) wird eine Mischung aus AcOH/ TFE/ DCM (2:1:6, v/v/v) verwendet. Die Abspaltdauer verlängert sich dabei auf eine Stunde.

Anmerkung: Diese Methode wird auch in vereinfachter Form für Probeabspaltungen verwendet (Abspatlösung in verdünnter Form direkt für Analytik verwendbar).

**AAV5:** *Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger Seitenkettenentschützung*

Vor der Abspaltung wird das Harz mit DCM gewaschen (5x).

a) Die Abspaltung vom TCP-Harz und Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen erfolgt bei RT durch Schütteln mit einer Mischung aus TFA/ TIPS/ H<sub>2</sub>O (90:7:3, v/v/v) für 10 min. Das Harz wird mit TFA nachgewaschen und die vereinigten Lösungen für 1 h gerührt (3 h bei Anwesenheit von Pbf-

Schutzgruppen). Nach Abdestillation der TFA im Vakuum wird der Rückstand in wenig TFA aufgenommen und in 30-fachen Überschuß an Diethylether getropft. Der dabei ausfallende Feststoff wird abzentrifugiert und mit Diethylether gewaschen (2x) und im HV getrocknet.

b) Zur Abspaltung des Peptides vom Sieber-Amid-Harz schüttelt man das Harz dreimal mit einer TFA-Lösung (3% v/v in DCM, 1 mL/ 0.1 g Harz) unter Zusatz von 3% Triisopropylsilan (v/v) für 5 min bei RT. Die TFA der vereinigten Lösungen wird im Vakuum abdestilliert und zum Rückstand eine Mischung aus TFA/ H<sub>2</sub>O (95:5, v/v) zugegeben. Diese Lösung wird für 1 h bei RT gerührt. Weitere Aufarbeitung erfolgt wie unter Punkt AAV5 a).

Anmerkung: Diese Methode wird in verkürzter Form auch für Probeabspaltungen benutzt (Abspalllösung in verdünnter Form direkt für Analytik verwendbar).

#### **AAV6:** *Seitenkettenentschützung von cyclischen Peptiden in Lösung*

Die Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen erfolgt durch Lösen von 100 mg Peptids in 20 mL einer Mischung aus TFA/ TIPS/ H<sub>2</sub>O (90:7:3, v/v/v). Nach Rühren der Lösung bei RT für 1 h (3 h bei Anwesenheit von Pbf-Schutzgruppen) und destillativer Entfernung der TFA im Vakuum wird der Rückstand in wenig TFA aufgenommen und in 30-fachen Überschuß an Diethylether getropft. Der dabei ausfallende Feststoff wird abzentrifugiert und mit Diethylether gewaschen (2x) und im HV getrocknet. Reinigung des Peptids erfolgt mittels präparativer HPLC.

#### **AAV7:** *Vollständige Seitenkettenentschützung von Trp bei Verwendung von Fmoc-Trp(Boc)-OH*

Zur Entfernung der *N*-Carboxygruppe des Trp wird das Peptid (aus AAV5/6) in H<sub>2</sub>O gelöst, einige Tropfen AcOH zugegeben und über Nacht gerührt.

Anschließend wird lyophilisiert und das verbleibende Peptid mittels HPLC gereinigt.

**AAV8:** *Peptidcyclisierung in Lösung nach DPPA-Methode*

Das lineare, seitenkettengeschützte Peptid (aus **AAV4**) wird in DMF (ca.  $10^{-3}$  mmol/ l) gelöst und nach Zugabe von 3 eq. DPPA und 5 eq.  $\text{NaHCO}_3$  für 16 h bei RT gerührt. Im Anschluss daran wird das DMF im HV bis auf ein geringes Volumen abdestilliert und die verbleibende Lösung zur Ausfällung in  $\text{H}_2\text{O}$  getropft. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, dreimal mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Seitenkettenschutzgruppen des cyclischen Peptids werden nach **AAV6** abgespalten.

**AAV9:** *Disulfidbrückencyclisierung von seitenkettenentschützter Peptide in Lösung*

Das vom Harz abgespaltene und entschützte Peptid (aus **AAV 5/6**) wird in DMSO (20 mL/ 100 mg Peptid) gelöst, mit  $\text{H}_2\text{O}$  (5%, v/v) und Collidin (2%, v/v) versetzt (pH = 7) und 12-36 h (Reaktionskontrolle durch HPLC) bei RT unter Sauerstoffeinfluss gerührt. Die Suspension wird durch Verdampfen des Lösungsmittels im HV bis auf ein Volumen von wenigen mL DMSO eingengt und mit etwa der gleichen Menge Acetonitril versetzt. Die in der Lösung enthaltenen Peptide werden mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

**AAV10:** *Boc-Schützung bzw. Acetylierung freier Aminogruppen an fester Phase*

Zur Boc-Schützung/ Acetylierung freier Aminogruppen wird das Harz zweimal 15 min mit 1 mL/ 0.1 g (Harz) einer Lösung aus NMP/ Boc-Anhydrid bzw.  $\text{Ac}_2\text{O}$  / Collidin (95:5:5, v/v/v) geschüttelt und anschließend fünfmal mit NMP gewaschen.

**AAV11:** *ivDde- und Dmab-Entschützung am Harz*

Das mit NMP gewaschene, mit Peptid beladene Harz wird zweimal mit Hydrazin-Lösung (2% Monohydrat in NMP, v/v) für 5 min geschüttelt. Bei Abspaltung der Dmab-Schutzgruppe wird im Anschluß das als Carbonsäuresalz gebundene Hydrazin durch Waschen mit einer DIPEA-Lösung (5% in NMP, v/v) verdrängt. Der Basenüberschuss wird zum Schluss mit NMP ausgewaschen (5x).

Anmerkung: Alle Fmoc-Schutzgruppen müssen vor der Dmab/ivDde-Entschützung durch Boc-Schutzgruppen ausgetauscht werden (siehe **5.3.3/5.3.4**).

**AAV12:** *Peptidcyclisierung am Harz*

Nach Fmoc-Entschützung der Aminofunktion (**AAV2**) und Dmab-Entschützung der Carbonsäurefunktion (**AAV11**) wird das Harz mit einer Lösung aus 3 eq. HOAt, 10 eq. Collidin und 0.5 eq. Diisopropylcarbodiimid (DIC) in NMP (1 mL/ 0.1 g Harz) für 16 h bei RT geschüttelt. Man gibt solange 0.3 eq. DIC zur Cyclisierungslösung und schüttelt jeweils 16 h bis laut HPLC- bzw. Massenkontrolle kein lineares Peptid mehr vorhanden ist (Probeabspaltung). Anschließend wird das Harz fünfmal mit NMP und DCM gewaschen und laut **AAV4** vom Harz abgespalten.

**AAV13:** *Fragmentkupplung am Harz*

Nach Fmoc-Entschützung des Peptides am Harz (**AAV2**) wird das Harz mit einer Lösung aus 1.5 eq. seitenkettengeschütztem Peptid (freier C-Terminus, aus **AAV12**), 4 eq. HOAt, 1.7 eq. DIC und 10 eq. Collidin in DMF (1 mL/ 0.1 g Harz) für 16 h bei RT geschüttelt. Nach fünfmaligem Waschen mit NMP wird das Peptid vom Harz abgespalten (**AAV5**), vollständig entschützt (**AAV7**) und mit Hilfe von präparativer HPLC gereinigt.

**AAV14:** *Teilentschützung und Cystein-Brücken-Cyclisierung von C-terminal verlängertem cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>, Peptide 20-23*

Nach Kupplung der Peptidsequenz (**AAV3**) wird die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe nicht abgespalten. Die Abspaltung vom TCP-Harz und Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen erfolgt nach **AAV5**. Anschließend wird das Peptid in DMSO/ H<sub>2</sub>O/ Collidin (92:6.5:1.5 v/v/v; 0.2 ml/ mg Peptid) gelöst und bei RT mehrere Tage unter Sauerstoffeinfluss bis zum Verschwinden des Edukts (Überprüfung mittels HPLC) gerührt. Zur Fällung des cyclischen Peptids wird die Reaktionslösung in mit HCl angesäuerte, wässrige 3 M NaCl-Lösung (pH = 2) eingetropft. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, mit 0.01 M HCl-Lösung gewaschen (2x) und im HV getrocknet. Ausbeuten liegen im Bereich von 65 – 80% im Bezug auf die Belegungsdichte des mit einer Aminosäure belegten Harzes.

**AAV15:** *Dimerisierung von teilentschütztem, C-terminal verlängertem cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>, Peptide 28-31*

0.025 mmol teilentschütztes Peptid aus **AAV14** und 10.2 mg HOAt (0.075 mmol) werden in 0.25 ml DMF gelöst und unter Zugabe von 32 µL Collidin (0.24 mmol) und 3.8 µL Diisopropylcarbodiimid (DIC) (0.025 mmol) bei RT für 30 min gerührt. Nach Zugabe von 1.7 µL 2,2'-(Ethylendioxy)-diethylamin (0.013 mmol) wird über Nacht bei RT gerührt. Mittels HPLC-Kontrolle wird die Reaktion auf vollständigen Verbrauch des Edukts hin überprüft. Ansonsten kann durch weitere Zugabe von DIC (1.0 µL) und längere Rührdauer die Reaktion vervollständigt werden. Das Lösungsmittel wird im HV am Rotationsverdampfer abdestilliert. Entschützung und Isolierung erfolgt nach **AAV16**.



**AAV16: Fmoc- und ivDde-Entschützung in Lösung, Peptide 24-27**

Zur Entschützung der Peptide aus **AAV15/ 5.3.1** werden 50 mg Peptid in 3 mL Piperidin-Lösung (20% in DMF, v/v) gelöst, für 20 min bei RT gerührt und die Lösungsmittel im HV am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird zweimal in 3 mL Hydrazin-Lösung (2% Monohydrat in DMF, v/v) gelöst, für 5 min bei RT gerührt und im HV abdestilliert. Zum Schluss wird das Peptid in 0.5 mL DMF aufgenommen und in Ether gefällt, abzentrifugiert und dreimal mit Ether gewaschen. Reinigung erfolgt über präparative RP-HPLC.

**5.3.1 Kupplung von *cyclo(-RGDfK-)* an verlängerten C-Terminus von halbgeschütztem *cyclo[21,29][D-Cys<sup>21</sup>,Cys<sup>29</sup>]-uPA<sub>21-30</sub>*, Peptid 35**

50 mg Peptid **22** (0.025 mmol) und 10 mg HOAt (0.078 mmol) werden in 0.25 mL trockenem DMF gelöst und mit 3.8 µL Diisopropylcarbodiimid (DIC) (0.024 mmol) versetzt. Zur Voraktivierung gibt man 32 µL Collidin (0.24 mmol) zu und lässt die Lösung 30 min bei RT stehen. Nach der Zugabe von 22 mg *cyclo(-R(Pbf)GD(<sup>t</sup>Bu)fK-)* (**33**) (0.024 mmol) wird 16 h bei RT gerührt. Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels im HV wird der Rückstand aus <sup>t</sup>BuOH lyophilisiert. Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen erfolgt nach **AAV6**, Abspaltung der Fmoc- bzw. ivDde-Schutzgruppe nach **AAV16**. Reinigung erfolgt durch präparative HPLC.

**5.3.2 Selektive Cystein-Entschützung und anschließende Disulfidbrückencyclisierung von Peptid 17**

Die Kupplung des Peptids erfolgt nach **AAV3** unter Verwendung von Fmoc-Cys(Mmt)-OH und Boc-D-Cys(Mmt)-OH **19**, Abspaltung vom Harz erfolgt nach **AAV4**. 200 mg Peptid werden in 20 mL DCM gelöst und unter Rühren bei RT mit 1 mL TIPS und 0.13 mL TFA versetzt (entspricht 6%, v/v). Die zuerst orange Lösung entfärbt sich innerhalb 4 h. Danach wird die Reaktion mit 5 mL MeOH abgebrochen und für 30 min nachgerührt, die Lösungsmittel im

Vakuum abdestilliert und der Rückstand in Ether gefällt. Der ausfallende Niederschlag wird abzentrifugiert und dreimal mit Ether gewaschen. Die Disulfidbrückencyclisierung und Reinigung erfolgt nach **AAV9**.

### **5.3.3 Kupplung von FITC an Lys<sup>20</sup>-Seitenketten, Peptid 38**

Nach Kupplung des Peptids nach **AAV3** wird zuletzt N-terminal geschütztes Boc-Lys(Fmoc)-OH nach Standardbedingungen gekuppelt und die Fmoc-Schutzgruppe in der Lys-Seitenkette nach **AAV2** entfernt. Zur Kupplung werden 39 mg Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (0.05 mmol) in 2 mL NMP gelöst und mit 60  $\mu$ L Collidin (0.45 mmol) versetzt. Diese Lösung gibt man zum mit NMP gewaschenen Harz (100 mg, Belegung ca. 0.5 mmol/g) und schüttelt 1 h bei RT. Überschüssige Reagenzien werden mit NMP ausgewaschen (5x). Entschützung und Abspaltung vom Harz erfolgt nach **AAV5**, Disulfidbrückencyclisierung nach **AAV9** und die Reinigung des Peptids über präparative RP-HPLC.

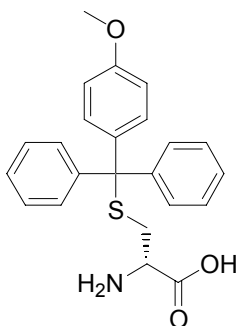
### **5.3.4 Kupplung von Naphthoyl bzw. DOTA an Lys<sup>20</sup>-Seitenketten, Peptide 36, 37, 39**

Nach Kupplung des Peptids nach **AAV3** wird zuletzt N-terminal geschütztes Boc-Lys(Fmoc)-OH nach Standardbedingungen gekuppelt und die Fmoc-Schutzgruppe in der Lys-Seitenkette nach **AAV2** entfernt. Zur Kupplung werden 42 mg 2-Naphthoesäure (0.24 mmol, 3 eq.) bzw. 137 mg Tris-<sup>t</sup>Butyl-DOTA (0.24 mmol, 3 eq.), 77 mg TBTU (0.24 mmol) und 37 mg HOBt (0.24 mmol) in 2 mL NMP gelöst und mit 113  $\mu$ L DIPEA (0.66 mmol) versetzt. Diese Lösung gibt man zum mit NMP gewaschenen Harz (200 mg, Belegung ca. 0.5 mmol/g) und schüttelt 1 h bei RT. Überschüssige Reagenzien werden mit NMP ausgewaschen (5x). Entschützung und Abspaltung vom Harz erfolgt nach **AAV5**, Disulfidbrückencyclisierung nach **AAV9** und die Reinigung des Peptids über präparative RP-HPLC.

Hinweis: Statt der Kupplung von DOTA u.ä. kann auch eine weitere Peptidsequenz nach **AAV3** an der Lysin-Seitenkette angebracht werden (Peptid 37).

## 5.4 Synthesen der Aminosäurederivate und Schutzgruppen

### 5.4.1 Synthese von [2*S*]-2-Amino-3-[(4-methoxy-phenyl)-diphenyl-methylsulfanyl]-propionsäure (18), D-Cys(Mmt)-OH



C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>S  
Exact Mass: 393,14  
Mol. Wt.: 393,50

Eine Lösung aus 5.14 g D-Cystein (29.4 mmol) und 9.07 g 4-Methoxytritylchlorid (29.4 mmol) in 35 mL DMF werden für 4 h bei RT gerührt (pH 1.5). Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels werden 50 mL H<sub>2</sub>O zugegeben und der pH-Wert mit Hilfe von 2N NaOH-Lösung auf 5 eingestellt. Die dabei ausfallenden Kristalle werden abfiltriert, mit H<sub>2</sub>O und Ether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhält 10.5 g (26.7 mmol, 92% d. Th.) der Titelsubstanz als weißen Feststoff.

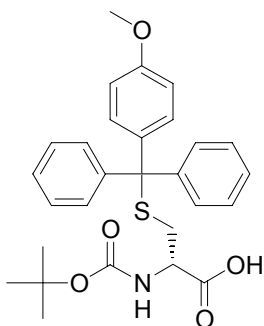
**Smp.** 162-163 °C (Zersetzung),

**HPLC** (10 – 90%): 18.43 min,

**ESI-MS** m/z = 394.1 [m+H]<sup>+</sup>.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO, 250 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 7.40\text{-}7.20$  (m, 12 H, Aromat); 6.88 (d, 2H,  $J = 7.5$  Hz, Aromat); 3.73 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-O}$ ); 2.96 (m, 1H,  $\text{H}_\alpha$ ); 2.58/ 2.38 (2x m, 2H,  $\text{H}_\beta$ ).

#### 5.4.2 Synthese von [2*S*]-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-3-[(4-methoxyphenyl)-diphenyl-methylsulfanyl]-propionsäure (19), N-Boc-D-Cys(Mmt)-OH



$\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{NO}_5\text{S}$   
Exact Mass: 493,19  
Mol. Wt.: 493,62

5 g [2*S*]-2-Amino-3-[(4-methoxyphenyl)-diphenyl-methylsulfanyl]-propionsäure (19) (12.7 mmol) und 3.0 g  $\text{NaHCO}_3$  (35.7 mmol) werden in 34 mL THF und 30 mL  $\text{H}_2\text{O}$  suspendiert. Anschließend gibt man 4.19 g Di-*tert*-butyldicarbonat (19.2 mmol) gelöst in 20 mL THF innerhalb einer Stunde bei RT zu und rührt 2 h nach. Nach Zugabe von 60 mL  $\text{H}_2\text{O}$  wird das THF im Vakuum abdestilliert und die wässrige Phase mit EE extrahiert (2x). Das im EE gelöste Produkt wird mit Wasser aus der organischen Phase herausgewaschen (3x) und durch Zugabe von gesättigtem Acetat-Puffer ausgefällt. Nach Extraktion mit EE (2x), Trocknung über  $\text{MgSO}_4$  und Abdestillieren des Lösungsmittels im Vakuum erhält man 4.17 g (8.5 mmol, 67% d. Th.) der Titelsubstanz als weißen Feststoff.

**Smp.** 63-65 °C (Zersetzung),

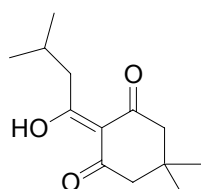
**DC** (CHCl<sub>3</sub>/ MeOH/ AcOH 90:8:2): R<sub>f</sub> = 0.59,

**HPLC** (10 – 90%): 27.06 min,

**ESI-MS** m/z = 516.1 [m+Na]<sup>+</sup>; 1009.2 [2m+Na]<sup>+</sup>; 1031.2 [2m-H+2Na]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz): δ(ppm) = 7.40-7.10 (m, 12 H, Aromat); 6.79 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Aromat); 4.93 (m, 1H, NH); 4.02 (m, 1H, H<sub>α</sub>); 3.77 (s, 3H, Methyl-O); 2.65 (m, 2H, H<sub>β</sub>); 1.41 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu).

### 5.4.3 Synthese von 2-(1-Hydroxy-3-methyl-butylidene)-5,5-dimethyl-cyclohexan-1,3-dione (**185**), 2-(3-Methylbutyryl)-dimedon



C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>  
Exact Mass: 224,14  
Mol. Wt.: 224,30

24.8 g Dimedon (**184**) (0.177 mol), 33.45 g N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (0.162 mol) und 16.45 Isovaleriansäure (**183**) (0.161 mol) werden in 1.0 L DMF gelöst und mit 19.7 g Dimethylaminopyridin (0.161 mol) versetzt. Nach einer Rührdauer von 3 Stunden trübte sich die Lösung durch Ausfallen von Dicyclohexylharnstoff. Man lässt weitere 2 Tage bei Raumtemperatur nachrühren. Anschließend wird der Niederschlag abgesaugt und gut mit DMF nachgewaschen. Nach destillativer Entfernung des Lösungsmittels im HV bleibt ein oranges Öl übrig, das mit 150 ml Ethylacetat versetzt wird. Der sich bildende Niederschlag wird erneut durch Filtration entfernt. Die organische Phase wird sofort mit 1 mol KHSO<sub>4</sub>-Lösung gewaschen, bis die wässrige Phase nicht mehr gelb gefärbt ist. Die Produktlösung wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet

und das Lösungsmittel verdampft. Nach Flashchromatographie (EE) erhält man 29.2 g (0.13 mol, 81% d. Th.) der Titelverbindung als farbloses Öl.

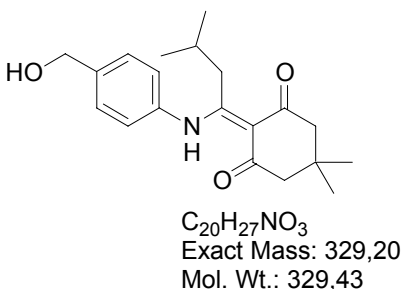
**DC (EE):** Rf = 0.9,

**HPLC (10 – 90%):** 27.39 min,

**ESI-MS** m/z = 225.1 [m+H]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz): δ(ppm) = 2.83 (d, 2H, J = 6.7 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.48/ 2.29 (2x s, 4H, CH<sub>2</sub>-Dimedon); 2.2-2.0 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.01 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>-Dimedon); 0.90 (d, 6H, J = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 62.5 MHz): δ(ppm) = 204.9; 198.2; 195.0; 112.2; 52.7; 48.5; 47.5; 30.5; 28.1; 25.6; 22.6.

#### 5.4.4 Synthese von 4-{N-[1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl]amino}-benzylalkohol (187), Dmab-OH



3.20 g 2-(3-Methylbutyryl)-dimedon (**185**) (14.3 mmol) und 2.11 g 4-Aminobenzylalkohol (**186**) (17.2 mmol) werden in 30 ml THF für 20 Stunden refluxiert. Das Lösungsmittel wird abrotiert und der Rückstand wird in Chloroform aufgenommen. Die organische Phase wird mit Acetat-Puffer (pH 4) (3x) und dann mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (2x) ausgeschüttelt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und einrotiert. Nach Flashchromatographie (EE/ Hex 1:1) und Lyophilisieren erhält man 3.37 g (10.2 mol, 72% d. Th.) der Titelverbindung als gelbliches Pulver.

**Smp.** 153 °C,

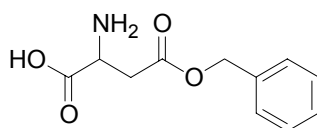
**DC (EE):** R<sub>f</sub> = 0.73,

**HPLC** (10 – 90%): 21.05 min,

**ESI-MS** m/z = 330.3 [m+H]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz): δ(ppm) = 15.15 (s, 1H, NH); 7.39/ 7.05 (2x d, 4H, J = 7.7 Hz, Aromat); 4.70 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>); 2.94 (d, 2H, J = 6.7 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.45/ 2.35 (2x s, 4H, CH<sub>2</sub>-Dimedon); 1.70-1.87 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.03 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>-Dimedon); 0.72 (d, 6H, J = 6.3 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 62.5 MHz): δ(ppm) = 200.1; 196.5; 176.6; 140.9 (Aromat<sub>q</sub>); 135.8 (Aromat<sub>q</sub>); 127.6 (Aromat); 126.4 (Aromat); 107.6; 64.2 (Benzyl-CH<sub>2</sub>); 53.6/ 52.2 (2x CH<sub>2</sub>); 38.3 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 30.0 (C<sub>q</sub>); 29.4 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 28.2 (2x CH<sub>3</sub>); 22.5 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### 5.4.5 Synthese von *rac*-Asparaginsäure-4-benzylester (206)



C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>  
Exact Mass: 223,08  
Mol. Wt.: 223,23

7.2 g *rac*-Asparaginsäure (174) (54.1 mmol) und 8.0 g wasserfreies Natriumsulfat (wasserfrei) werden in 60 mL Benzylalkohol suspendiert. Zu dieser Mischung werden mit Hilfe einer Spritze 15 mL Tetrafluorborsäureetherat (54%ig, 109 mmol) zugegeben. Anschließend wird unter Luftausschluss über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 200 mL absolutem THF wird die Reaktionsmischung mit Hilfe von Kieselgur filtriert und langsam mit 16.4 mL Triethylamin (118 mmol) in 20 mL absolutem THF versetzt, worauf sich ein feiner Niederschlag bildet (pH 4).

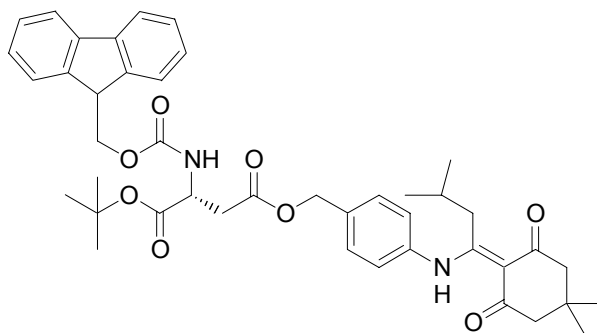
THF wird im Vakuum bis max. 50-60 °C abdestilliert. Der Rückstand wird in 200 mL Ethylacetat aufgeschlämmt, 10 min bei 60 °C gerührt, durch eine sehr feine Fritte abfiltriert und mit Ethylacetat gewaschen. Nach Trocknung im HV erhält man 6.0 g (26.9 mmol, 50% d. Th.) der Titelverbindung als weiße Kristalle, die bei starker Verunreinigung aus Wasser (90 °C) umkristallisiert werden können.

**Smp.** 214-216 °C (H<sub>2</sub>O),

**DC** (MeOH/ CHCl<sub>3</sub>/ H<sub>2</sub>O 50:50:15): R<sub>f</sub> = 0.70, Anfärben mit Ninhydrin.

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O/ 37% HCl, 250 MHz): δ(ppm) = 7.28 (s, 5H, Aromat); 5.07 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>); 4.27 (t, 1H, J = 5.3 Hz, H<sub>α</sub>); 3.02 (m, 2H, H<sub>β</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O/ 37% HCl, 62.5 MHz): δ(ppm) = 171.9; 171.3; 136.0; 129.8; 129.4; 68.9 (Benzyl-CH<sub>2</sub>); 50.1 (C<sub>α</sub>); 34.9 (C<sub>β</sub>).

#### 5.4.6 Synthese von [2R]-2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-butandisäure-1-tert-butylester-4-{4-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylen)-3-methyl-butylamino]-benzylester} (194), N-Fmoc-D-asparaginsäure-1-tert-butylester-4-Dmab-ester



C<sub>43</sub>H<sub>50</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>  
 Exact Mass: 722,36  
 Mol. Wt.: 722,87

1.0 g N-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-D-asparaginsäure-1-tert-butylester (**188**) (2.4 mmol), 0.64 g Dmab-OH (**187**) (1.95 mmol), 0.40 g 1-Hydroxybenzotriazol-hydrat (2.6 mmol) und 0.93 g N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-



ethyl-carbodiimid-hydrochlorid (4.9 mmol) werden in 8 mL trockenem THF gelöst und nach Zugabe von 0.75 mL Collidin (5.65 mmol) für 16 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wird das THF im Vakuum destillativ entfernt, der Rückstand in Chloroform gelöst und die organische Phase mit Acetatpuffer (3x) und mit NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (3x) gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über MgSO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Man erhält 1.3 g (1.8 mmol, 90% d. Th.) der Titelsubstanz als gelblichen Feststoff nach Aufreinigung durch Flashchromatographie (EE/ Hex 1:2).

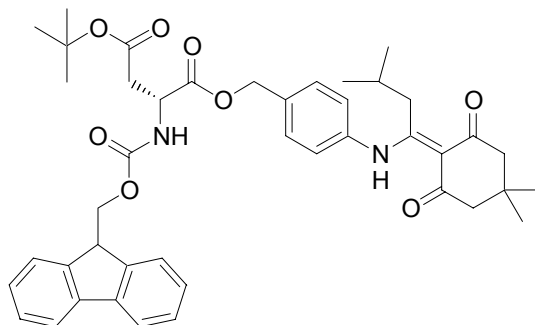
**DC** (EE/ Hex 1:1): R<sub>f</sub> = 0.8,

**HPLC** (10 – 90%): 33.60 min,

**ESI-MS** m/z = 723.1 [m+H]<sup>+</sup>; 745.2 [m+Na]<sup>+</sup>; 1467.0 [2m+Na]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 15.3 (s, 1H, Dmab-NH); 7.76 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc-Aromat); 7.60 (d, 2H, J = 7.6 Hz, Fmoc-Aromat); 7.40 (t, 2H, J = 7.6 Hz, Fmoc-Aromat); 7.40 (d, 2H, J = 9.0 Hz, Dmab-Aromat); 7.31 (t, 2H, J = 7.6 Hz, Fmoc-Aromat); 7.12 (d, 2H, J = 9.0 Hz, Dmab-Aromat); 5.76 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Fmoc-NH); 5.21/ 5.14 (2x d, 2H, J = 13 Hz, Benzyl-CH<sub>2</sub>); 4.53-4.59 (m, 1H, H<sub>α</sub>); 4.43/ 4.35 (2x dd, 2H, J = 7.2/11 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.23 (t, 1H, J = 7.2 Hz, Fmoc-CH); 2.97-3.02 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.94/ 3.05 (2x dd, 2H, J = 4.6/16.9 Hz, H<sub>β</sub>); 2.50/ 2.41 (2x s, 4H, 2x CH<sub>2</sub>); 1.79-1.89 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.45 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu); 1.09 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>); 0.78 (d, 6H, J = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ(ppm) = 200.2 (Dmab); 196.3 (Dmab); 176.4 (Dmab); 170.6 (CO); 169.5 (CO); 156.0 (Fmoc-CO); 143.7 (Fmoc-Aromat<sub>q</sub>); 141.3 (Fmoc-Aromat<sub>q</sub>); 137.0 (Dmab-Aromat<sub>q</sub>); 134.9 (Dmab-Aromat<sub>q</sub>); 129.0 (Dmab-Aromat); 127.7 (Fmoc-Aromat); 127.1 (Fmoc-Aromat); 126.7 (Dmab-Aromat); 125.1 (Fmoc-Aromat); 120.0 (Fmoc-Aromat); 107.8 (Dmab); 82.8 (<sup>t</sup>Bu<sub>q</sub>); 67.2 (Fmoc-CH<sub>2</sub>); 66.1 (Benzyl-CH<sub>2</sub>); 53.8/ 52.3 (2x CH<sub>2</sub>); 51.0 (H<sub>α</sub>); 47.1 (Fmoc-CH); 38.3 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 37.2 (H<sub>β</sub>); 30.0 (Dmab-C<sub>q</sub>); 29.5 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 28.3 (2x CH<sub>3</sub>); 28.0 (<sup>t</sup>Bu); 22.6 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**5.4.7 Synthese von [2*R*]-2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-butandisäure-4-*tert*-butylester-1-{4-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexyliden)-3-methyl-butylamino]-benzylester (195), N-Fmoc-D-asparaginsäure-4-*tert*-butyl-ester-1-Dmab-ester**



$C_{43}H_{50}N_2O_8$   
Exact Mass: 722,36  
Mol. Wt.: 722,87

2.0 g N-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-D-asparaginsäure-4-*tert*-butylester (**189**) (4.9 mmol), 1.28 g Dmab-OH (**187**) (3.9 mmol), 0.80 g 1-Hydroxybenzotriazol-hydrat (5.2 mmol) und 1.86 g N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid (9.7 mmol) werden in 15 mL trockenem THF gelöst und nach Zugabe von 1.5 mL Collidin (11.3 mmol) für 16 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wird das THF im Vakuum destillativ entfernt, der Rückstand in Chloroform gelöst und die organische Phase mit Acetatpuffer (3x) und mit NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (3x) gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über MgSO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Man erhält 2.6 g (3.6 mmol, 92% d. Th.) der Titelsubstanz als gelblichen Feststoff nach Aufreinigung durch Flashchromatographie (EE/ Hex 1:2).

**Smp.** 147-149 °C,

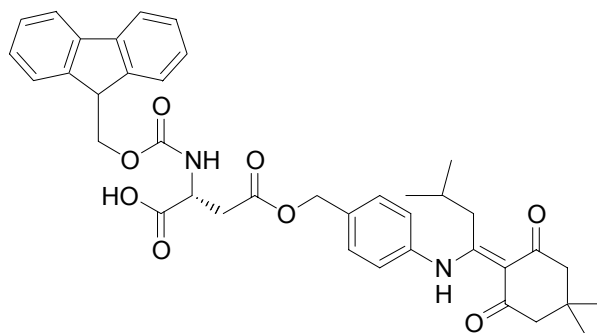
**DC** (EE/ Hex 1:1): R<sub>f</sub> = 0.8,

**HPLC** (10-90%): 33.75 min,

**ESI-MS** m/z = 723.1 [m+H]<sup>+</sup>; 745.1 [m+Na]<sup>+</sup>; 1467.0 [2m+Na]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 15.3 (s, 1H, Dmab-NH); 7.76 (d, 2H, J = 7.6 Hz, Fmoc-Aromat); 7.60 (d, 2H, J = 7.6 Hz, Fmoc-Aromat); 7.40 (t, 2H, J = 7.6 Hz, Fmoc-Aromat); 7.39 (d, 2H, J = 8.3 Hz, Dmab-Aromat); 7.31 (t, 2H, J = 7.6 Hz, Fmoc-Aromat); 7.10 (d, 2H, J = 8.3 Hz, Dmab-Aromat); 5.83 (d, 1H, J = 8.5 Hz, Fmoc-NH); 5.27/ 5.21 (2x d, 2H, J = 12.5 Hz, Benzyl-CH<sub>2</sub>); 4.65-4.70 (m, 1H, H<sub>α</sub>); 4.42/ 4.36 (2x dd, 2H, J = 7.5/11 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.24 (t, 1H, J = 7.5 Hz, Fmoc-CH); 2.97-3.02 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.80/ 3.00 (2x dd, 2H, J = 4.5/17.4 Hz, H<sub>β</sub>); 2.51/ 2.41 (2x s, 4H, 2x CH<sub>2</sub>); 1.78-1.88 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.44 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu); 1.09 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>); 0.78 (d, 6H, J = 7 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ(ppm) = 200.2 (Dmab); 196.3 (Dmab); 176.4 (Dmab); 170.8 (CO); 170.0 (CO); 156.0 (Fmoc-CO); 143.7 (Fmoc-Aromat<sub>q</sub>); 141.3 (Fmoc-Aromat<sub>q</sub>); 137.0 (Dmab-Aromat<sub>q</sub>); 134.9 (Dmab-Aromat<sub>q</sub>); 129.0 (Dmab-Aromat); 127.7 (Fmoc-Aromat); 127.1 (Fmoc-Aromat); 126.7 (Dmab-Aromat); 125.1 (Fmoc-Aromat); 120.0 (Fmoc-Aromat); 107.8 (Dmab); 82.0 (<sup>t</sup>Bu<sub>q</sub>); 67.3 (Fmoc-CH<sub>2</sub>); 66.5 (Benzyl-CH<sub>2</sub>); 53.8/ 52.3 (2x CH<sub>2</sub>); 50.6 (H<sub>α</sub>); 47.1 (Fmoc-CH); 38.3 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 37.7 (H<sub>β</sub>); 30.0 (Dmab-C<sub>q</sub>); 29.5 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 28.3 (2x CH<sub>3</sub>); 28.0 (<sup>t</sup>Bu); 22.6 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**5.4.8 Synthese von [2R]-2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-butandisäure 4-{4-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylden)-3-methyl-butylamino]-benzyl}-ester (200), N-Fmoc-D-asparaginsäure-4-Dmab-ester**



C<sub>39</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>  
 Exact Mass: 666,29  
 Mol. Wt.: 666,76

1.2 g N-Fmoc-D-asparaginsäure-1-*tert*-butylester-4-Dmab-ester (**194**) (1.7 mmol) werden in 10 mL DCM und 10 mL TFA gelöst und für 2 h bei RT gerührt. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in EE gelöst, mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen (2x) und die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Rohprodukt mittels Flashchromatographie (EE/ Hex 1:1, 1% AcOH) gereinigt. Man erhält 1.16 g (1.7 mmol, 100% d. Th.) der Titelsubstanz als weißen Feststoff.

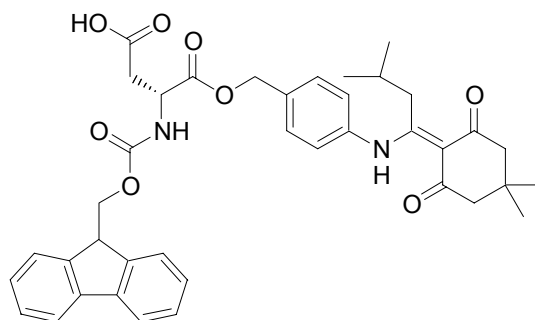
**Smp.** 143-145 °C,

**HPLC** (10 – 90%): 27.92 min,

**ESI-MS** m/z = 667.1 [m+H]<sup>+</sup>; 689.1 [m+Na]<sup>+</sup>; 1332.9 [2m+Na]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 15.3 (s, 1H, Dmab-NH); 7.76 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc-Aromat); 7.58 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc-Aromat); 7.47 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Dmab-Aromat); 7.42 (t, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc-Aromat); 7.31 (t, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc-Aromat); 7.19 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Dmab-Aromat); 6.00 (d, 1H, J = 8.2 Hz, Fmoc-NH); 5.23 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>); 4.79-4.87 (m, 1H, H<sub>α</sub>); 4.44/ 4.55 (2x dd, 2H, J = 6.9/10.8 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.23 (t, 1H, J = 6.6 Hz, Fmoc-CH); 3.01 (d, 2H, 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.02/ 3.20 (2x dd, 2H, J = 4.8/17.6 Hz, H<sub>β</sub>); 2.60 (s, 4H, 2x CH<sub>2</sub>); 1.78-1.89 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.12 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>); 0.78 (d, 6H, J = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ(ppm) = 200.2 (Dmab); 196.4 (Dmab); 176.4 (Dmab); 173.5 (CO); 170.4 (CO); 156.0 (Fmoc-CO); 143.5 (Fmoc-Aromat<sub>q</sub>); 141.2 (Fmoc-Aromat<sub>q</sub>); 136.8 (Dmab-Aromat<sub>q</sub>); 134.7 (Dmab-Aromat<sub>q</sub>); 128.9 (Dmab-Aromat); 127.7 (Fmoc-Aromat); 127.0 (Fmoc-Aromat); 126.5 (Dmab-Aromat); 125.0 (Fmoc-Aromat); 120.0 (Fmoc-Aromat); 107.8 (Dmab); 67.4 (Fmoc-CH<sub>2</sub>); 66.0 (Benzyl-CH<sub>2</sub>); 53.7/ 52.2 (2x CH<sub>2</sub>); 50.5 (H<sub>α</sub>); 46.9 (Fmoc-CH); 38.3 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 36.6 (H<sub>β</sub>); 30.0 (Dmab-C<sub>q</sub>); 29.5 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 28.2 (2x CH<sub>3</sub>); 22.5 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**5.4.9 Synthese von [2*R*]-2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-butandisäure 1-{4-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylen)-3-methyl-butylamino]-benzyl}-ester (201), N-Fmoc-D-asparaginsäure-1-Dmab-ester**



$C_{39}H_{42}N_2O_8$   
Exact Mass: 666,29  
Mol. Wt.: 666,76

1.3 g N-Fmoc-D-asparaginsäure-4-*tert*-butyl-ester-1-Dmab-ester (**195**) (1.8 mmol) werden in 10 mL DCM und 10 mL TFA gelöst und für 2 h bei RT gerührt. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in EE gelöst, mit  $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen (2x) und die organische Phase über  $MgSO_4$  getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Rohprodukt mittels Flashchromatographie (EE/ Hex 1:1, 1% AcOH) gereinigt. Man erhält 1.33 g (1.8 mmol, 100% d. Th.) der Titelsubstanz als weißen Feststoff.

**Smp.** 107-112 °C,

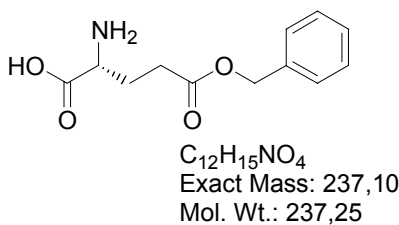
**HPLC** (10 – 90%): 28.07 min,

**ESI-MS**  $m/z = 667.1 [m+H]^+$ ;  $689.1 [m+Na]^+$ ;  $1332.9 [2m+H]^+$ .

**$^1H$ -NMR** ( $CDCl_3$ , 500 MHz):  $\delta$ (ppm) = 15.3 (s, 1H, Dmab-NH); 7.77 (d, 2H, J = 7.7 Hz, Fmoc-Aromat); 7.57 (d, 2H, J = 7.7 Hz, Fmoc-Aromat); 7.44 (d, 2H, J = 8.3 Hz, Dmab-Aromat); 7.41 (t, 2H, J = 7.7 Hz, Fmoc-Aromat); 7.31 (t, 2H, J = 7.7 Hz, Fmoc-Aromat); 7.14 (d, 2H, J = 8.3 Hz, Dmab-Aromat); 5.91 (d,

1H, J = 8.3 Hz, Fmoc-NH); 5.22-5.30 (m, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>); 4.74-4.81 (m, 1H, H<sub>α</sub>); 4.47 (d, 2H, J = 6.6 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.22 (t, 1H, J = 6.5 Hz, Fmoc-CH); 3.00 (d, 2H, 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.01/ 3.15 (2x dd, 2H, J = 4.2/17.2 Hz, H<sub>β</sub>); 2.57 (s, 4H, 2x CH<sub>2</sub>); 1.77-1.88 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.12 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>); 0.77 (d, 6H, J = 6.4 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ(ppm) = 200.2 (Dmab); 196.7 (Dmab); 176.6 (Dmab); 173.2 (CO); 170.7 (CO); 156.3 (Fmoc-CO); 143.6 (Fmoc-Aromat<sub>q</sub>); 141.2 (Fmoc-Aromat<sub>q</sub>); 136.9 (Dmab-Aromat<sub>q</sub>); 134.8 (Dmab-Aromat<sub>q</sub>); 128.9 (Dmab-Aromat); 127.8 (Fmoc-Aromat); 127.1 (Fmoc-Aromat); 126.6 (Dmab-Aromat); 125.1 (Fmoc-Aromat); 120.0 (Fmoc-Aromat); 107.8 (Dmab); 67.5 (Fmoc-CH<sub>2</sub>); 66.6 (Benzyl-CH<sub>2</sub>); 53.6/ 52.2 (2x CH<sub>2</sub>); 50.6 (H<sub>α</sub>); 47.0 (Fmoc-CH); 38.4 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 36.8 (H<sub>β</sub>); 30.0 (Dmab-C<sub>q</sub>); 29.5 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 28.2 (2x CH<sub>3</sub>); 22.5 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### 5.4.10 Synthese von D-Glutaminsäure-5-benzylester (207)



4.0 g D-Glutaminsäure (**175**) (27.2 mmol) und 4.0 g wasserfreies Natriumsulfat (wasserfrei) werden in 50 mL Benzylalkohol suspendiert. Zu dieser Mischung werden mit Hilfe einer Spritze 7.4 mL Tetrafluorborsäureetherat (54%ig, 54.4 mmol) zugegeben. Anschließend wird unter Luftausschluss über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 150 mL absolutem THF wird die Reaktionsmischung mit Hilfe von Kieselgur filtriert und langsam mit 8.2 mL Triethylamin (59.2 mmol) in 20 mL absolutem THF versetzt, worauf sich ein feiner Niederschlag bildet (pH 4). THF wird im Vakuum bis max. 50-60 °C abdestilliert. Der Rückstand wird in 200 mL Ethylacetat aufgeschlämmt, 10

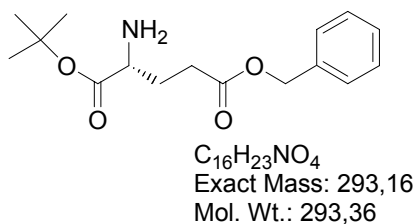
min bei 60 °C gerührt, durch eine sehr feine Fritte abfiltriert und mit Ethylacetat gewaschen. Nach Trocknung im HV erhält man 5.8 g (24.5 mmol, 90% d. Th.) der Titelverbindung als weiße Kristalle, die bei starker Verunreinigung aus Wasser (90 °C) umkristallisiert werden können.

**Smp.** 174-175 °C (Ethylacetat),

**DC** (MeOH/ CHCl<sub>3</sub>/ H<sub>2</sub>O 50:50:15): R<sub>f</sub> = 0.77, Anfärben mit Ninhydrin.

**<sup>1</sup>H-NMR** (D<sub>2</sub>O/ 37% HCl, 250 MHz): δ(ppm) = 7.43 (s, 5H, Aromat); 5.17 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>); 4.12 (t, 1H, J = 6.0 Hz, H<sub>α</sub>); 2.67 (t, 2H, J = 7.2 Hz, H<sub>γ</sub>); 2.12-2.48 (m, 2H, H<sub>β</sub>). **<sup>1</sup>H-NMR** (D<sub>2</sub>O/ NaHCO<sub>3</sub>, 250 MHz): δ(ppm) = 7.45 (s, 5H, Aromat); 5.18 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>); 3.70 (t, 1H, J = 6.0 Hz, H<sub>α</sub>); 2.59 (t, 2H, J = 7.3 Hz, H<sub>γ</sub>); 1.98-2.24 (m, 2H, H<sub>β</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (D<sub>2</sub>O/ 37% HCl, 62.5 MHz): δ(ppm) = 174.7; 172.0; 136.1; 129.5; 129.0; 67.9 (Benzyl-CH<sub>2</sub>); 52.6 (C<sub>α</sub>); 30.1 (C<sub>γ</sub>); 25.5 (C<sub>β</sub>).

#### 5.4.11 Synthese von D-Glutaminsäure-5-benzylester-1-*tert*-butylester (214)



3.0 g D-Glutaminsäure-5-benzylester (**207**) (12.7 mmol) werden in 40 mL *tert*-Butylacetat suspendiert und durch langsame Zugabe von Perchlorsäure (70%ig) in Lösung gebracht. Die Lösung mit einem maximalen pH-Wert von 1.5-2 wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmasse wird im Anschluss in eine Mischung aus 2 g NaHCO<sub>3</sub> und 40 mL H<sub>2</sub>O eingerührt (Vorsicht: Gasentwicklung). Wichtig dabei ist heftiges Rühren und ein pH-Wert von 6-8. Die organische Phase wird mit 40 mL Ethylacetat verdünnt,

zweimal mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum bleiben 3.2 g (10.9 mmol, 86% d. Th.) der Titelverbindung als farbloses Öl zurück. Das Produkt ist instabil unter Sauerstoffeinfluss.

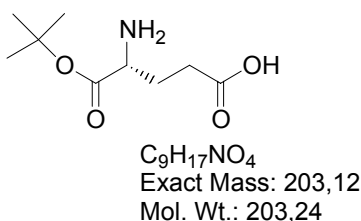
**DC** (MeOH/CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O 50:50:15): R<sub>f</sub> = 0.94, Anfärben mit Ninhydrin,

**HPLC** (10 – 90%): 16.62 min,

**ESI-MS** m/z = 294.0 [m+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz): δ(ppm) = 7.35 (s, 5H, Aromat); 5.12 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>); 3.45 (dd, 1H, J = 5.4/8.1 Hz, H<sub>α</sub>); 2.54 (t, 2H, J = 7.6 Hz, H<sub>γ</sub>); 2.18-1.85 (m, 2H, H<sub>β</sub>); 1.46 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu).

#### 5.4.12 Synthese von D-Glutaminsäure-1-*tert*-butylester (213)



3.2 g D-Glutaminsäure-1-*tert*-butyl-5-benzylester (**214**) (10.9 mmol) werden in 100 mL *tert*-Butanol gelöst und mit 0.5 g Pd auf Kohle (5%, trocken) versetzt. Die Reaktionsmischung wird anschließend für 4 Stunden bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Dabei bildet sich ein dicker Brei, der notfalls mit weiterem *tert*-Butanol verdünnt werden muss. Nach Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum und Lösen des Rückstandes in verdünnter Natronlauge (max. pH 8) wird durch Kieselgur filtriert und das Wasser destillativ entfernt. Man erhält 2.0 g (9.9 mmol, 90% d. Th.) der Titelverbindung als weiße Kristalle.



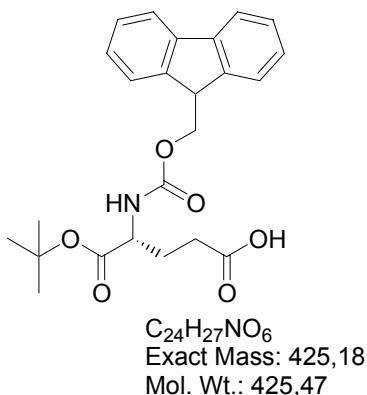
**Smp.** 128-130 °C (Na-Salz),

**DC** (MeOH/CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O 50:50:15), R<sub>f</sub> = 0.80, Anfärben mit Ninhydrin,

**HPLC** (10 – 90%): 11.25 min.

**<sup>1</sup>H-NMR** (D<sub>2</sub>O/ NaOH, 250 MHz): δ(ppm) = 4.07 (t, 1H, J = 6.3 Hz, H<sub>α</sub>); 2.45 (t, 2H, J = 6.7 Hz, H<sub>γ</sub>); 2.21-2.15 (m, 2H, H<sub>β</sub>); 1.53 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu). **<sup>13</sup>C-NMR** (D<sub>2</sub>O/ NaOH, 62.5 MHz): δ(ppm) = 181.4; 170.3; 87.1 (<sup>t</sup>Bu); 54.4 (C<sub>α</sub>); 33.9 (C<sub>γ</sub>); 28.4 (<sup>t</sup>Bu<sub>q</sub>); 27.5 (C<sub>β</sub>).

#### 5.4.13 Synthese von N-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-D-glutaminsäure-1-*tert*-butylester (190)



2.0 g D-Glutaminsäure-1-*tert*-butylester (**213**) (9.9 mmol), 1.0 g NaHCO<sub>3</sub> (1.1 mmol) und 3.5 g Fmoc-ONSu (10.4 mmol) werden in 50 mL Dioxan/ H<sub>2</sub>O (1:1) 16 h bei RT gerührt. Anschließend wird mit 2N HCl-Lösung auf pH 2.5 angesäuert und das THF im Vakuum verdampft. Nach Extraktion mit EE (3x) werden die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Nach Umkristallisation aus Chloroform/ Hexan erhält man 2.9 g (6.8 mmol, 69 % d. Th.) der Titelverbindung als weiße Kristalle.

**Smp.** 103-105 °C,

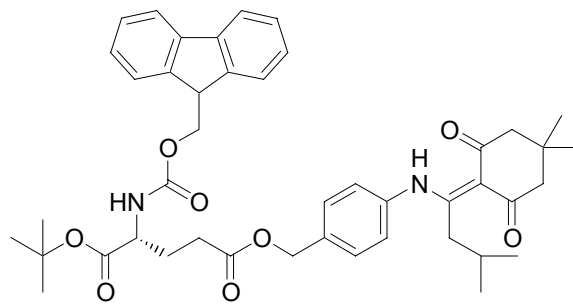
**DC** (EE/Hex 1:2, 1% AcOH): R<sub>f</sub> = 0.28,

HPLC (10 – 90%): 25.04 min,

ESI-MS  $m/z = 448.2 [m+Na]^+$ ;  $873.2 [2m+Na]^+$ ;  $889.3 [2m+K]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 7.73$  (d, 2H,  $J = 7.3$  Hz, Fmoc-Aromat);  $7.57$  (d, 2H,  $J = 7.3$  Hz, Fmoc-Aromat);  $7.41$ - $7.25$  (m, 4H, Fmoc-Aromat);  $5.47$  (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, NH);  $4.45$ - $4.32$  (m, 2H, Fmoc- $\text{CH}_2$ );  $4.33$ - $4.24$  (m, 1H,  $\text{H}_\alpha$ );  $4.19$  (t, 1H,  $J = 7.0$  Hz, Fmoc-CH);  $2.48$ - $2.30$  (m, 2H,  $\text{H}_\gamma$ );  $2.29$ - $2.11$ /  $2.02$ - $1.83$  (2x m, 2H,  $\text{H}_\beta$ );  $1.45$  (s, 9H,  $^t\text{Bu}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 176.8$  (CO);  $171.0$  (CO);  $156.0$  (Fmoc-CO);  $143.8$  (Fmoc-Aromat $_q$ );  $141.3$  (Fmoc-Aromat $_q$ );  $127.7$  (Fmoc-Aromat);  $127.1$  (Fmoc-Aromat);  $125.1$  (Fmoc-Aromat);  $120.0$  (Fmoc-Aromat);  $82.8$  ( $^t\text{Bu}_q$ );  $67.0$  (Fmoc-CH);  $53.7$  ( $\text{C}_\alpha$ );  $47.2$  (Fmoc- $\text{CH}_2$ );  $29.9$  ( $\text{C}_\gamma$ );  $28.0$  ( $^t\text{Bu}$ );  $27.9$  ( $\text{C}_\beta$ ).

**5.4.14 Synthese von [2R]-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-pentandisäure-1-tert-butylester-5-{4-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-3-methyl-butylamino]-benzylester} (196), N-Fmoc-D-glutaminsäure-1-tert-butylester-5-Dmab-ester**



$\text{C}_{44}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_8$   
Exact Mass: 736,37  
Mol. Wt.: 736,89

3.8 g N-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-D-glutaminsäure-1-tert-butylester (**190**) (8.94 mmol), 2.36 g Dmab-OH (**187**) (7.2 mmol), 1.37 g 1-Hydroxybenzotriazol-hydrat (9.0 mmol) und 3.43 g N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid (17.9 mmol) werden in 40 mL trockenem THF gelöst und nach Zugabe von 3 mL Collidin (23 mmol) für 16 h bei 0 °C

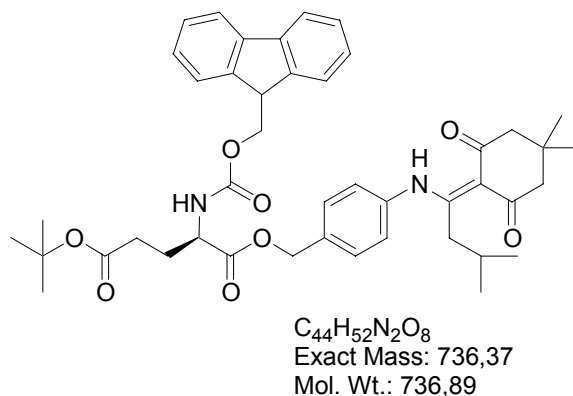
gerührt. Anschließend wird das THF im Vakuum destillativ entfernt, der Rückstand in Chloroform gelöst und die organische Phase mit Acetatpuffer (3x) und mit NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (3x) gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über MgSO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Man erhält 3.86 g (5.2 mmol, 73% d. Th.) der Titelsubstanz als gelblichen Feststoff nach Aufreinigung durch Flashchromatographie (EE/ Hex 1:1).

**HPLC** (10 – 90%): 33.83 min,

**ESI-MS** m/z = 737.4 [m+H]<sup>+</sup>; 759.5 [m+Na]<sup>+</sup>; 1474.4 [2m+H]<sup>+</sup>; 1495.6 [2m+Na]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 15.14 (s, 1H, Dmab-NH); 7.73 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc-Aromat); 7.56 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc-Aromat); 7.35 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Dmab-Aromat); 7.32-7.20 (m, 4H, Fmoc-Aromat); 7.08 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Dmab-Aromat); 5.38 (d, 1H, J = 7.8 Hz, Fmoc-NH); 5.11 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>); 4.36 (d, 2H, J = 7.2 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.33-4.23 (m, 1H, H<sub>α</sub>); 4.20 (t, 1H, J = 7.0 Hz, Fmoc-CH); 2.96 (d, 2H, J = 6.5 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.55-2.44 (m, 2H, H<sub>γ</sub>); 2.47/ 2.37 (2x s, 4H, 2x CH<sub>2</sub>); 2.32-2.16/ 2.06-1.88 (2x m, 2H, H<sub>β</sub>); 1.70-1.90 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.45 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu); 1.05 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>); 0.74 (d, 6H, J = 6.5 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ(ppm) = 200.2; 196.7; 176.4; 172.7; 171.9; 156.3 (Fmoc); 143.7 (Fmoc); 141.3 (Fmoc); 135.8 (Dmab); 134.9 (Dmab); 129.0 (Dmab); 128.4 (Fmoc); 127.0 (Fmoc); 126.6 (Dmab); 125.1 (Fmoc); 120.3 (Fmoc); 107.5 (Dmab); 82.8 (<sup>t</sup>Bu<sub>q</sub>); 66.3 (Fmoc-CH<sub>2</sub>); 65.4 (Benzyl-CH<sub>2</sub>); 53.0 (C<sub>α</sub>); 52.3 (2x CH<sub>2</sub>); 47.1 (Fmoc-CH); 38.3 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 30.2 (C<sub>γ</sub>); 30.0 (Dmab<sub>q</sub>); 29.5 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 28.2 (2x CH<sub>3</sub>); 28.0 (<sup>t</sup>Bu); 27.6 (C<sub>β</sub>); 22.6 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**5.4.15 Synthese von [2*R*]-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-pentandisäure-5-*tert*-butylester-1-{4-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-3-methyl-butylamino]-benzylester (197), N-Fmoc-D-glutaminsäure-5-*tert*-butylester-1-Dmab-ester**



1.03 g N-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-D-glutaminsäure-5-*tert*-butylester (**191**) (2.42 mmol), 0.64 g Dmab-OH (**187**) (1.94 mmol), 0.37 g 1-Hydroxy-benzotriazol-hydrat (2.4 mmol) und 0.93 g N-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid (2.8 mmol) werden in 10 mL trockenem THF gelöst und nach Zugabe von 0.8 mL Collidin (5.6 mmol) für 16 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wird das THF im Vakuum destillativ entfernt, der Rückstand in Chloroform gelöst und die organische Phase mit Acetatpuffer (3x) und mit NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (3x) gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über MgSO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Man erhält 1.46 g (1.98 mmol, 95% d. Th.) der Titelsubstanz als gelblichen Feststoff nach Aufreinigung durch Flashchromatographie (EE/ Hex 1:1).

**Smp.** 61 °C,

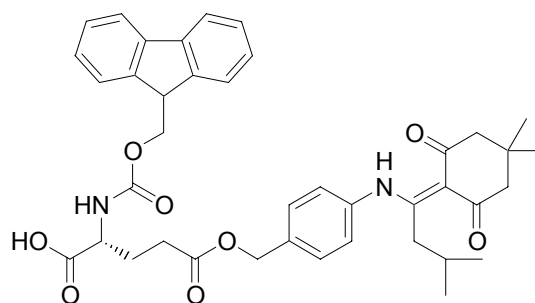
**HPLC** (10 – 90%): 32.96 min,

**ESI-MS**  $m/z = 737.4 [m+H]^+$ ; 759.5  $[m+Na]^+$ ; 1474.4  $[2m+H]^+$ ; 1495.6  $[2m+Na]^+$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 15.14 (s, 1H, Dmab-NH); 7.76 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc-Aromat); 7.59 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc-Aromat); 7.41 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Dmab-Aromat); 7.40/ 7.30 (2x m, 4H, Fmoc-Aromat); 7.11 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Dmab-Aromat); 5.50 (d, 1H, J = 8.7 Hz, Fmoc-NH); 5.21 (m, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>); 4.45 (m, 1H, H<sub>α</sub>); 4.39 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.21 (m, 1H, Fmoc-CH); 2.99 (d, 2H, J = 6.5 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.48 (2x s, 4H, 2x CH<sub>2</sub>); 2.32 (m, 2H, H<sub>γ</sub>); 2.18/ 2.00 (2x m, 2H, H<sub>β</sub>); 1.83 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.45 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu); 1.09 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>); 0.77 (d, 6H, J = 6.7 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ(ppm) = 200.2; 196.7; 176.4; 172.7; 171.9; 156.3 (Fmoc); 143.7 (Fmoc); 141.3 (Fmoc); 135.8 (Dmab); 134.9 (Dmab); 129.5 (Dmab); 128.1 (Fmoc); 127.5 (Fmoc); 127.0 (Dmab); 125.4 (Fmoc); 120.4 (Fmoc); 107.5 (Dmab); 82.1 (<sup>t</sup>Bu<sub>q</sub>); 67.6 (Fmoc-CH<sub>2</sub>); 66.8 (Benzyl-CH<sub>2</sub>); 54.0 (C<sub>α</sub>); 53.2 (2x CH<sub>2</sub>); 47.5 (Fmoc-CH); 38.9 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 31.8 (C<sub>γ</sub>); 30.0 (Dmab<sub>q</sub>); 30.0 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 28.6 (2x CH<sub>3</sub>); 28.5 (<sup>t</sup>Bu); 27.7 (C<sub>β</sub>); 23.0 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### 5.4.16 Synthese von [2R]-2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-pentandisäure-5-{4-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-3-methyl-butylamino]-benzylester} (202), N-Fmoc-D-glutaminsäure-5-Dmab-ester



C<sub>40</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>  
 Exact Mass: 680,31  
 Mol. Wt.: 680,79

3.8 g N-Fmoc-D-glutaminsäure-1-*tert*-butylester-5-Dmab-ester (**196**) (5.2 mmol) werden in 20 mL DCM und 20 mL TFA gelöst und für 2 h bei RT

gerührt. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in EE gelöst, mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen (2x) und die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Rohprodukt mittels Flashchromatographie (EE/ Hex 1:1, 1% AcOH) gereinigt. Man erhält 2.28 g (3.4 mmol, 88% d. Th.) der Titelsubstanz als weißen Feststoff.

**Smp.** 162-163°C (CHCl<sub>3</sub>/ Hex),

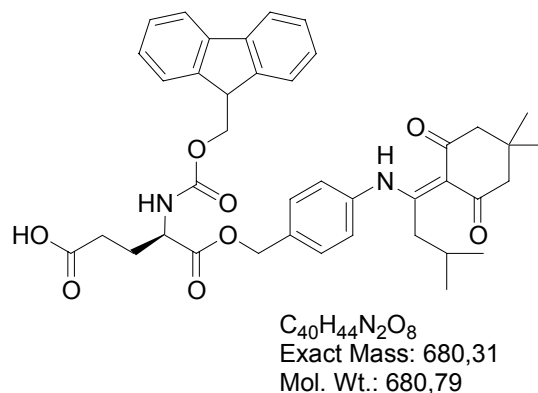
**DC** (EE/Hex 1:1, 1% AcOH): R<sub>f</sub> = 0.15,

**HPLC** (10 – 90%): 27.73 min,

**ESI-MS** m/z = 681.3 [m+H]<sup>+</sup>; 703.3 [m+Na]<sup>+</sup>; 1361.2 [2m+H]<sup>+</sup>; 1383.3 [2m+Na]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 15.20 (s, 1H, Dmab-NH); 7.69 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc-Aromat); 7.55 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc-Aromat); 7.35 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Dmab-Aromat); 7.32-7.20 (m, 4H, Fmoc-Aromat); 7.05 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Dmab-Aromat); 5.66 (d, 1H, J = 7.8 Hz, Fmoc-NH); 5.07 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>); 4.34 (d, 2H, J = 7.0 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.45-4.38 (m, 1H, H<sub>α</sub>); 4.16 (t, 1H, J = 6.8 Hz, Fmoc-CH); 2.95 (d, 2H, J = 6.5 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.52-2.43 (m, 2H, H<sub>γ</sub>); 2.42 (s, 4H, 2x CH<sub>2</sub>); 2.42-2.20/ 2.14-1.94 (2x m, 2H, H<sub>β</sub>); 1.70-1.90 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.03 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>); 0.72 (d, 6H, J = 6.5 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ(ppm) = 200.2; 196.7; 176.8; 173.8; 172.5; 156.0 (Fmoc); 143.7 (Fmoc); 141.3 (Fmoc); 136.4 (Dmab); 135.4 (Dmab); 129.0 (Dmab); 127.6 (Fmoc); 127.0 (Fmoc); 126.6 (Dmab); 125.1 (Fmoc); 120.3 (Fmoc); 107.5 (Dmab); 66.9 (Fmoc-CH<sub>2</sub>); 65.4 (Benzyl-CH<sub>2</sub>); 53.0 (C<sub>α</sub>); 52.8 (2x CH<sub>2</sub>); 47.0 (Fmoc-CH); 38.4 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 30.0 (Dmab<sub>q</sub>); 29.5 (C<sub>γ</sub>); 29.5 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 28.1 (2x CH<sub>3</sub>); 27.5 (C<sub>β</sub>); 22.6 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**5.4.17 Synthese von [2R]-2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-pentandisäure-1-{4-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-3-methyl-butylamino]-benzylester (203), N-Fmoc-D-glutaminsäure-1-Dmab-ester**



1.46 g N-Fmoc-D-glutaminsäure-5-*tert*-butylester-1-Dmab-ester (**197**) (1.98 mmol) werden in 10 mL DCM und 10 mL TFA gelöst und für 2 h bei RT gerührt. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in EE gelöst, mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen (2x) und die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Rohprodukt mittels Flashchromatographie (EE/ Hex 1:1, 1% AcOH) gereinigt. Man erhält 1.36 g (2.0 mmol, 100% d. Th.) der Titelsubstanz als weißen Feststoff.

**Smp.** 94°C (CHCl<sub>3</sub>/ Hex),

**DC** (EE/Hex 1:1, 1% AcOH): R<sub>f</sub> = 0.15,

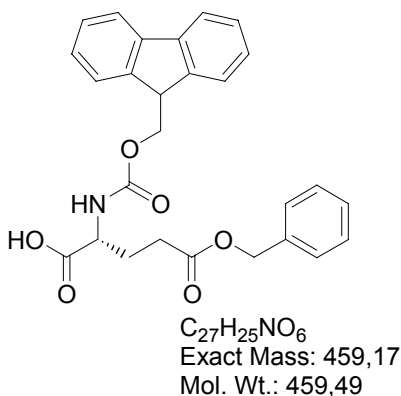
**HPLC** (10 – 90%): 27.32 min,

**ESI-MS** m/z = 681.3 [m+H]<sup>+</sup>; 703.3 [m+Na]<sup>+</sup>; 1361.2 [2m+H]<sup>+</sup>; 1383.3 [2m+Na]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 15.20 (s, 1H, Dmab-NH); 7.76 (d, 2H, J = 7.8 Hz, Fmoc-Aromat); 7.58 (d, 2H, J = 7.8 Hz, Fmoc-Aromat); 7.39 (d, 2H, J = 8.3 Hz, Dmab-Aromat); 7.39/ 7.30 (2x m, 4H, Fmoc-Aromat); 7.11 (d, 2H, J = 8.3 Hz, Dmab-Aromat); 5.48 (d, 1H, J = 7.9 Hz, Fmoc-NH); 5.20 (s,

2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>); 4.48 (m, 1H, H<sub>α</sub>); 4.41 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.21 (m, 1H, Fmoc-CH); 2.99 (d, 2H, J = 6.5 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.45 (m, 4H, 2x CH<sub>2</sub>); 2.42 (m, 2H, H<sub>γ</sub>); 2.25/ 2.00 (2x m, 2H, H<sub>β</sub>); 1.83 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.07 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>); 0.76 (d, 6H, J = 6.7 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ(ppm) = 200.2; 196.7; 176.9; 173.9; 172.6; 156.1 (Fmoc); 143.9 (Fmoc); 141.5 (Fmoc); 136.6 (Dmab); 135.6 (Dmab); 129.5 (Dmab); 128.1 (Fmoc); 127.4 (Fmoc); 127.0 (Dmab); 125.3 (Fmoc); 120.3 (Fmoc); 107.5 (Dmab); 67.5 (Fmoc-CH<sub>2</sub>); 66.8 (Benzyl-CH<sub>2</sub>); 53.5 (C<sub>α</sub>); 53.3 (2x CH<sub>2</sub>); 47.6 (Fmoc-CH); 38.6 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 30.0 (Dmab<sub>q</sub>); 29.8 (C<sub>γ</sub>); 29.8 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 28.5 (2x CH<sub>3</sub>); 27.6 (C<sub>β</sub>); 22.7 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### 5.4.18 Synthese von [2R]-2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-pentansäure-5-benzylester (210), N-Fmoc-D-glutaminsäure-5-benzylester



14.0 g D-Glutaminsäure-5-benzylester (**207**) (59 mmol), 10.0 g NaHCO<sub>3</sub> (120 mmol) und 24.0 g Fmoc-Cl (93 mmol) werden in 500 mL THF/ H<sub>2</sub>O (1:1) 16 h bei RT gerührt. Anschließend wird mit 2N HCl-Lösung auf pH 2 angesäuert und das THF im Vakuum verdampft. Nach dreimaliger Extraktion mit EE werden die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Nach Flashchromatographie (EE/ Hex 1:1, 1% AcOH) erhält man 21.9 g (48 mmol, 81 % d. Th.) der Titelverbindung als weißen Feststoff.



**Smp.** 70-80 °C (Zersetzung),

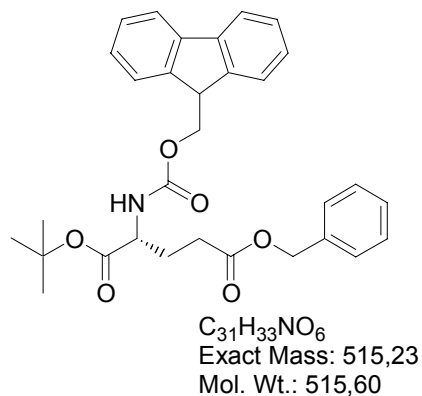
**HPLC** (10 – 90%): 25.94 min,

**DC** (EE/Hex = 1:1, 1% AcOH): R<sub>f</sub> = 0.39,

**ESI-MS** m/z = 460.1 [m+H]<sup>+</sup>; 482.3 [m+Na]<sup>+</sup>; 919.2 [2m+H]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz): δ(ppm) = 7.73 (d, 2H, J = 7.3 Hz, Fmoc-Aromat); 7.56 (d, 2H, J = 7.3 Hz, Fmoc-Aromat); 7.41-7.28 (m, 4H, Fmoc-Aromat); 7.33 (s, 5H, Benzyl-Aromat); 5.51 (d, 1H, J = 8.0 Hz, NH); 5.11 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Benzyl); 4.50-4.40 (m, 1H, H<sub>α</sub>); 4.45-4.35 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.19 (t, 1H, J = 7.0 Hz, Fmoc-CH); 2.65-2.50 (m, 2H, H<sub>γ</sub>); 2.40-2.20/ 2.15-1.99 (2x m, 2H, H<sub>β</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz): δ(ppm) = 175.7 (CO); 172.8 (CO); 156.0 (Fmoc-CO); 143.8 (Fmoc-Aromat<sub>q</sub>); 141.3 (Fmoc-Aromat<sub>q</sub>); 136.1/ 128.4/ 128.3 (Benzyl-Aromat); 127.7 (Fmoc-Aromat); 127.1 (Fmoc-Aromat); 125.1 (Fmoc-Aromat); 120.0 (Fmoc-Aromat); 68.0 (CH<sub>2</sub>-Benzyl); 67.2 (Fmoc-CH); 53.2 (C<sub>α</sub>); 47.2 (Fmoc-CH<sub>2</sub>); 30.3 (C<sub>γ</sub>); 27.3 (C<sub>β</sub>).

**5.4.19 Synthese von [2R]-2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-pentansäure-5-benzylester-1-tert-butylester (212), N-Fmoc-D-glutaminsäure-5-benzylester-1-tert-butylester**



11.3 g N-Fmoc-D-glutaminsäure-5-benzylester (**210**) (24.6 mmol) und 11.3 g Trichloracetimidensäure-*tert*-butylester (**211**) (24.6 mmol) werden in 30 mL

trockenem DCM und 100 mL trockenem Cyclohexan suspendiert und bei 0 °C unter Argonatmosphäre mit 0.7 mL BF<sub>3</sub>-Etherat versetzt. Die Suspension lässt man allmählich auf RT erwärmen und rührt insgesamt 24 h nach. Nachdem man 16 g NaHCO<sub>3</sub> zugegeben hat, wird eine weitere Stunde bei RT gerührt und anschließend die Lösungsmittel durch Destillation im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in EE suspendiert und durch Kieselgel filtriert. Anschließend wird die organische Phase mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen (3x), über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und durch Destillation im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Nach Flashchromatographie (EE/ Hex 1:1) erhält man 10.6 g (21 mmol, 85% d. Th.) der Titelverbindung als weißen Feststoff.

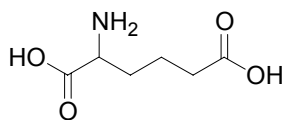
**DC** (EE/Hex = 1:1): Rf = 0.9

**HPLC** (10 – 90%): 31.60 min

**ESI-MS** m/z = 516.1 [m+H]<sup>+</sup>; 539.2 [m+Na]<sup>+</sup>; 1033.2 [2m+H]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz): δ(ppm) = 7.75 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc-Aromat); 7.57 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc-Aromat); 7.41-7.25 (m, 4H, Fmoc-Aromat); 7.33 (s, 5H, Benzyl-Aromat); 5.43 (d, 1H, J = 8.0 Hz, NH); 5.11 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Benzyl); 4.35-4.25 (m, 1H, H<sub>α</sub>); 4.38 (d, 2H, J = 7.1 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.20 (t, 1H, J = 7.0 Hz, Fmoc-CH); 2.55-2.35 (m, 2H, H<sub>γ</sub>); 2.35-2.12/ 2.05-1.90 (2x m, 2H, H<sub>β</sub>); 1.47 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz): δ(ppm) = 172.7 (CO); 171.2 (CO); 156.0 (Fmoc-CO); 143.8 (Fmoc-Aromat<sub>q</sub>); 141.3 (Fmoc-Aromat<sub>q</sub>); 135.8/ 128.6/ 128.3 (Benzyl-Aromat); 127.7 (Fmoc-Aromat); 127.1 (Fmoc-Aromat); 125.1 (Fmoc-Aromat); 120.0 (Fmoc-Aromat); 82.6 (<sup>t</sup>Bu<sub>q</sub>); 67.0 (CH<sub>2</sub>-Benzyl); 67.1 (Fmoc-CH); 53.8 (C<sub>α</sub>); 47.2 (Fmoc-CH<sub>2</sub>); 30.3 (C<sub>γ</sub>); 28.1 (<sup>t</sup>Bu); 28.0 (C<sub>β</sub>).

#### 5.4.20 Synthese von *rac*-2-Amino-adipinsäure (**181**)



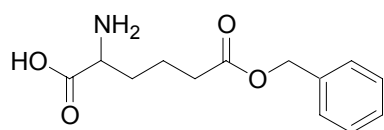
$C_6H_{11}NO_4$   
Exact Mass: 161,07  
Mol. Wt.: 161,16

Eine Lösung aus 5.3 g Natriumhydrid (0.21 mol) und 50 mL absolutem Ethanol wird langsam bei 0 °C unter Rühren zu einer Suspension aus 41.4 g Diethylacetamidomalonsäure (**176**) (0.191 mol) in 150 mL abs. Ethanol gegeben. Dabei bildet sich ein oranger, dicker Niederschlag. Anschließend werden unter kräftigem Rühren langsam 37.2 g 4-Brombutyronitril (**177**) (0.25 mol) in 40 mL abs. Ethanol zugetropft und die Reaktionsmasse 16 h unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abrotiert und der Rückstand in 120 mL Ethylacetat und 100 mL H<sub>2</sub>O aufgenommen. Mit Hilfe von 5 % Zitronensäure wird der pH-Wert auf 4 eingestellt. Die wässrige Phase wird entfernt und die organische Phase mit H<sub>2</sub>O extrahiert (3x) und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Abdestillation des Ethylacetats im Vakuum und überschüssigem Brombutyronitril im Hochvakuum (max. 60 °C) bleibt ein oranges Öl zurück. Zur Decarboxylierung und Verseifung versetzt man das Rohprodukt mit 100 mL H<sub>2</sub>O und 200 mL konz. HCl und rührt 16 h unter Rückfluss. Nach Abdestillation des Lösungsmittels (20 mbar, 80 °C) wird das Produkt in 60 mL H<sub>2</sub>O gelöst und mit Natronlauge auf pH 2.5-3 eingestellt. Die ausfallenden Kristalle werden nach Kristallisation im Kühlschrank abfiltriert, mit H<sub>2</sub>O (pH 3) gewaschen und in 100 mL H<sub>2</sub>O suspendiert. Durch Zugabe von Natronlauge werden die Kristalle in Lösung gebracht (pH 6) und durch Ansäuern mit konz. HCl (pH 2.5-3) und 100 mL Ethanol erneut gefällt. Nach Kühlung im Kühlschrank wird das Produkt abfiltriert, gewaschen (Ethanol/H<sub>2</sub>O 1:1, pH 3) und im Vakuum getrocknet. Man erhält 10.4 g (64.6 mmol, 34% d. Th.) der Titelverbindung als weiße Kristallen.

**Smp.** 203-205 °C (H<sub>2</sub>O).

**<sup>1</sup>H-NMR** (D<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, 250 MHz): δ(ppm) = 3.76 (t, 1H, J = 6.4 Hz, H<sub>α</sub>); 2.27 (t, 2H, J = 7.3 Hz, H<sub>δ</sub>); 1.79-1.96 (m, 2H, H<sub>β</sub>); 1.55-1.78 (m, 2H, H<sub>γ</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (D<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, 62.5 MHz): δ(ppm) = 183.3; 175.6; 55.3 (C<sub>α</sub>); 37.6 (C<sub>δ</sub>); 31.1 (C<sub>β</sub>); 22.2 (C<sub>γ</sub>).

#### 5.4.21 Synthese von *rac*-2-Amino-adipinsäure-6-benzylester (**208**)



C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub>  
Exact Mass: 251,12  
Mol. Wt.: 251,28

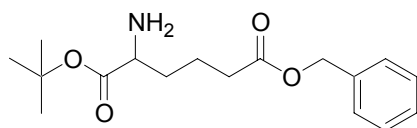
8.0 g 2-Amino-Adipinsäure (**181**) (49.6 mmol) und 7.3 g wasserfreies Natriumsulfat (wasserfrei) werden in 90 mL Benzylalkohol suspendiert. Zu dieser Mischung werden mit Hilfe einer Spritze 13.5 mL Tetrafluorborsäureetherat (54%ig, 98.8 mmol) zugegeben. Anschließend wird unter Luftausschluss über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 250 mL absolutem THF wird die Reaktionsmischung mit Hilfe von Kieselgur filtriert und langsam mit 15.0 mL Triethylamin (108 mmol) in 35 mL absolutem THF versetzt, worauf sich ein feiner Niederschlag bildet (pH 4). THF wird im Vakuum bis max. 50-60 °C abdestilliert. Der Rückstand wird in 275 mL Ethylacetat aufgeschlämmt, 10 min bei 60 °C gerührt, durch eine sehr feine Fritte abfiltriert und mit Ethylacetat gewaschen. Nach Trocknung im HV erhält man 11.0 g (43.8 mmol, 88% d. Th.) der Titelverbindung als weiße Kristalle.

**Smp.** 178-180°C (Ethylacetat),

**DC** (MeOH/CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O 50:50:15): R<sub>f</sub> = 0.74, Anfärben mit Ninhydrin.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{HCl}$  37%, 250 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 7.44$  (s, 5H, Benzyl-Aromat); 5.17 (s, 2H, Benzyl- $\text{CH}_2$ ); 4.09 (t, 1H,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{H}_\alpha$ ); 2.51 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{H}_\delta$ ); 1.88-2.10 (m, 2H,  $\text{H}_\beta$ ); 1.64-1.88 (m, 2H,  $\text{H}_\gamma$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{HCl}$  37%, 62.5 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 176.0$ ; 172.4; 136.3; 129.5; 129.3; 129.0; 67.7 (Benzyl- $\text{CH}_2$ ); 53.2 ( $\text{C}_\alpha$ ); 33.7 ( $\text{C}_\delta$ ); 29.6 ( $\text{C}_\beta$ ); 20.5 ( $\text{C}_\gamma$ ).

#### 5.4.22 Synthese von *rac*-2-Amino-adipinsäure-6-benzylester-1-*tert*-butylester (215)



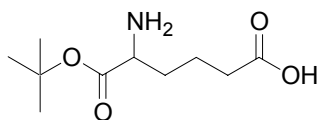
$\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NO}_4$   
Exact Mass: 307,18  
Mol. Wt.: 307,38

12.5 g 2-Amino-adipinsäure-6-benzylester (**208**) (49.6 mmol) werden in 156 mL *tert*-Butylacetat suspendiert und durch langsame Zugabe von Perchlorsäure (70%ig) in Lösung gebracht. Die Lösung mit einem maximalen pH-Wert von 1.5-2 wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmasse wird im Anschluss in eine Mischung aus 7.8 g  $\text{NaHCO}_3$  und 150 mL  $\text{H}_2\text{O}$  eingerührt (Vorsicht: Gasentwicklung). Wichtig dabei ist heftiges Rühren und ein pH-Wert von 6-8. Die organische Phase wird mit 156 mL Ethylacetat verdünnt, zweimal mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung extrahiert und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Nach Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum bleiben 12.4 g (40.3 mmol, 81% d. Th.) der Titelverbindung als farbloses Öl zurück. Das Produkt ist instabil unter Sauerstoffeinfluss.

**DC** ( $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$  50:50:15):  $R_f = 0.92$ , Anfärben mit Ninhydrin.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 7.35$  (s, 5H, Benzyl-Aromat); 5.10 (s, 2H, Benzyl- $\text{CH}_2$ ); 3.32 (t, 1H,  $J = 6.4$  Hz,  $\text{H}_\alpha$ ); 2.38 (t, 2H,  $J = 7.3$  Hz,  $\text{H}_\delta$ ); 2.41-2.32/ 2.04-1.95 (2x m, 2H,  $\text{H}_\beta$ ); 1.78-1.68 (m, 2H,  $\text{H}_\gamma$ ); 1.45 (s, 9H,  $^t\text{Bu}$ ).

#### 5.4.23 Synthese von *rac*-2-Amino-adipinsäure-1-*tert*-butylester (217)



$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NO}_4$   
Exact Mass: 217,13  
Mol. Wt.: 217,26

12.4 g 2-Amino-adipinsäure-6-benzylester-1-*tert*-butylester (**215**) (40.3 mmol) werden in 392 mL *tert*-Butanol gelöst und mit 2.0 g Pd auf Kohle (5%, trocken) versetzt. Die Reaktionsmischung wird anschließend für 4 Stunden bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Dabei bildet sich ein dicker Brei, der notfalls mit weiterem *tert*-Butanol verdünnt werden muss. Nach Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum und Lösen des Rückstandes in verdünnter Natronlauge (max. pH 8) wird durch Kieselgur filtriert und das Wasser destillativ entfernt. Man erhält 7.87 g (36.3 mmol, 90% d. Th.) der Titelverbindung als weißen Feststoff.

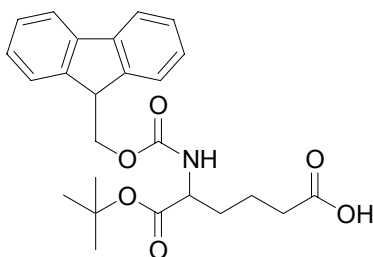
**Smp.** 113 °C (Na-Salz),

**DC** (MeOH/ $\text{CHCl}_3$ / $\text{H}_2\text{O}$  50:50:15):  $R_f = 0.82$ , Anfärben mit Ninhydrin,

**HPLC** (0 – 50%): 15.27 min.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , 250 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 3.95$  (t, 1H,  $J = 6.2$  Hz,  $\text{H}_\alpha$ ); 2.24 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{H}_\delta$ ); 1.80-2.02 (m, 2H,  $\text{H}_\beta$ ); 1.54-1.80 (m, 2H,  $\text{H}_\gamma$ ); 1.50 (s, 9H,  $^t\text{Bu}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , 62.5 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 183.1$ ; 171.2; 85.7 ( $^t\text{Bu}_q$ ); 54.2 ( $\text{C}_\alpha$ ); 37.6 ( $\text{C}_\delta$ ); 29.8 ( $\text{C}_\beta$ ); 27.9 ( $^t\text{Bu}$ ); 22.1 ( $\text{C}_\gamma$ ).

**5.4.24 Synthese von *rac*-2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-hexandisäure-1-*tert*-butylester (192), *rac*-N-Fmoc-2-amino-adipinsäure-1-*tert*-butylester**



C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>6</sub>  
Exact Mass: 439,20  
Mol. Wt.: 439,50

7.8 g 2-Amino-adipinsäure-1-*tert*-butylester (**217**) (35.9 mmol), 3.6 g NaHCO<sub>3</sub> (42.9 mmol) und 12.7 g Fmoc-ONSu (37.7 mmol) werden in 200 mL Dioxan/H<sub>2</sub>O (1:1) 16 h bei RT gerührt. Anschließend wird mit 2N HCl-Lösung auf pH 2.5 angesäuert und das Dioxan im Vakuum verdampft. Nach Extraktion mit EE (3x) werden die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Nach Umkristallisation aus Chloroform/ Hexan erhält man 11.3 g (25.8 mmol, 72 % d. Th.) der Titelverbindung als weiße Kristalle.

**Smp.** 99-102 °C (CHCl<sub>3</sub>/ Hex),

**DC** (EE/Hex 1:3, 1% AcOH): R<sub>f</sub> = 0.38,

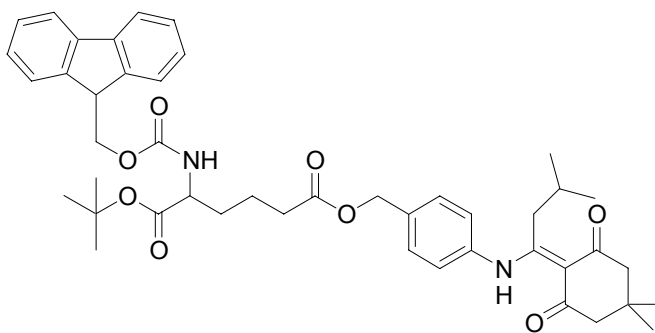
**HPLC** (10 – 90%): 25.81 min,

**ESI-MS** m/z = 440.1 [m+H]<sup>+</sup>; 462.1 [m+Na]<sup>+</sup>; 901.0 [2m+Na]<sup>+</sup>; 917.1 [2m+K]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 7.79 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc-Aromat); 7.63 (d, 2H, J = 7.5 Hz, Fmoc-Aromat); 7.42 (t, 2H, J = 6.7 Hz, Fmoc-Aromat); 7.34 (t, 2H, J = 6.7 Hz, Fmoc-Aromat); 5.48 (d, 1H, J = 6.7 Hz, Fmoc-NH); 4.41 (d, 2H, J = 6.7 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.27-4.34 (m, 1H, H<sub>α</sub>); 4.25 (t, 1H, J = 7.0 Hz, Fmoc-CH); 2.43 (t, 2H, J = 7.3 Hz, H<sub>δ</sub>); 1.69-1.81/ 1.85-1.97

(m, 2H, H<sub>β</sub>); 1.66-1.82 (m, 2H, H<sub>γ</sub>); 1.51 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ(ppm) = 177.9; 171.4; 155.9 (Fmoc); 143.8 (Fmoc); 141.3 (Fmoc); 127.7 (Fmoc); 127.1 (Fmoc); 125.1 (Fmoc); 120.0 (Fmoc); 82.4 (<sup>t</sup>Bu<sub>q</sub>); 67.0 (Fmoc-CH<sub>2</sub>); 54.0 (C<sub>α</sub>); 47.2 (Fmoc-CH); 33.2 (C<sub>δ</sub>); 32.1 (C<sub>β</sub>); 28.0 (<sup>t</sup>Bu); 20.4 (C<sub>γ</sub>).

**5.4.25 Synthese von *rac*-2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-hexandisäure-1-*tert*-butylester-6-{4-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-3-methyl-butylamino]-benzylester (198), *rac*-N-Fmoc-2-amino-adipinsäure-1-*tert*-butylester-6-Dmab-ester**



C<sub>45</sub>H<sub>54</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>  
Exact Mass: 750,39  
Mol. Wt.: 750,92

5.79 g N-Fmoc-2-amino-adipinsäure-1-*tert*-butylester (**192**) (13.2 mmol), 3.47 g Dmab-OH (**187**) (10.5 mmol), 1.78 g 1-Hydroxy-benzotriazol-hydrat (13.2 mmol) und 5.05 g N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid (26.4 mmol) werden in 60 mL trockenem THF gelöst und nach Zugabe von 4.4 mL Collidin (33.3 mmol) für 16 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wird das THF im Vakuum destillativ entfernt, der Rückstand in Chloroform gelöst und die organische Phase mit Acetatpuffer (3x) und mit NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (3x) gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über MgSO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Man erhält 5.47 g (7.3 mmol, 69% d. Th.) der Titelsubstanz als gelblichen Feststoff nach Aufreinigung durch Flashchromatographie (EE/ Hex 1:1).



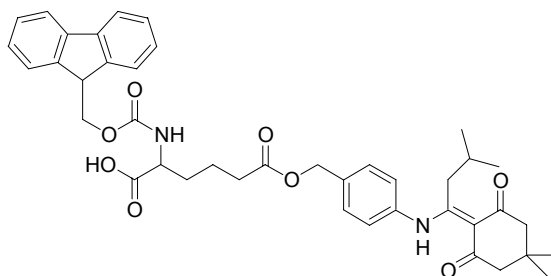
**Smp.** 53-57°C,

**DC** (EE/Hex 1:1): R<sub>f</sub> = 0.62,

**HPLC** (10 – 90%): 32.90 min.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 15.28 (s, 1H, Dmab-NH); 7.77 (d, 2H, J = 7.4 Hz, Fmoc-Aromat); 7.61 (d, 2H, J = 7.4 Hz, Fmoc-Aromat); 7.24-7.42 (m, 4H, Fmoc-Aromat); 7.40 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Dmab-Aromat); 7.12 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Dmab-Aromat); 5.41 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Fmoc-NH); 5.13 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>); 4.37 (d, 2H, J = 7.0 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.25-4.35 (m, 1H, H<sub>α</sub>); 4.23 (t, 1H, J = 7.0 Hz, Fmoc-CH); 3.01 (d, 2H, J = 6.7 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.47 (s, 4H, 2x CH<sub>2</sub>); 2.44 (t, 2H, J = 7.4 Hz, H<sub>δ</sub>); 1.76-1.90 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.69-1.81/ 1.84-1.96 (m, 2H, H<sub>β</sub>); 1.64-1.82 (m, 2H, H<sub>γ</sub>); 1.48 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu); 1.08 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>); 0.77 (d, 6H, J = 6.7 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ(ppm) = 176.4; 172.7; 171.2; 155.8 (Fmoc); 143.8 (Fmoc); 141.3 (Fmoc); 136.8 (Dmab); 135.6 (Dmab); 129.0 (Dmab); 127.7 (Fmoc); 127.0 (Fmoc); 126.6 (Dmab); 125.1 (Fmoc); 119.9 (Fmoc); 107.8 (Dmab); 82.3 (<sup>t</sup>Bu<sub>q</sub>); 66.9 (Fmoc-CH<sub>2</sub>); 65.3 (Benzyl-CH<sub>2</sub>); 53.9 (C<sub>α</sub>); 52.9 (2x CH<sub>2</sub>); 47.2 (Fmoc-CH); 38.3 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 33.5 (C<sub>δ</sub>); 32.1 (C<sub>β</sub>); 30.0 (Dmab<sub>q</sub>); 29.5 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 28.3 (2x CH<sub>3</sub>); 28.0 (<sup>t</sup>Bu); 22.6 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 20.4 (C<sub>γ</sub>).

**5.4.26 Synthese von *rac*-2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-hexandisäure-6-{4-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-3-methyl-butylamino]-benzylester (204), *rac*-N-Fmoc-2-amino-adipinsäure-6-Dmab-ester**



C<sub>41</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>  
Exact Mass: 694,33  
Mol. Wt.: 694,81

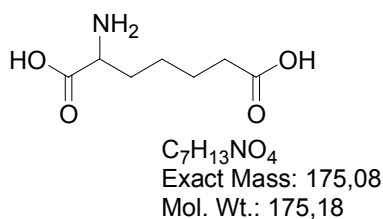
5.6 g N-Fmoc-2-amino-adipinsäure-1-*tert*-butylester-6-Dmab-ester (**198**) (7.5 mmol) werden in 20 mL DCM und 20 mL TFA gelöst und für 2 h bei RT gerührt. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in EE gelöst, mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen (2x) und die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Rohprodukt aus <sup>t</sup>BuOH lyophilisiert. Man erhält 5.3 g (7.6 mmol, 100% d. Th.) der Titelsubstanz als weißen Feststoff.

**Smp.** 77-80°C,

**HPLC** (10 – 90%): 27.99 min,

**ESI-MS** m/z = 695.3 [m+H]<sup>+</sup>; 717.3 [m+Na]<sup>+</sup>; 1411.3 [2m+Na]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 15.28 (s, 1H, Dmab-NH); 7.76 (d, 2H, J = 7.4 Hz, Fmoc-Aromat); 7.59 (d, 2H, J = 7.1 Hz, Fmoc-Aromat); 7.23-7.47 (m, 4H, Fmoc-Aromat); 7.38 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Dmab-Aromat); 7.10 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Dmab-Aromat); 5.53 (d, 1H, J = 8.1 Hz, Fmoc-NH); 5.13 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>); 4.36-4.46 (m, 1H, H<sub>α</sub>); 4.38 (d, 2H, J = 7.0 Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.21 (t, 1H, J = 7.0 Hz, Fmoc-CH); 2.99 (d, 2H, J = 6.2 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.46 (s, 4H, 2x CH<sub>2</sub>); 2.46 (t, 2H, J = 7.4 Hz, H<sub>δ</sub>); 1.79-1.86 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.70-1.82/ 1.89-2.01 (m, 2H, H<sub>β</sub>); 1.68-1.84 (m, 2H, H<sub>γ</sub>); 1.07 (s, 6H, 2x CH<sub>3</sub>); 0.75 (d, 6H, J = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ(ppm) = 176.6; 174.9; 172.9; 156.1 (Fmoc); 143.7 (Fmoc); 141.3 (Fmoc); 136.6 (Dmab); 135.6 (Dmab); 129.0 (Dmab); 127.7 (Fmoc); 127.0 (Fmoc); 126.3 (Dmab); 125.1 (Fmoc); 119.9 (Fmoc); 107.7 (Dmab); 66.9 (Fmoc-CH<sub>2</sub>); 65.4 (Benzyl-CH<sub>2</sub>); 52.9 (C<sub>α</sub>); 52.6 (2x CH<sub>2</sub>); 47.0 (Fmoc-CH); 38.2 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 33.3 (C<sub>δ</sub>); 31.5 (C<sub>β</sub>); 30.0 (Dmab); 29.6 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 28.1 (2x CH<sub>3</sub>); 22.4 (CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 20.5 (C<sub>γ</sub>).

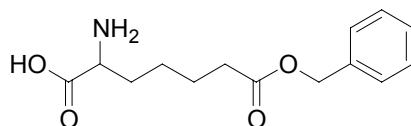
**5.4.27 Synthese von *rac*-2-Amino-pimelinsäure (182)**

Eine Lösung aus 5.3 g Natriumhydrid (0.21 mol) und 50 mL absolutem Ethanol wird langsam bei 0 °C unter Rühren zu einer Suspension aus 41.4 g Diethylacetamidomalonsäure (**176**) (0.191 mol) in 150 mL abs. Ethanol gegeben. Dabei bildet sich ein oranger, dicker Niederschlag. Anschließend werden unter kräftigem Rühren langsam 40.5 g 5-Bromvaleronitril (**178**) (0.25 mol) in 40 mL abs. Ethanol zugetropft und die Reaktionsmasse 16 h unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abrotiert und der Rückstand in 120 mL Ethylacetat und 100 mL H<sub>2</sub>O aufgenommen. Mit Hilfe von 5 % Zitronensäure wird der pH-Wert auf 4 eingestellt. Die wässrige Phase wird entfernt und die organische Phase mit H<sub>2</sub>O extrahiert (3x) und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Abdestillation des Ethylacetats im Vakuum und überschüssigem Bromvaleronitril im Hochvakuum (max. 60 °C) bleibt ein oranges Öl zurück. Zur Decarboxylierung und Verseifung versetzt man das Rohprodukt mit 100 mL H<sub>2</sub>O und 200 mL konz. HCl und rührt 16 h unter Rückfluss. Nach Abdestillation des Lösungsmittels (20 mbar, 80 °C) wird das Produkt in 60 mL H<sub>2</sub>O gelöst und mit Natronlauge auf pH 2.5-3 eingestellt. Die ausfallenden Kristalle werden nach Kristallisation im Kühlschrank abfiltriert, mit H<sub>2</sub>O (pH 3) gewaschen und in 100 mL H<sub>2</sub>O suspendiert. Durch Zugabe von Natronlauge werden die Kristalle in Lösung gebracht (pH 6) und durch Ansäuern mit konz. HCl (pH 2.5-3) und 100 mL Ethanol erneut gefällt. Nach Kühlung im Kühlschrank wird das Produkt abfiltriert, gewaschen (Ethanol/H<sub>2</sub>O 1:1, pH 3) und im Vakuum getrocknet. Man erhält 15.3 g (87.4 mmol, 46% d. Th.) an weißen Kristallen.

**Smp.** 219-220 °C.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{HCl}$  250 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 4.13$  (t, 1H,  $J = 6.3$  Hz,  $\text{H}_\alpha$ ); 2.46 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{H}_\epsilon$ ); 1.95-2.11 (m, 2H,  $\text{H}_\beta$ ); 1.63-1.79 (m, 2H,  $\text{H}_\delta$ ); 1.45-1.62 (m, 2H,  $\text{H}_\gamma$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{HCl}$ , 62.5 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 179.6$ ; 173.0; 53.6 ( $\text{C}_\alpha$ ); 34.1 ( $\text{C}_\epsilon$ ); 30.2 ( $\text{C}_\beta$ ); 24.5 ( $\text{C}_\gamma$ ); 24.5 ( $\text{C}_\delta$ ).

#### 5.4.28 Synthese von *rac*-2-Amino-pimelinsäure-7-benzylester (209)



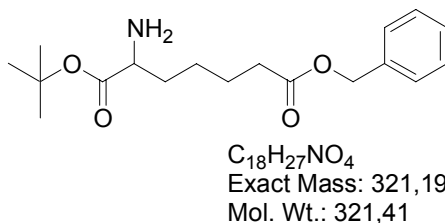
$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_4$   
Exact Mass: 265,13  
Mol. Wt.: 265,31

4.76 g 2-Amino-pimelinsäure (**182**) (27.2 mmol) und 4.0 g wasserfreies Natriumsulfat (wasserfrei) werden in 50 mL Benzylalkohol suspendiert. Zu dieser Mischung werden mit Hilfe einer Spritze 7.4 mL Tetrafluorborsäureetherat (54%ig, 54.4 mmol) zugegeben. Anschließend wird unter Luftausschluss über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 150 mL absolutem THF wird die Reaktionsmischung mit Hilfe von Kieselgur filtriert und langsam mit 8,2 mL Triethylamin (59.2 mmol) in 20 mL absolutem THF versetzt, worauf sich ein feiner Niederschlag bildet (pH 4). THF wird im Vakuum bis max. 50-60 °C abdestilliert. Der Rückstand wird in 200 mL Ethylacetat aufgeschlämmt, 10 min bei 60 °C gerührt, durch eine sehr feine Fritte abfiltriert und mit Ethylacetat gewaschen. Nach Trocknung im HV erhält man 5.96 g (22.5 mmol, 83% d. Th.) der Titelverbindung als weiße Kristalle.

**Smp.** 204-207 °C.

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , 250 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 7.42$  (s, 5H, Benzyl-Aromat); 5.14 (s, 2H, Benzyl- $\text{CH}_2$ ); 4.05 (t, 1H,  $J = 6.3$  Hz,  $\text{H}_\alpha$ ); 2.43 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{H}_\epsilon$ ); 1.79-2.05 (m, 2H,  $\text{H}_\beta$ ); 1.55-1.72 (m, 2H,  $\text{H}_\delta$ ); 1.33-1.52 (m, 2H,  $\text{H}_\gamma$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , 62.5 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 176.7$ ; 172.5; 136.2; 129.4; 129.2; 128.9; 67.5 (Benzyl- $\text{CH}_2$ ); 53.4 ( $\text{C}_\alpha$ ); 34.0 ( $\text{C}_\epsilon$ ); 29.9 ( $\text{C}_\beta$ ); 24.2 ( $\text{C}_\gamma$ ); 24.2 ( $\text{C}_\delta$ ).

#### 5.4.29 Synthese von *rac*-2-Amino-pimelinsäure-7-benzylester-1-*tert*-butylester (216)

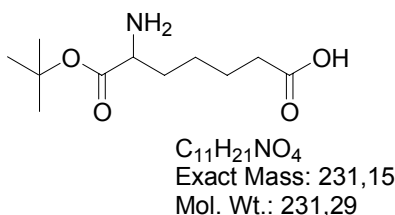


3.0 g 2-Amino-pimelinsäure-7-benzylester (**209**) (11.3 mmol) werden in 40 mL *tert*-Butylacetat suspendiert und durch langsame Zugabe von Perchlorsäure (70%ig) in Lösung gebracht. Die Lösung mit einem maximalen pH-Wert von 1.5-2 wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmasse wird im Anschluss in eine Mischung aus 2 g  $\text{NaHCO}_3$  und 40 mL  $\text{H}_2\text{O}$  eingerührt (Vorsicht: Gasentwicklung). Wichtig dabei ist heftiges Rühren und ein pH-Wert von 6-8. Die organische Phase wird mit 40 mL Ethylacetat verdünnt, zweimal mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung extrahiert und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Nach Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum bleiben 3.08 g (9.6 mmol, 85% d. Th.) der Titelverbindung als farbloses Öl zurück. Das Produkt ist instabil unter Sauerstoffeinfluss.

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 7.36$  (s, 5H, Benzyl-Aromat); 5.11 (s, 2H, Benzyl- $\text{CH}_2$ ); 3.32 (t, 1H,  $J = 6.3$  Hz,  $\text{H}_\alpha$ ); 2.37 (t, 2H,  $J = 7.3$  Hz,  $\text{H}_\epsilon$ ); 1.50-1.77 (m, 2H,  $\text{H}_\beta$ ); 1.62-1.74 (m, 2H,  $\text{H}_\delta$ ); 1.45 (s, 9H,  $^t\text{Bu}$ ); 1.35-1.48 (m, 2H,  $\text{H}_\gamma$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 62.5 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 175.1$ ; 173.3; 135.9 (Benzyl);

128.5 (Benzyl); 128.1 (Benzyl); 80.9 (<sup>t</sup>Bu<sub>q</sub>); 66.1 (Benzyl-CH<sub>2</sub>); 54.6 (C<sub>α</sub>); 34.4 (C<sub>β</sub>); 33.9 (C<sub>ε</sub>); 27.9 (<sup>t</sup>Bu); 26.1; 24.8 (C<sub>δ</sub>, C<sub>γ</sub>).

#### 5.4.30 Synthese von *rac*-2-Amino-pimelinsäure-1-*tert*-butylester (218)

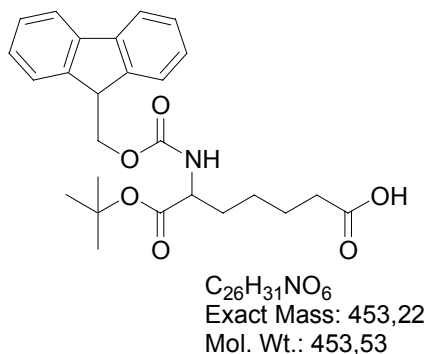


3.08 g 2-Amino-pimelinsäure-7-benzylester-1-*tert*-butylester (**216**) (9.6 mmol) werden in 100 mL *tert*-Butanol gelöst und mit 0.5 g Pd auf Kohle (5%, trocken) versetzt. Die Reaktionsmischung wird anschließend für 4 Stunden bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Dabei bildet sich ein dicker Brei, der notfalls mit weiterem *tert*-Butanol verdünnt werden muss. Nach Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum und Lösen des Rückstandes in verdünnter Natronlauge (max. pH 8) wird durch Kieselgur filtriert und das Wasser destillativ entfernt. Man erhält 2.1 g (9.1 mmol, 95% d. Th.) der Titelverbindung als weiße Kristalle.

**Smp.** 134-137 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, 250 MHz): δ(ppm) = 3.96 (t, 1H, J = 6.4 Hz, H<sub>α</sub>); 2.25 (t, 2H, J = 7.2 Hz, H<sub>ε</sub>); 1.85-2.05 (m, 2H, H<sub>β</sub>); 1.57-1.74 (m, 2H, H<sub>δ</sub>); 1.45 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu); 1.37-1.50 (m, 2H, H<sub>γ</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, 62.5 MHz): δ(ppm) = 184.0; 170.6; 86.2 (<sup>t</sup>Bu<sub>q</sub>); 54.6 (C<sub>α</sub>); 37.8 (C<sub>ε</sub>); 30.7 (C<sub>β</sub>); 27.9 (<sup>t</sup>Bu); 25.0 (C<sub>γ</sub>); 24.6 (C<sub>δ</sub>).

### 5.4.31 Synthese von *rac*-2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-heptandisäure-1-*tert*-butylester (193), *rac*-N-Fmoc-2-amino-pimelinsäure-1-*tert*-butylester



5,0 g 2-Amino-pimelinsäure-1-*tert*-butylester (**218**) (21.6 mmol), 2.4 g  $NaHCO_3$  (28.6 mmol) und 7.7 g Fmoc-ONSu (22.8 mmol) werden in 80 mL Aceton/  $H_2O$  (1:1) 16 h bei RT gerührt. Anschließend wird mit 2N HCl-Lösung auf pH 2.5 angesäuert und das Aceton im Vakuum verdampft. Nach dreimaliger Extraktion mit EE werden die vereinigten organischen Phasen über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Nach Flashchromatographie (EE/ Hex 1:3, 1% AcOH) erhält man 8.9 g (19.6 mmol, 91% d. Th.) der Titelverbindung als weißer Feststoff.

**DC** (EE/ Hex 1:3):  $R_f = 0.3$ ,

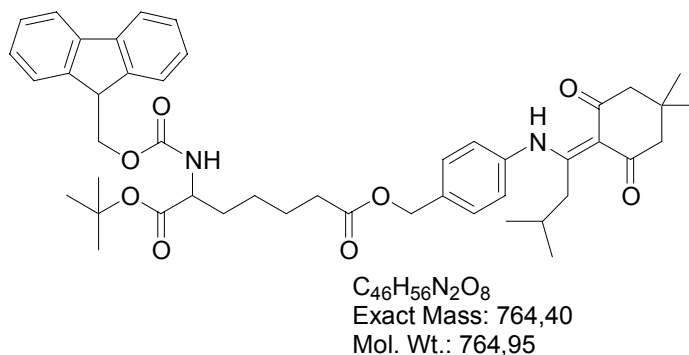
**HPLC** (10 – 90%): 27.44 min,

**ESI-MS**  $m/z = 476.1 [m+Na]^+$ ,  $498.1 [m-H+2Na]^+$ ,  $951.1 [2m-H+2Na]^+$ ,  $973.2 [2m-2H+2Na]^+$ .

**$^1H$ -NMR** ( $CDCl_3$ , 500 MHz):  $\delta$ (ppm) = 7.74 (d, 2H,  $J = 7.3$  Hz, Fmoc-Aromat); 7.58 (d, 2H,  $J = 7.3$  Hz, Fmoc-Aromat); 7.24-7.42 (m, 4H, Fmoc-Aromat); 5.39 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz, Fmoc-NH); 4.37 (d, 2H,  $J = 6.9$  Hz, Fmoc- $CH_2$ ); 4.21-4.31 (m, 1H,  $H_\alpha$ ); 4.20 (t, 1H,  $J = 7.0$  Hz, Fmoc-CH); 2.33 (t, 2H,  $J = 7.3$  Hz,  $H_\epsilon$ ); 1.58-1.71/ 1.77-1.90 (m, 2H,  $H_\beta$ ); 1.58-1.75 (m, 2H,  $H_\delta$ ); 1.45 (s, 9H,  $tBu$ ); 1.29-1.41 (m, 2H,  $H_\gamma$ ).  **$^{13}C$ -NMR** ( $CDCl_3$ , 125 MHz):  $\delta$ (ppm) =

178.7; 171.6; 155.8 (Fmoc); 143.8 (Fmoc); 141.3 (Fmoc); 127.7 (Fmoc); 127.0 (Fmoc); 125.1 (Fmoc); 119.9 (Fmoc); 82.2 (<sup>t</sup>Bu<sub>q</sub>); 67.0 (Fmoc-CH<sub>2</sub>); 54.1 (C<sub>α</sub>); 47.3 (Fmoc-CH); 33.7 (C<sub>ε</sub>); 32.5 (C<sub>β</sub>); 27.9 (<sup>t</sup>Bu); 24.5 (C<sub>γ</sub>); 24.3 (C<sub>δ</sub>).

**5.4.32 Synthese von *rac*-2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-heptandisäure-1-*tert*-butylester-7-{4-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-3-methyl-butylamino]-benzylester (199), *rac*-N-Fmoc-2-amino-pimelinsäure-1-*tert*-butylester-7-Dmab-ester**



4.9 g 2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-heptandisäure-1-*tert*-butylester (**193**) (10.8 mmol), 2.85 g Dmab-OH (**187**) (8.7 mmol), 1.66 g 1-Hydroxy-benzotriazol-hydrat (10.8 mmol) und 4.95 g N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid (25.8 mmol) werden in 80 mL trockenem THF gelöst und nach Zugabe von 4.5 mL Collidin (34.5 mmol) für 16 h bei RT °C gerührt. Anschließend wird das THF im Vakuum destillativ entfernt, der Rückstand in Chloroform gelöst und die organische Phase mit Acetatpuffer (3x) und mit NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (3x) gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über MgSO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Man erhält 3.36 g (4.4 mmol, 51% d. Th.) der Titelsubstanz als gelblichen Feststoff nach Aufreinigung durch Flashchromatographie (EE/ Hex 3:7).

**Smp.** 50 –52 °C,

**DC** (EE/ Hex 4:6): R<sub>f</sub> = 0.46,

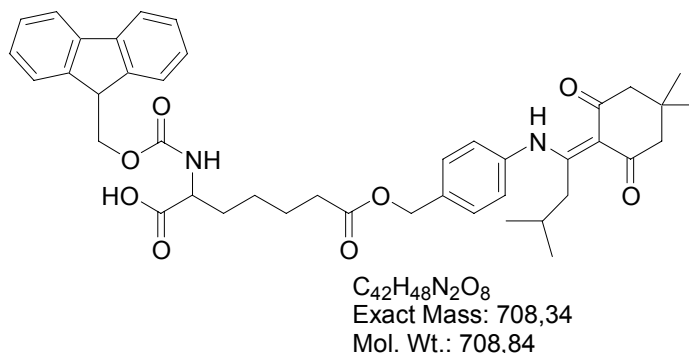


**HPLC** (10 – 90%): 36.02 min,

**ESI-MS**  $m/z = 765.4 [m+H]^+$ ,  $787.4 [m+Na]^+$ ,  $1529.5 [2m+H]^+$ ,  $1551.6 [2m+Na]^+$ .

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 15.28$  (s, 1H, Dmab-NH); 7.74 (d, 2H,  $J = 7.3$  Hz, Fmoc-Aromat); 7.58 (d, 2H,  $J = 7.3$  Hz, Fmoc-Aromat); 7.24-7.42 (m, 4H, Fmoc-Aromat); 7.37 (d, 2H,  $J = 7.1$  Hz, Dmab-Aromat); 7.10 (d, 2H,  $J = 7.1$  Hz, Dmab-Aromat); 5.31 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, Fmoc-NH); 5.11 (s, 2H, Benzyl- $\text{CH}_2$ ); 4.37 (d, 2H,  $J = 7.0$  Hz, Fmoc- $\text{CH}_2$ ); 4.20-4.30 (m, 1H,  $\text{H}_\alpha$ ); 4.21 (t, 1H,  $J = 7.0$  Hz, Fmoc-CH); 2.98 (d, 2H,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 2.45 (s, 4H, 2x  $\text{CH}_2$ ); 2.38 (t, 2H,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{H}_\epsilon$ ); 1.75-1.90 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 1.60-1.72, 1.78-1.90 (m, 2H,  $\text{H}_\beta$ ); 1.60-1.74 (m, 2H,  $\text{H}_\delta$ ); 1.46 (s, 9H,  $^t\text{Bu}$ ); 1.29-1.45 (m, 2H,  $\text{H}_\gamma$ ); 1.07 (s, 6H, 2x  $\text{CH}_3$ ); 0.76 (d, 6H,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 176.4$ ; 173.1; 171.5; 155.8 (Fmoc); 143.8 (Fmoc); 141.3 (Fmoc); 136.8 (Dmab); 135.6 (Dmab); 129.0 (Dmab); 127.7 (Fmoc); 127.0 (Fmoc); 126.6 (Dmab); 125.1 (Fmoc); 119.9 (Fmoc); 107.8 (Dmab); 82.2 ( $^t\text{Bu}_q$ ); 66.9 (Fmoc- $\text{CH}_2$ ); 65.3 (Benzyl- $\text{CH}_2$ ); 54.1 ( $\text{C}_\alpha$ ); 52.9 (2x  $\text{CH}_2$ ); 47.2 (Fmoc-CH); 38.3 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 33.9 ( $\text{C}_\epsilon$ ); 32.6 ( $\text{C}_\beta$ ); 30.0 (Dmab); 29.6 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 28.3 (2x  $\text{CH}_3$ ); 28.1 ( $^t\text{Bu}$ ); 24.6 ( $\text{C}_\gamma$ ); 24.5 ( $\text{C}_\delta$ ); 22.6 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

**5.4.33 Synthese von *rac*-2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-heptandisäure-7-{4-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxo-cyclohexylidene)-3-methyl-butylamino]-benzylester (205), *rac*-N-Fmoc-2-amino-pimelinsäure-7-Dmab-ester**



3.3 g N-Fmoc-2-amino-pimelinsäure-1-*tert*-butylester-7-Dmab-ester (**199**) (4.3 mmol) werden in 20 mL DCM und 20 mL TFA gelöst und für 2 h bei RT gerührt. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in EE gelöst, mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen (2x) und die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das Rohprodukt aus <sup>1</sup>BuOH lyophilisiert. Man erhält 3.04 g (4.3 mmol, 100% d. Th.) der Titelsubstanz als weißen Feststoff (Reinheit > 98%).

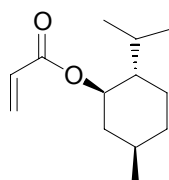
**HPLC** (10 – 90%): 31.23 min,

**ESI-MS**  $m/z = 709.3 [m+H]^+$ ,  $731.3 [m+Na]^+$ ,  $1439.4 [2m+Na]^+$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$ (ppm) = 15.28 (s, 1H, Dmab-NH); 7.72 (d, 2H,  $J = 7.3$  Hz, Fmoc-Aromat); 7.58 (d, 2H,  $J = 7.3$  Hz, Fmoc-Aromat); 7.24-7.42 (m, 4H, Fmoc-Aromat); 7.36 (d, 2H,  $J = 7.1$  Hz, Dmab-Aromat); 7.09 (d, 2H,  $J = 7.1$  Hz, Dmab-Aromat); 5.74 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, Fmoc-NH); 5.08 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>); 4.39 (d, 2H,  $J = 7.0$  Hz, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.28-4.38 (m, 1H, H<sub>α</sub>); 4.19 (t, 1H,  $J = 7.0$  Hz, Fmoc-CH); 3.02 (d, 2H,  $J = 6.8$  Hz, CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 2.44/2.52 (s, 4H, 2x CH<sub>2</sub>); 2.34 (t, 2H,  $J = 7.4$  Hz, H<sub>ε</sub>); 1.78-1.93 (m, 1H,

$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 1.64-1.76/ 1.82-1.94 (m, 2H,  $\text{H}_\beta$ ); 1.57-1.71 (m, 2H,  $\text{H}_\delta$ ); 1.34-1.50 (m, 2H,  $\text{H}_\gamma$ ); 1.09 (s, 6H, 2x  $\text{CH}_3$ ); 0.77 (d, 6H,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 200.0$ ; 196.5; 176.4; 173.1; 156.3 (Fmoc); 143.6 (Fmoc); 141.0 (Fmoc); 136.4 (Dmab); 135.5 (Dmab); 128.8 (Dmab); 127.5 (Fmoc); 126.9 (Fmoc); 126.4 (Dmab); 125.0 (Fmoc); 119.8 (Fmoc); 107.5 (Dmab); 67.1 (Fmoc- $\text{CH}_2$ ); 65.2 (Benzyl- $\text{CH}_2$ ); 54.3 ( $\text{C}_\alpha$ ); 52.3/ 53.7 (2x  $\text{CH}_2$ ); 47.2 (Fmoc- $\text{CH}$ ); 38.4 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 34.0 ( $\text{C}_\epsilon$ ); 32.0 ( $\text{C}_\beta$ ); 30.0 (Dmab); 29.3 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ); 28.2 (2x  $\text{CH}_3$ ); 24.9 ( $\text{C}_7$ ); 24.3 ( $\text{C}_\delta$ ); 22.6 ( $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

#### 5.4.34 Synthese von Acrylsäure 2-isopropyl-5-methyl-cyclohexylester (223), (-)-Menthylacrylat



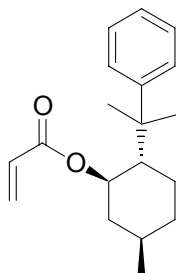
$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_2$   
Exact Mass: 210,16  
Mol. Wt.: 210,31

7.81 g Menthol (**221**) (0.05 mol) werden in 50 mL trockenem THF gelöst und unter Argon bei 0 °C mit 4.85 mL Acrylsäurechlorid (0.06 mol) versetzt. Anschließend werden 10.5 mL Triethylamin (0.075 mol) unter Kühlung zugegeben und die Mischung 2 h nachgerührt. Nach Ansäuern mit Acetat-Puffer (pH 4) wird das THF im Vakuum abdestilliert und der Rückstand mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Man erhält 6.4 g (0.03 mol, 61% d. Th.) der Titelverbindung als farblose Flüssigkeit nach Destillation des Rohprodukts (gelbes Öl) im HV (1 mbar, 74-78 °C, Zugabe von Hydrochinon zur Stabilisierung).

**HPLC** (50 – 100%): 21.2 min.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 6.38 (dd, 1H, J = 1.5/17.4 Hz, CH<sup>1</sup>H<sup>2</sup>-Acrylat); 6.11 (dd, 1H, J = 10.5/17.4 Hz, CH-Acrylat); 5.79 (dd, 1H, J = 1.4/10.3 Hz, CH<sup>1</sup>H<sup>2</sup>-Acrylat); 4.76 (m, 1H, C(1)H); 2.04/ 1.02 (2x m, 2H, C(6)H<sub>2</sub>); 1.87 (m, 1H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 1.70/ 1.09 (2x m, 2H, C(3)H<sub>2</sub>); 1.70/ 0.89 (2x m, 2H, C(4)H<sub>2</sub>); 1.51 (m, 1H, C(5)H); 1.42 (m, 1H, C(2)H); 0.91 (d, 3H, J = 6.9 Hz, CH-CH<sub>3</sub>); 0.89/ 0.77 (2x d, 6H, J = 7.0 Hz, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz, HSQC): δ(ppm) = 130.3 (CH<sub>2</sub>-Acrylat); 129.2 (CH-Acrylat); 74.6 (C(1)); 47.4 (C(2)); 41.3 (C(6)); 34.6 (C(4)); 31.6 (C(5)); 26.7 (C-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 23.8 (C(3)); 22.4 (C(5)-CH<sub>3</sub>); 20.9/ 16.7 (C-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### 5.4.35 Synthese von [1*R*,2*S*,5*R*]-2-(1-Methyl-1-phenylethyl)-5-methyl-cyclohexylacrylat (**224**), (-)-8-Phenylmenthylacrylat



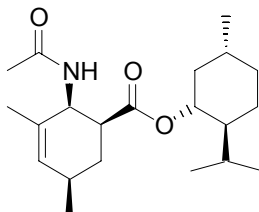
C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>  
 Exact Mass: 286,19  
 Mol. Wt.: 286,41

5.0 g (-)-8-Phenylmenthol (**222**) (21.6 mmol) werden in 40 mL trockenem THF gelöst und unter Argon bei 0 °C mit 2.2 mL Acrylsäurechlorid (27.2 mmol) versetzt. Anschließend werden 5.3 mL Triethylamin (38.3 mmol) unter Kühlung zugegeben und die Mischung 2 h nachgerührt. Nach Ansäuern mit Acetat-Puffer (pH = 4) wird das THF im Vakuum abdestilliert und der Rückstand mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Man erhält 4.5 g (15.8 mmol, 73% d. Th.) der Titelverbindung als farblose Flüssigkeit nach Flashchromatographie (EE/ Hex 1:4) des Rohprodukts (gelbes Öl).

**HPLC** (50 – 100%): 23.6 min.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 7.29-7.22 (m, 4H, Aromat); 7.10 (t, 1H, J = 6.7 Hz, Aromat); 6.01 (dd, 1H, J = 14.2/4.6 Hz, CH<sup>1</sup>H<sup>2</sup>-Acrylat); 5.59 (dd, 1H, J = 10.5/20.1 Hz, CH-Acrylat); 5.57-5.56 (m, 1H, CH<sup>1</sup>H<sup>2</sup>-Acrylat); 4.88 (m, 1H, C(1)H); 2.08-2.02 (m, 1H, C(2)H); 1.93/ 0.99 (2x m, 2H, C(6)H<sub>2</sub>); 1.68/ 1.11 (2x m, 2H, C(3)H<sub>2</sub>); 1.64/ 0.88 (2x m, 2H, C(4)H<sub>2</sub>); 1.49 (m, 1H, C(5)H); 1.31 (s, 3H, C-CH<sub>3</sub>); 1.23 (s, 3H, C-CH<sub>3</sub>); 0.87 (d, 3H, J = 6.6 Hz, C(5)H-CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz, HSQC): δ(ppm) = 130.3 (CH<sub>2</sub>-Acrylat); 129.2 (CH-Acrylat); 128.2 (Aromat); 125.6 (Aromat); 125.2 (Aromat); 75.0 (C(1)); 51.0 (C(2)); 42.0 (C(6)); 35.0 (C(4)); 31.6 (C(5)); 27.9 (C-CH<sub>3</sub>); 27.0 (C(3)); 25.6 (C-CH<sub>3</sub>); 22.0 (C(5)-CH<sub>3</sub>).

#### 5.4.36 Synthese von [1*S*, 2*S*, 5*R*]-2-Acetylamino-3,5-diethyl-cyclohex-3-en-carbonsäure-menthylester (**231**)



C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>3</sub>  
Exact Mass: 349,26  
Mol. Wt.: 349,51

0.59 g Acetamid (**227**) (10 mmol), 0.65 g Propionaldehyd (**225**) (10 mmol), 1.58 mL Acetanhydrid (17 mmol), 2.1 g Menthylacrylat (**223**) (10 mmol), 8 mL DMF, 0.05 g Camphersulfonsäure und 0.05 g BHT werden in einen Druckreaktor gegeben und 16 h bei 160 °C gerührt. Vom Rohprodukt werden anschließend alle flüchtigen Bestandteile im HV abdestilliert. Nach Flashchromatographie (EE/ Hex 1:3) erhält man 0.38 g (1.1 mmol, 22% d. Th.) der Titelverbindung als farbloses Öl.

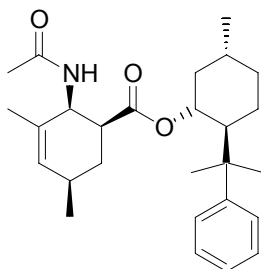
**DC** (EE/Hex 1:3): R<sub>f</sub> = 0.3,

**HPLC** (50 – 100%): 17.75 min,

**ESI-MS** m/z = 350.2 [m+H]<sup>+</sup>; 372.2 [m+Na]<sup>+</sup>; **FAB-HRMS**: 349.2616.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 5.40 (d, 1H, J = 10.2 Hz, NH); 5.38 (s, 1H, CH(4)); 4.81 (dd, 1H, J = 5.0/10.2 Hz, C(2)H); 4.65 (m, 1H, CH(1)-Menthol); 2.75 (m, 1H, C(1)H); 2.18 (m, 1H, C(5)H); 1.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Acetyl); 1.97/ 1.15 (2x m, 2H, C(6)H<sub>2</sub>); 1.85/ 0.98 (2x m, 2H, C(6)H<sub>2</sub>-Menthol); 1.84 (m, 1H, CH-C(2)-Menthol); 1.70 (s, 3H, C(3)-CH<sub>3</sub>); 1.67/ 0.87 (2x m, 2H, C(4)H<sub>2</sub>-Menthol); 1.66/ 1.04 (2x m, 2H, C(3)H<sub>2</sub>-Menthol); 1.45 (m, 1H, C(5)H-Menthol); 1.41 (m, 1H, C(2)H-Menthol); 1.03 (d, 3H, J = 7.2 Hz, C(5)-CH<sub>3</sub>); 0.90/ 0.74 (2x d, 6H, J = 6.9 Hz, CH<sub>3</sub>-Menthol); 0.90 (d, 3H, J = 7.2 Hz, C(5)-CH<sub>3</sub>-Menthol). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz, HSQC): δ(ppm) = 132.2 (C(4)); 75.1 (C(1)-Menthol); 47.6 (C(2)); 46.9 (C(2)-Menthol); 44.6 (C(1)); 40.5 (C(6)-Menthol); 34.5 (C(4)-Menthol); 31.7 (C(5)-Menthol); 30.9 (C(5)); 29.0 (C(6)); 26.7 (C-C(2)-Menthol); 23.9 (C(3)-Menthol); 23.5 (CH<sub>3</sub>-Acetyl); 22.3 (C(5)-CH<sub>3</sub>-Menthol); 21.8 (C(5)-CH<sub>3</sub>); 21.1 (CH<sub>3</sub>-Menthol); 21.0 (C(3)-CH<sub>3</sub>); 16.8 (CH<sub>3</sub>-Menthol).

#### 5.4.37 Synthese von [1*S*, 2*S*, 5*R*]-2-Acetylamino-3,5-diethyl-cyclohex-3-en-carbonsäure(-)-8-phenylmenthylester (232)



C<sub>27</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>3</sub>  
Exact Mass: 425,29  
Mol. Wt.: 425,60

0.59 g Acetamid (**227**) (10 mmol), 1.2 g Propionaldehyd (**225**) (21 mmol), 1.58 mL Acetanhydrid (17 mmol), 3.0 g (-)-8-Phenylmenthylacrylat (**224**) (10.5 mmol), 8 mL DMF, 0.05 g Camphersulfonsäure und 0.05 g BHT werden in einen Druckreaktor gegeben und 16 h bei 160 °C gerührt. Vom Rohprodukt werden anschließend alle flüchtigen Bestandteile im HV abdestilliert. Nach Flashchromatographie (EE/ Hex 1:3) erhält man die Titelverbindung als farbloses Öl.

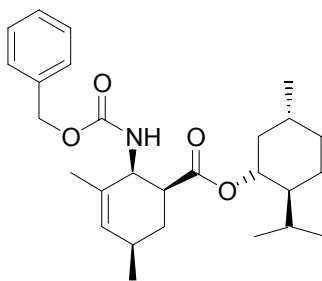
**DC** (EE/Hex = 1:3): Rf = 0.33,

**HPLC** (50 – 100%): 19.8 min,

**ESI-MS** m/z = 426.2 [m+H]<sup>+</sup>; 448.3 [m+Na]<sup>+</sup>; **FAB-HRMS**: 425.2930.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 7.33-7.22 (m, 4H, Aromaten); 7.07 (t, 1H, J = 7 Hz, CH-Aromat); 5.29 (s, 1H, CH(4)); 5.26 (d, 1H, J = 10.2 Hz, NH); 4.76 (m, 1H, CH(1)-Menthol); 4.33 (dd, 1H, J = 4.9/10.2 Hz, C(2)H); 2.12 (m, 1H, C(2)H-Menthol); 1.99 (m, 1H, C(5)H); 1.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Acetyl); 1.80/ 1.14 (2x m, 2H, C(3)H<sub>2</sub>-Menthol); 1.76/ 0.92 (2x m, 2H, C(6)H<sub>2</sub>); 1.67/ 0.96 (2x m, 2H, C(6)H<sub>2</sub>-Menthol); 1.65/ 0.90 (2x m, 2H, C(4)H<sub>2</sub>-Menthol); 1.62 (m, 1H, C(1)H); 1.60 (s, 3H, C(3)-CH<sub>3</sub>); 1.43 (m, 1H, C(5)H-Menthol); 1.29/ 1.18 (2x s, 6H, CH<sub>3</sub>-Menthol); 0.99 (d, 3H, J = 7.2 Hz, C(5)-CH<sub>3</sub>); 0.87 (d, 3H, J = 7.2 Hz, C(5)-CH<sub>3</sub>-Menthol). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz, HSQC): δ(ppm) = 132.0 (C(4)); 128.1/ 125.7/ 125.2 (Aromaten); 74.7 (C(1)-Menthol); 50.3 (C(2)-Menthol); 47.6 (C(2)); 44.0 (C(1)); 41.3 (C(6)-Menthol); 34.8 (C(4)-Menthol); 31.7 (C(5)-Menthol); 30.7 (C(5)); 29.9 (CH<sub>3</sub>-Menthol); 28.6 (C(6)); 26.8 (C(3)-Menthol); 23.7 (CH<sub>3</sub>-Menthol); 23.5 (CH<sub>3</sub>-Acetyl); 22.1 (C(5)-CH<sub>3</sub>-Menthol); 21.7 (C(5)-CH<sub>3</sub>); 20.9 (C(3)-CH<sub>3</sub>).

### 5.4.38 Synthese von [1*S*, 2*S*, 5*R*]-2-Benzoyloxycarbonylamino-3,5-diethylcyclohex-3-en-carbonsäure-menthylester (**233**)



C<sub>27</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>4</sub>  
 Exact Mass: 441,29  
 Mol. Wt.: 441,60

1.51 g Carbaminsäurebenzylester (**228**) (10 mmol), 0.65 g Propionaldehyd (**225**) (12 mmol), 1.5 mL Acetanhydrid (16 mmol), 2.1 g Menthylacrylat (**223**) (10 mmol), 8 mL DMF, 0.05 g Camphersulfonsäure und 0.05 g BHT werden in einen Druckreaktor gegeben und 16 h bei 160 °C gerührt. Vom Rohprodukt werden anschließend alle flüchtigen Bestandteile im HV abdestilliert. Nach Flashchromatographie (EE/ Hex 1:10) erhält man 0.35 g (0.8 mmol, 13% d. Th.) der Titelverbindung als farbloses Öl.

**DC** (EE/Hex 1:10): R<sub>f</sub> = 0.25,

**HPLC** (50 – 100%): 26.65 min,

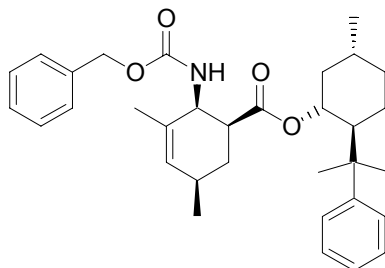
**ESI-MS** m/z = 442.2 [m+H]<sup>+</sup>; 464.4 [m+Na]<sup>+</sup>; 905.3 [2m+Na]<sup>+</sup>; **FAB-HRMS**: 441.2877.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 7.41-7.23 (m, 5H, Aromaten); 5.35 (s, 1H, CH(4)); 5.17/ 4.96 (2x d, 2H, J = 12.2 Hz, CH<sub>2</sub>-Benzyl); 4.78 (d, 1H, J = 10.4 Hz, NH); 4.69 (m, 1H, CH(1)-Menthol); 4.50 (dd, 1H, J = 4.9/10.4 Hz, C(2)H); 2.74 (m, 1H, C(1)H); 2.14 (m, 1H, C(5)H); 1.88/ 0.99 (2x m, 2H, C(6)H<sub>2</sub>-Menthol); 1.82 (m, 1H, CH-C(2)-Menthol); 1.79/ 1.10 (2x m, 2H, C(6)H<sub>2</sub>); 1.70 (s, 3H, C(3)-CH<sub>3</sub>); 1.66/ 1.03 (2x m, 2H, C(3)H<sub>2</sub>-Menthol); 1.66/ 0.86 (2x m, 2H, C(4)H<sub>2</sub>-Menthol); 1.44 (m, 1H, C(5)H-Menthol); 1.39 (m, 1H, C(2)H-Menthol); 1.00 (d, 3H, J = 7.0 Hz, C(5)-CH<sub>3</sub>); 0.88/ 0.74 (2x d, 6H, J =



6.9 Hz, CH<sub>3</sub>-Menthol); 0.86 (d, 3H, J = 7.2 Hz, C(5)-CH<sub>3</sub>-Menthol). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz, HSQC): δ(ppm) = 132.0 (C(4)); 129.3-127.4 (Aromaten); 75.2 (C(1)-Menthol); 67.4 (CH-Benzyl); 50.0 (C(2)); 47.2 (C(2)-Menthol); 45.0 (C(1)); 40.4 (C(6)-Menthol); 34.5 (C(4)-Menthol); 31.8 (C(5)-Menthol); 30.9 (C(5)); 28.8 (C(6)); 26.6 (C-C(2)-Menthol); 23.7 (C(3)-Menthol); 22.4 (C(5)-CH<sub>3</sub>-Menthol); 21.8 (C(5)-CH<sub>3</sub>); 21.2 (CH<sub>3</sub>-Menthol); 21.0 (C(3)-CH<sub>3</sub>); 16.7 (CH<sub>3</sub>-Menthol).

#### 5.4.39 Synthese von [1*S*, 2*S*, 5*R*]-2-Benzoyloxycarbonylamino-3,5-diethylcyclohex-3-en-carbonsäure(-)-8-phenylmenthylester (**234**)



C<sub>33</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>4</sub>  
Exact Mass: 517,32  
Mol. Wt.: 517,70

1.51 g Carbaminsäurebenzylester (**228**) (10 mmol), 0.4 g Propioaldehyd (**225**) (6.9 mmol), 0.65 mL Acetanhydrid (6.9 mmol), 0.5 g (-)-8-Phenylmenthylacrylat (**224**) (1.7 mmol), 8 mL DMF, 0.05 g Camphersulfonsäure und 0.05 g BHT werden in einen Druckreaktor gegeben und bei 160 °C gerührt. Nach 6 h werden weitere 0.35 g Propioaldehyd (6.0 mmol) und 0.6 mL Acetanhydrid (6.4 mmol) zugegeben und für 10 h bei 160 °C gerührt. Vom Rohprodukt werden anschließend alle flüchtigen Bestandteile im HV abdestilliert. Nach Flashchromatographie (EE/ Hex 1:20) erhält man 195 mg (0.38 mmol, 22% d. Th.) der Titelverbindung als farbloses Öl.

**DC** (EE/Hex 1:10): R<sub>f</sub> = 0.32,

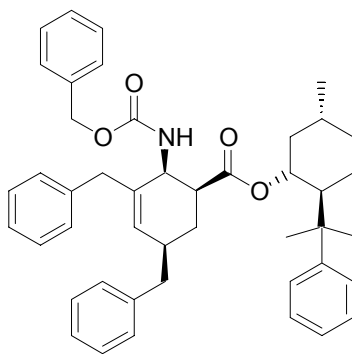
**HPLC** (50 – 100%): 27.69 min,

**ESI-MS** m/z = 518.3 [m+H]<sup>+</sup>; 540.4 [m+Na]<sup>+</sup>; 1057.3 [2m+Na]<sup>+</sup>;

**FAB-HRMS:** 517.3195.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 7.34-7.23 (m, 9H, Aromaten); 7.07 (t, 1H, J = 7 Hz, CH-Aromat); 5.24 (s, 1H, CH(4)); 5.13/ 4.91 (2x d, 2H, J = 12.2 Hz, CH<sub>2</sub>-Benzyl); 4.80 (m, 1H, CH(1)-Menthol); 4.49 (d, 1H, J = 10.6 Hz, NH); 4.00 (dd, 1H, J = 4.9/10.6 Hz, C(2)H); 2.15 (m, 1H, C(2)H-Menthol); 1.97 (m, 1H, C(5)H); 1.80/ 1.15 (2x m, 2H, C(3)H<sub>2</sub>-Menthol); 1.77/ 1.01 (2x m, 2H, C(6)H<sub>2</sub>-Menthol); 1.75/ 0.84 (2x m, 2H, C(6)H<sub>2</sub>); 1.67/ 0.92 (2x m, 2H, C(4)H<sub>2</sub>-Menthol); 1.67 (m, 1H, C(1)H); 1.63 (s, 3H, C(3)-CH<sub>3</sub>); 1.42 (m, 1H, C(5)H-Menthol); 1.31/ 1.19 (2x s, 6H, CH<sub>3</sub>-Menthol); 0.96 (d, 3H, J = 7.2 Hz, C(5)-CH<sub>3</sub>); 0.83 (d, 3H, J = 7.2 Hz, C(5)-CH<sub>3</sub>-Menthol). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz, HSQC): δ(ppm) = 131.5 (C(4)); 129.1-124.8 (Aromaten); 74.5 (C(1)-Menthol); 67.0 (CH-Benzyl); 50.2 (C(2)-Menthol); 49.5 (C(2)); 44.3 (C(1)); 41.0 (C(6)-Menthol); 34.7 (C(4)-Menthol); 31.6 (C(5)-Menthol); 30.6 (C(5)); 29.5 (CH<sub>3</sub>-Menthol); 28.3 (C(6)); 26.6 (C(3)-Menthol); 23.7 (CH<sub>3</sub>-Menthol); 22.2 (C(5)-CH<sub>3</sub>-Menthol); 21.7 (C(5)-CH<sub>3</sub>); 20.9 (C(3)-CH<sub>3</sub>).

#### 5.4.40 Synthese von [1*S*, 2*S*, 5*R*]-2-Benzylloxycarbonylamino-3,5-dibenzyl-cyclohex-3-en-carbonsäure-(-)-8-phenylmenthylester (**235**)



C<sub>45</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>4</sub>  
Exact Mass: 669,38  
Mol. Wt.: 669,89

1.51 g Carbaminsäurebenzylester (**228**) (10 mmol), 1.74 g Propionaldehyd (**225**) (13 mmol), 1.2 mL Acetanhydrid (12.7 mmol), 0.5 g (-)-8-

Phenylmenthylacrylat (**224**) (1.7 mmol), 8 mL DMF, 0.05 g Camphersulfonsäure und 0.05 g BHT werden in einen Druckreaktor gegeben und 16 h bei 160 °C gerührt. Vom Rohprodukt werden anschließend alle flüchtigen Bestandteile im HV abdestilliert. Nach Flashchromatographie (EE/Hex 1:20) erhält man 197 mg (0.29 mmol, 17% d. Th.) der Titelverbindung als farbloses Öl.

**DC** (EE/Hex = 1 :10): Rf = 0.25,

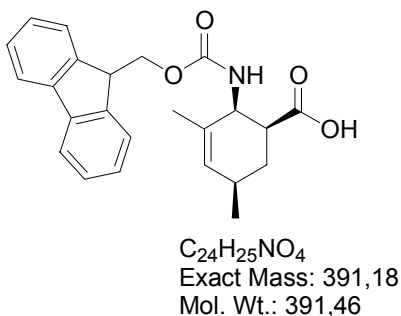
**HPLC** (80 – 100%): 19.9 min,

**ESI-MS** m/z = 670.3 [m+H]<sup>+</sup>; 692.4 [m+Na]<sup>+</sup>; 1361.3 [2m+Na]<sup>+</sup>;

**FAB-HRMS**: 669.3819.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 7.41-6.87 (m, 20H, Aromaten); 5.37 (s, 1H, CH(4)); 5.06/ 4.87 (2x d, 2H, J = 12.2 Hz, CH<sub>2</sub>-Z); 4.71 (m, 1H, CH(1)-Menthol); 4.40 (d, 1H, J = 10.6 Hz, NH); 4.06 (dd, 1H, J = 4.6/10.6 Hz, C(2)H); 3.21 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C(3)); 2.60/ 2.51 (2x dd, 2H, J = 7.2/13.5, CH<sub>2</sub>-C(5)); 2.18 (m, 1H, C(5)H); 2.12 (m, 1H, C(2)H-Menthol); 1.81/ 1.13 (2x m, 2H, C(3)H<sub>2</sub>-Menthol); 1.73/ 0.97 (2x m, 2H, C(6)H<sub>2</sub>-Menthol); 1.70/ 0.94 (2x m, 2H, C(6)H<sub>2</sub>); 1.64/ 0.90 (2x m, 2H, C(4)H<sub>2</sub>-Menthol); 1.46 (m, 1H, C(1)H); 1.42 (m, 1H, C(5)H-Menthol); 1.22/ 1.12 (2x s, 6H, CH<sub>3</sub>-Menthol); 0.80 (d, 3H, J = 7.2 Hz, C(5)-CH<sub>3</sub>-Menthol). **<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz, HSQC): δ(ppm) = 130.8 (C(4)); 130.2-124.5 (Aromaten); 74.6 (C(1)-Menthol); 67.2 (CH-Z); 50.1 (C(2)-Menthol); 48.5 (C(2)); 44.1 (C(1)); 42.8 (C(5)-CH<sub>2</sub>); 41.1 (C(3)-CH<sub>3</sub>); 41.0 (C(6)-Menthol); 37.8 (C(5)); 34.8 (C(4)-Menthol); 30.6 (C(5)-Menthol); 30.1 (CH<sub>3</sub>-Menthol); 26.6 (C(3)-Menthol); 26.0 (C(6)); 23.1 (CH<sub>3</sub>-Menthol); 22.1 (C(5)-CH<sub>3</sub>-Menthol).

#### 5.4.41 Synthese von [1*S*, 2*S*, 5*R*]-3,5-Diethyl-2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxy-carbonylamino)-cyclohex-3-en-carbonsäure (236)



0.2 g [1*S*, 2*S*, 5*R*]-2-Benzylloxycarbonylamino-3,5-diethyl-cyclohex-3-en-carbonsäure(-)-8-phenylmenthylester (**234**) (0.39 mmol) werden in 12 mL TFA und 1 mL TFMSA für 2 h bei RT gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird der Rückstand in 15 mL gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 10 mL THF gelöst und nach Zugabe von 118 mg Fmoc-ONSu (0.35 mmol) für 10 h bei RT gerührt. Anschließend wird mit 2N HCl-Lösung der pH-Wert auf 2 eingestellt, das THF am Rotationsverdampfer im Vakuum abdestilliert und dreimal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Man erhält 98 mg (0.25 mmol, 64% d. Th.) der Titelverbindung als farblose Kristalle nach Flashchromatographie (EE/ Hex 1:4, 1% AcOH).

**Smp.** 78-80 °C (Zersetzung),

**DC** (EE/Hex 2:3, 1% AcOH): R<sub>f</sub> = 0.39,

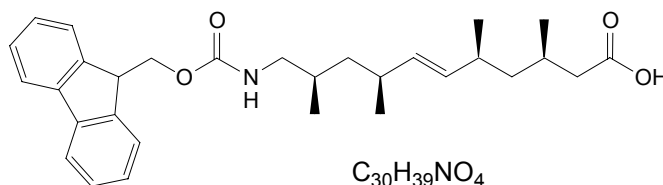
**HPLC** (10 – 90%): 25.2 min,

**ESI-MS** m/z = 392.2 [m+H]<sup>+</sup>; 414.2 [m+Na]<sup>+</sup>; 805.2 [2m+Na]<sup>+</sup>; 821.3 [2m+K]<sup>+</sup>; 1196.2 [3m+Na]<sup>+</sup>; 1212.1 [3m+K]<sup>+</sup>; **FAB-HRMS**: 391.1785.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ(ppm) = 7.76 (t, 2H, J = 7.6 Hz, Fmoc-Aromat); 7.68 (t, 2H, J = 7.6 Hz, Fmoc-Aromat); 7.39 (t, 2H, J = 7.6 Hz, Fmoc-Aromat); 7.31 (t, 2H, J = 7.6 Hz, Fmoc-Aromat); 5.40 (s, 1H; C(4)H);

4.68 (d, 1H,  $J = 10.6$  Hz, NH); 4.52/ 4.38 (2x m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>); 4.51 (dd, 1H,  $J = 4.9/10.6$  Hz, C(2)H); 4.21 (m, 1H, Fmoc-CH); 2.74 (m, 1H, C(1)H); 2.14 (m, 1H, C(5)H); 1.97/ 1.16 (2x m, 2H, C(6)H<sub>2</sub>); 1.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1.03 (d, 3H,  $J = 6.9$  Hz, CH<sub>3</sub>-C(5)H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz, HSQC):  $\delta$ (ppm) = 132.4 (C(4)), 127.9 (Fmoc-Aromat); 127.5 (Fmoc-Aromat); 125.4 (Fmoc-Aromat); 120.3 (Fmoc-Aromat), 67.0 (Fmoc-CH<sub>2</sub>); 50.1 (C(2)); 47.8 (Fmoc-CH); 44.4 (C(1)); 31.0 (C(5)); 28.4 (C(6)); 21.7 (CH<sub>3</sub>-C(5)); 21.1 (CH<sub>3</sub>).

#### 5.4.42 Synthese von [3*R*,5*S*,6*E*,8*S*,10*R*]-11-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy-carbonylamino)-3,5,8,10-tetramethyl-undec-6-ensäure (**241**), Fmoc-ATUA-OH



C<sub>30</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>4</sub>  
Exact Mass: 477,29  
Mol. Wt.: 477,63

150 mg ATUA-*bis*-amid (**240**) (0.482 mmol) werden 4 h lang mit 6 mL konz. KOH refluxiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der pH-Wert auf 7.5 durch Zugabe von konz. HCl und 50 mg NaHCO<sub>3</sub> eingestellt. Nach Zugabe von 6 mL Aceton und 250 mg N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (Fmoc-ONSu) wird die Mischung 24 h bei RT gerührt. Nach destillativer Entfernung des Acetons wird die Suspension mit 2N HCl angesäuert (pH 2) und mit EE extrahiert (2x). Die vereinten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird mittels Flashchromatografie (Hex/ EE 4:1, 1% AcOH) gereinigt. Man erhält 90 mg der Titelverbindung (0.19 mmol, 39% d. Th) als leicht gelbliches Öl.

**HPLC** (50-100%): 23.24 min,

**ESI-MS**  $m/z = 478.2$  [m+H]<sup>+</sup>, 977.5 [2m+Na]<sup>+</sup>, 993.5 [2m+K]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) = 7.76 (d, 2H, J = 7.4 Hz, Fmoc-Aromat); 7.59 (d, 2H, J = 7.4 Hz, Fmoc-Aromat); 7.39 (t, 2H, J = 7.4 Hz, Fmoc-Aromat); 7.31 (t, J = 7.4 Hz, Fmoc-Aromat); 5.10-5.15 (m, 1H, NH); 5.07-5.12 (m, 2H, H(6)/ H(7)); 4.41 (d, J = 6.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-Fmoc); 4.21 (t, J = 6.8 Hz, CH-Fmoc); 3.00-3.09/ 2.93-3.00 (2x m, 2H, CH<sub>2</sub>(11)); 2.25/ 2.16 (2x m, 2H, CH<sub>2</sub>(2)); 2.14 (2x m, 2H, H(5)/ H(8)); 1.94 (m, 1H, H(3)); 1.62 (m, 1H, H(10)); 1.23/ 1.10 (2x m, 2H, CH<sub>2</sub>(4)); 1.23/ 1.01 (2x m, 2H, CH<sub>2</sub>(9)); 0.97 (d, 6H, J = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-C(5)/ CH<sub>3</sub>-C(8)); 0.90 (d, 3H, J = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-C(3)); 0.85 (d, 3H, J = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-C(10)). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) = 176.9 (CO); 156.9 (Fmoc-CO); 144.0 (arom. Fmoc<sub>q</sub>); 141.3 (arom. Fmoc<sub>q</sub>); 135.0 (Alken); 128.1 (arom. Fmoc); 127.3 (arom. Fmoc); 125.3 (arom. Fmoc); 120.3 (arom. Fmoc); 66.9 (CH<sub>2</sub>-Fmoc); 47.9 (C(11)); 47.6 (CH-Fmoc); 44.6 (C(4)); 42.3 (C(2)); 42.1 (C(9)); 35.0 (C(5), C(8)); 32.0 (C(10)); 28.5 (C(3)); 22.4 (CH<sub>3</sub>-C(5), CH<sub>3</sub>-C(8)); 19.4 (CH<sub>3</sub>-C(3)); 17.2 (CH<sub>3</sub>-C(10)).

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] D. Adam, *Nature* **2001**, *411*, 408.
- [2] P. Smaglik, *Nature* **2000**, *406*, 807.
- [3] L. R. Ember, *Chem. Eng. News* **2001**, *79*, 51.
- [4] J. Drews, *Science* **2000**, *287*, 1960.
- [5] P. N. Kaul, *Drug Discovery: Past, present and future*, Vol. 50, Birkhäuser Verlag, Switzerland, Basel, **1998**.
- [6] G. Wess, M. Urmann, B. Sickenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3341.
- [7] W. A. Kinney, H. R. Almond, Jr., J. Qi, C. E. Smith, R. J. Santulli, L. de Garavilla, P. Andrade-Gordon, D. S. Cho, A. M. Everson, M. A. Feinstein, P. A. Leung, B. E. Maryanoff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2940.
- [8] B. Walker, J. F. Lynas, *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 596.
- [9] J. C. Venter et al., *Science* **2001**, *291*, 1304.
- [10] E. S. Lander et al., *Nature* **2001**, *409*, 860.
- [11] T. Klabunde, G. Hessler, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 928.
- [12] S.-H. Chung, S. Kuyucak, *Eur. Biophys. J.* **2002**, *31*, 283.
- [13] R. L. Juliano, *Annu. Rev. Pharmacol.* **2002**, *42*, 283.
- [14] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie* **1992**, 1100.
- [15] E. Ruoslahti, *Sci. Am.* **1996**, *275*, 72.
- [16] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57.
- [17] J. Folkman, Y. Shing, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10931.
- [18] O. Wilhelm, U. Reuning, F. Jänicke, M. Schmitt, H. Graeff, *Onkologie* **1994**, *17*, 358.
- [19] K. Dano, P. A. Andreasen, J. Grondahl-Hansen, P. Kristensen, L. S. Nielsen, L. Skriver, *Adv. Cancer Res.* **1985**, *44*, 139.
- [20] E. Ruoslahti, *Adv. Cancer Res.* **1999**, *76*, 1.
- [21] J.-P. Belloq, M.-P. Chenard-Neu, N. Rouyer, C. Wolf, P. Chambon, P. Basset, Prospects in Diagnosis and Treatment of Breast Cancer (Eds.: M. Schmitt, H. Graeff, G. Kindermann), **1994**, pp. 89.
- [22] L. A. Liotta, W. G. Stetler-Stevenson, *Cancer Res.* **1991**, *51*, 5054s.
- [23] M. Schmitt, F. Janicke, H. Graeff, *Fibrinolysis* **1992**, *6*, 3.
- [24] W. G. Stetler-Stevenson, L. A. Liotta, D. E. Kleiner, Jr., *FASEB J* **1993**, *7*, 1434.
- [25] B. F. Sloane, *Semin. Cancer Biol.* **1990**, *1*, 137.
- [26] H. Rochefort, *Breast Cancer Res. Treat.* **1990**, *16*, 3.
- [27] N. Johansson, M. Ahonen, V. M. Kahari, *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 5.
- [28] J. E. Koblinski, M. Ahram, B. F. Sloane, *Clin. Chim. Acta* **2000**, *291*, 113.
- [29] P. A. Andreasen, R. Egelund, H. H. Petersen, *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 25.
- [30] K. Dano, J. Romer, B. S. Nielsen, S. Bjorn, C. Pyke, J. Rygaard, L. R. Lund, *APMIS* **1999**, *107*, 120.
- [31] P. A. Andreasen, L. Kjoller, L. Christensen, M. J. Duffy, *Int. J. Cancer* **1997**, *72*, 1.
- [32] N. Chucholowski, M. Schmitt, P. Rettenberger, E. Schueren, N. Moniwa, L. Goretzki, O. G. Wilhelm, U. Weidle, F. Jaenicke, H. Graeff, *Fibrinolysis* **1992**, *6*, 95.
- [33] E. F. Plow, D. E. Freaney, J. Plescia, L. A. Miles, *J. Cell Biol.* **1986**, *103*, 2411.
- [34] V. Ellis, N. Behrendt, K. Dano, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12752.
- [35] Y. Sato, R. Tsuboi, R. Lyons, H. Moses, D. B. Rifkin, *J. Cell. Biol.* **1990**, *111*, 757.
- [36] L. E. Odekon, F. Blasi, D. B. Rifkin, *J. Cell Physiol.* **1994**, *158*, 398.
- [37] L. Naldini, E. Vigna, A. Bardelli, A. Follenzi, F. Galimi, P. M. Comoglio, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 603.
- [38] J. Ploug, N. O. Kjeldgaard, *Arch. Biochem. and Biophys.* **1956**, *62*, 500.
- [39] F. M. Booyse, G. Osikowicz, S. Feder, J. Scheinbuks, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 7198.
- [40] T. C. Wun, L. Ossowski, E. Reich, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7262.
- [41] L. C. Petersen, L. R. Lund, L. S. Nielsen, K. Dano, L. Skriver, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 11189.

- [42] W. A. Günzler, G. J. Steffens, F. Oetting, G. Buse, L. Flohe, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **1982**, 363, 133.
- [43] G. J. Steffens, W. A. Günzler, F. Oetting, E. Frankus, L. Flohe, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **1982**, 363, 1043.
- [44] M. P. Stoppelli, A. Corti, A. Soffientini, G. Cassani, F. Blasi, R. K. Assoian, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, 82, 4939.
- [45] P. H. A. Quax, J. M. Grimbergen, M. Lansink, A. H. F. Bakker, M.-C. Blatter, D. Belin, V. W. M. Van Hinsbergh, J. H. Verheijen, *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **1998**, 18, 693.
- [46] A. P. Hansen, A. M. Petros, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Biochemistry* **1994**, 33, 15418.
- [47] A. P. Hansen, A. M. Petros, R. P. Meadows, D. Nettlesheim, A. P. Mazar, E. T. Olejniczak, R. X. Xu, T. M. Pederson, J. Henkin, S. W. Fesik, *Biochemistry* **1994**, 33, 4847.
- [48] X. Li, R. A. G. Smith, C. M. Dobson, *Biochemistry* **1992**, 31, 9562.
- [49] E. M. Salonen, O. Saksela, T. Vartio, A. Vaheri, L. S. Nielsen, J. Zeuthen, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 12302.
- [50] R. W. Stephens, A. M. Bokman, H. T. Myöhänen, T. Reisberg, H. Tapiovaara, N. Pedersen, J. Grøndahl-Hansen, M. Llinas, A. Vaheri, *Biochemistry* **1992**, 31, 7572.
- [51] W. Strassburger, A. Wollmer, J. E. Pitts, I. D. Glover, I. J. Tickle, T. L. Blundell, G. J. Steffens, W. A. Günzler, F. Oetting, L. Flohe, *FEBS Lett.* **1983**, 157, 219.
- [52] G. Spraggon, C. Phillips, U. K. Nowak, C. P. Ponting, D. Saunders, C. M. Dobson, D. I. Stuart, E. Y. Jones, *Structure (London)* **1995**, 3, 681.
- [53] S. Sperl, U. Jacob, N. A. De Prada, J. Stürzebecher, O. G. Wilhelm, W. Bode, V. Magdolen, R. Huber, L. Moroder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97, 5113.
- [54] H. Kobayashi, M. Schmitt, L. Goretzki, N. Chucholowski, J. Calvete, M. Kramer, W. A. Günzler, F. Jänicke, H. Graeff, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 5147.
- [55] L. Goretzki, M. Schmitt, K. Mann, J. Calvete, N. Chucholowski, M. Kramer, W. A. Günzler, F. Jänicke, H. Graeff, *FEBS Lett.* **1992**, 297, 112.
- [56] B. B. Wolf, J. Vasudevan, J. Henkin, S. L. Gonias, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 16327.
- [57] E. Koivunen, M. L. Huhtala, U. H. Stenman, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 14095.
- [58] M. Schmitt, L. Goretzki, F. Jänicke, J. Calvete, M. Eulitz, H. Kobayashi, N. Chucholowski, H. Graeff, *Biomed. Biochim. Acta* **1991**, 50, 731.
- [59] P. Mignatti, D. B. Rifkin, *Physiol. Rev.* **1993**, 73, 161.
- [60] O. Saksela, D. B. Rifkin, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1988**, 4, 93.
- [61] J. D. Vassalli, D. Baccino, D. Belin, *J. Cell Biol.* **1985**, 100, 86.
- [62] J. D. Vassalli, *Fibrinolysis* **1994**, 8, 172.
- [63] J. D. Vassalli, M. S. Pepper, *Nature* **1994**, 370, 14.
- [64] L. S. Nielsen, G. M. Kellerman, N. Behrendt, R. Picone, K. Danø, F. Blasi, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 2358.
- [65] N. Behrendt, M. Ploug, L. Patthy, G. Houen, F. Blasi, K. Danø, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 7842.
- [66] N. Behrendt, E. Rønne, K. Danø, *Biol. Chem.* **1995**, 376, 269.
- [67] M. Ploug, N. Behrendt, D. Lober, K. Danø, *Sem. Thromb. Hemost.* **1991**, 17, 183.
- [68] A. L. Roldan, M. V. Cubellis, M. T. Masucci, N. Behrendt, L. R. Lund, K. Danø, E. Appella, F. Blasi, *EMBO J.* **1990**, 9, 467.
- [69] M. Ploug, E. Ronne, N. Behrendt, A. L. Jensen, F. Blasi, K. Dano, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 1926.
- [70] L. B. Møller, M. Ploug, F. Blasi, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 208, 493.
- [71] G. Brunner, C. N. Metz, H. Nguyen, J. Gabrilove, S. R. Patel, M. A. Davitz, D. B. Rifkin, E. L. Wilson, *Blood* **1994**, 83, 2115.
- [72] O. G. Wilhelm, S. Wilhelm, G. M. Escott, V. Lutz, V. Magdolen, M. Schmitt, D. B. Rifkin, E. L. Wilson, H. Graeff, G. Brunner, *J. Cell. Physiol.* **1999**, 180, 225.
- [73] M. Ploug, J. Eriksen, T. Plesner, N. E. Hansen, K. Dano, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 208, 397.



- [74] P. Kristensen, J. Eriksen, F. Blasi, K. Danø, *J. Cell Biol.* **1991**, *115*, 1763.
- [75] S. A. Rabbani, N. Rajwans, A. Achbarou, K. K. Murthy, D. Goltzman, *FEBS Lett.* **1994**, *338*, 69.
- [76] C. Pyke, J. Eriksen, H. Solberg, B. S. Nielsen, P. Kristensen, L. R. Lund, K. Danø, *FEBS Lett.* **1993**, *326*, 69.
- [77] N. Behrendt, E. Rønne, M. Ploug, T. Petri, D. Løber, L. S. Nielsen, W. D. Schleuning, F. Blasi, E. Appella, K. Danø, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6453.
- [78] M. Ploug, H. Rahbek-Nielsen, P. F. Nielsen, P. Roepstorff, K. Danø, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 13933.
- [79] L. B. Møller, J. J. Pöllänen, E. Rønne, N. Pedersen, F. Blasi, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 11152.
- [80] J. R. Casey, J. G. Petranka, J. Kottra, D. E. Fleenor, W. F. Rosse, *Blood* **1994**, *84*, 1151.
- [81] M. Ploug, M. Kjalke, E. Rønne, U. Weidle, G. Høyer-Hansen, K. Danø, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 17539.
- [82] J. Kratzschmar, B. Haendler, S. Kojima, D. B. Rifkin, W. D. Schleuning, *Gene* **1993**, *125*, 177.
- [83] G. Høyer-Hansen, E. Rønne, H. Solberg, N. Behrendt, M. Ploug, L. R. Lund, V. Ellis, K. Danø, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 18224.
- [84] I. P. Witz, *J. Cell. Biochem.* **2000**, 61.
- [85] Y. Wang, J. Dang, L. K. Johnson, J. J. Selhamer, W. F. Doe, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *227*, 116.
- [86] N. Ohkura, S. Inoue, K. Ikeda, K. Hayashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *204*, 1212.
- [87] M. Ploug, V. Ellis, *FEBS Lett.* **1994**, *349*, 153.
- [88] C. M. Fletcher, R. A. Harrison, P. J. Lachmann, D. Neuhaus, *Structure (London)* **1994**, *2*, 185.
- [89] J. Petranka, J. Zhao, J. Norris, N. B. Tweedy, R. E. Ware, P. J. Sims, W. F. Rosse, *Blood Cells Mol. Dis.* **1996**, *22*, 281.
- [90] R. Eshel, A. Zanin, O. Sagi-Assif, T. Meshel, N. Smorodinsky, O. Dwir, R. Alon, R. Brakenhoff, G. van Dongen, I. P. Witz, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 12833.
- [91] T. P. Gumley, I. F. McKenzie, M. S. Sandrin, *Immunol. Cell Biol.* **1995**, *73*, 277.
- [92] L. S. Noel, B. R. Champion, C. L. Holley, C. J. Simmons, D. C. Morris, J. A. Payne, J. M. Lean, T. J. Chambers, G. Zaman, L. E. Lanyon, L. J. Suva, L. R. Miller, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 3878.
- [93] B. Kieffer, P. C. Driscoll, I. D. Campbell, A. C. Willis, P. A. van der Merwe, S. J. Davis, *Biochemistry* **1994**, *33*, 4471.
- [94] J. C. Dewan, G. A. Grant, J. C. Sacchettini, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13147.
- [95] R. E. Oswald, M. J. Sutcliffe, M. Bamberger, R. H. Loring, E. Braswell, C. M. Dobson, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4901.
- [96] M. V. Cubellis, M. L. Nolli, G. Cassani, F. Blasi, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 15819.
- [97] E. Appella, E. A. Robinson, S. J. Ullrich, M. P. Stoppelli, A. Corti, G. Cassani, F. Blasi, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4437.
- [98] F. Blasi, N. Behrendt, M. V. Cubellis, V. Ellis, L. R. Lund, M. T. Masucci, L. B. Møller, D. P. Olson, N. Pedersen, M. Ploug, E. Rønne, K. Danø, *Cell Differ. Dev.* **1990**, *32*, 247.
- [99] M. Ploug, V. Ellis, K. Dano, *Biochemistry* **1994**, *33*, 8991.
- [100] M. Ploug, *Biochemistry* **1998**, *37*, 16494.
- [101] M. Ploug, S. Ostergaard, L. B. L. Hansen, A. Holm, K. Dano, *Biochemistry* **1998**, *37*, 3612.
- [102] M. Ploug, H. Rahbek-Nielsen, V. Ellis, P. Roepstorff, K. Dano, *Biochemistry* **1995**, *34*, 12524.
- [103] H. Gardsvoll, K. Dano, M. Ploug, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37995.
- [104] O. D. Liang, T. Chavakis, S. M. Kanse, K. T. Preissner, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 28946.

- [105] K. Bdeir, A. Kuo, A. P. Mazar, B. S. Sachais, W. Xiao, S. Gawlak, S. Harris, A. A.-R. Higazi, D. B. Cines, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 28532.
- [106] V. Nastopoulos, P. N. Kanellopoulos, D. Tsernoglou, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1998**, 54, 964.
- [107] M. Ploug, H. Gardsvoll, T. J. Jorgensen, L. Lonborg Hansen, K. Dano, *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, 30, 177.
- [108] D. A. Waltz, H. A. Chapman, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 14746.
- [109] Y. Wei, D. A. Waltz, N. Rao, R. J. Drummond, S. Rosenberg, H. A. Chapman, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 32380.
- [110] S. M. Kanse, C. Kost, O. G. Wilhelm, P. A. Andreasen, K. T. Preissner, *Exp. Cell Res.* **1996**, 224, 344.
- [111] N. Sidenius, A. Andolfo, R. Fesce, F. Blasi, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 27982.
- [112] A. Estreicher, J. Muehlhauser, J. L. Carpentier, L. Orci, J. D. Vassalli, *J. Cell Biol.* **1990**, 111, 783.
- [113] K. Burridge, K. Fath, T. Kelly, G. Nuckolls, C. Turner, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1988**, 4, 487.
- [114] R. G. Sitrin, R. F. Todd, III, H. R. Petty, T. G. Brock, S. B. Schollenberg, E. Albrecht, M. R. Gyetko, *J. Clin. Invest.* **1996**, 97, 1942.
- [115] T. Chavakis, S. M. Kanse, B. Yutzy, H. R. Lijnen, K. T. Preissner, *Blood* **1998**, 91, 2305.
- [116] M. V. Carriero, S. Del Vecchio, P. Franco, M. I. Potena, F. Chiaradonna, G. Botti, M. P. Stoppelli, M. Salvatore, *Clin. Cancer Res.* **1997**, 3, 1299.
- [117] G. Deng, S. A. Curriden, G. Hu, R. P. Czekay, D. J. Loskutoff, *J. Cell Physiol.* **2001**, 189, 23.
- [118] S. Stefansson, D. A. Lawrence, *Nature* **1996**, 383, 441.
- [119] S. Fong, M. V. Doyle, R. J. Goodson, R. J. Drummond, J. R. Stratton, L. McGuire, L. V. Doyle, H. A. Chapman, S. Rosenberg, *Biol. Chem.* **2002**, 383, 149.
- [120] G. Høyer-Hansen, N. Behrendt, M. Ploug, K. Danø, K. T. Preissner, *FEBS Lett.* **1997**, 420, 79.
- [121] N. Sidenius, F. Blasi, *FEBS Lett.* **2000**, 470, 40.
- [122] O. Shliom, M. Huang, B. Sachais, A. Kuo, J. W. Weisel, C. Nagaswami, T. Nassar, K. Bdeir, E. Hiss, S. Gawlak, S. Harris, A. P. Mazar, A. A.-R. Higazi, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 24304.
- [123] T. L. Frandsen, R. W. Stephens, A. N. Pedersen, L. H. Engholm, C. Holst-Hansen, N. Brønner, *Drugs Fut.* **1998**, 23, 873.
- [124] C. Genton, E. K. Kruithof, W. D. Schleuning, *J. Cell Biol.* **1987**, 104, 705.
- [125] F. Espana, A. Estelles, P. J. Fernandez, J. Gilabert, J. Sanchez-Cuenca, J. H. Griffin, *Thromb. Haemost.* **1993**, 70, 989.
- [126] E. K. Kruithof, A. Gudinchet, F. Bachmann, *Thromb. Haemost.* **1988**, 59, 7.
- [127] P. A. Andreasen, L. S. Nielsen, P. Kristensen, J. Grøndahl-Hansen, L. Skriver, K. Dano, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 7644.
- [128] A. Gils, P. J. Declerck, *Thromb. Haemost.* **1998**, 80, 531.
- [129] V. Ellis, T. C. Wun, N. Behrendt, E. Rønne, K. Danø, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 9904.
- [130] M. V. Cubellis, P. A. Andreasen, P. Ragno, M. Mayer, K. Danø, F. Blasi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, 86, 4828.
- [131] L. A. Erickson, M. H. Ginsberg, D. J. Loskutoff, *J. Clin. Invest.* **1984**, 74, 1465.
- [132] R. W. Carrell, P. E. Stein, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1996**, 377, 1.
- [133] C. M. Hekman, D. J. Loskutoff, *Biochemistry* **1988**, 27, 2911.
- [134] R. Egelund, S. L. Schousboe, L. Sottrup-Jensen, K. W. Rodenburg, P. A. Andreasen, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 248, 775.
- [135] T. L. Lindahl, O. Sigurdardottir, B. Wiman, *Thromb. Haemost.* **1989**, 62, 748.
- [136] T. C. Wun, E. Reich, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 3646.
- [137] R. Egelund, K. W. Rodenburg, P. A. Andreasen, M. S. Rasmussen, R. E. Guldborg, T. E. Petersen, *Biochemistry* **1998**, 37, 6375.
- [138] R. Egelund, T. E. Petersen, P. A. Andreasen, *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 673.

- [139] R. Egelund, A. P. Einholm, K. E. Pedersen, R. W. Nielsen, A. Christensen, J. Deinum, P. A. Andreasen, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 13077.
- [140] S. L. Schousboe, R. Egelund, T. Kirkegaard, K. T. Preissner, K. W. Rodenburg, P. A. Andreasen, *Thromb. Haemost.* **2000**, 83, 742.
- [141] M. Fa, F. Bergstrom, P. Hagglof, M. Wilczynska, L. B. Johansson, T. Ny, *Structure Fold Des.* **2000**, 8, 397.
- [142] K. Aertgeerts, H. L. De Bondt, C. De Ranter, P. J. Declerck, *J. Struct. Biol.* **1994**, 113, 239.
- [143] E. M. Salonen, A. Vaheri, J. Pöllänen, R. Stephens, P. Andreasen, M. Mayer, K. Danø, J. Gailit, E. Ruoslahti, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 6339.
- [144] P. J. Declerck, M. De Mol, M. C. Alessi, S. Baudner, E. P. Paques, K. T. Preissner, G. Mueller-Berghaus, D. Collen, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 15454.
- [145] B. S. Knudsen, P. C. Harpel, R. L. Nachman, *J. Clin. Invest.* **1987**, 80, 1082.
- [146] G. Deng, S. A. Curriden, S. Wang, S. Rosenberg, D. J. Loskutoff, *J. Cell Biol.* **1996**, 134, 1563.
- [147] D. A. Waltz, L. R. Natkin, R. M. Fujita, Y. Wei, H. A. Chapman, *J. Clin. Invest.* **1997**, 100, 58.
- [148] L. Kjoller, S. M. Kanse, T. Kirkegaard, K. W. Rodenburg, E. Ronne, S. L. Goodman, K. T. Preissner, L. Ossowski, P. A. Andreasen, *Exp. Cell Res.* **1997**, 232, 420.
- [149] S. Stefansson, E. Petitclerc, M. K. K. Wong, G. A. McMahon, P. C. Brooks, D. A. Lawrence, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 8135.
- [150] E. K. O. Kruithof, J. D. Vassalli, W. D. Schleuning, R. J. Mattaliano, F. Bachmann, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 11207.
- [151] P. A. Andreasen, B. Georg, L. R. Lund, A. Riccio, S. N. Stacey, *Mol. Cell. Endocrinol.* **1990**, 68, 1.
- [152] F. M. Donovan, P. J. Vaughan, D. D. Cunningham, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 17199.
- [153] D. Olson, J. Pollanen, G. Hoyer-Hansen, E. Ronne, K. Sakaguchi, T. C. Wun, E. Appella, K. Dano, F. Blasi, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 9129.
- [154] P. A. Andreasen, L. Sottrup-Jensen, L. Kjoller, A. Nykjaer, S. K. Moestrup, C. M. Petersen, J. Gliemann, *FEBS Lett.* **1994**, 338, 239.
- [155] S. K. Møstrup, T. L. Holtet, M. Etzerodt, H. C. Thøgersen, A. Nykjær, P. A. Andreasen, H. H. Rasmussen, L. Sottrup-Jensen, J. Gliemann, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 13691.
- [156] A. Nykjær, L. Kjoller, R. L. Cohen, D. A. Lawrence, B. A. Garni-Wagner, R. F. Todd, III, A.-J. van Zonneveld, J. Gliemann, P. A. Andreasen, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 25668.
- [157] A. Nykjær, C. M. Petersen, B. Møller, P. H. Jensen, S. K. Moestrup, T. L. Holtet, M. Etzerodt, H. C. Thøgersen, M. Munch, P. A. Andreasen, J. Gliemann, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 14543.
- [158] M. V. Cubellis, T. C. Wun, F. Blasi, *EMBO J.* **1990**, 9, 1079.
- [159] M. Conese, A. Nykjær, C. M. Petersen, O. Cremona, R. Pardi, P. A. Andreasen, J. Gliemann, E. I. Christensen, F. Blasi, *J. Cell Biol.* **1995**, 131, 1609.
- [160] A. Nykjær, M. Conese, E. I. Christensen, D. Olson, O. Cremona, J. Gliemann, F. Blasi, *Embo J.* **1997**, 16, 2610.
- [161] L. Kjoller, *Biol. Chem.* **2002**, 383, 5.
- [162] K. T. Preissner, S. M. Kanse, A. E. May, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, 12, 621.
- [163] L. Ossowski, J. A. Aguirre-Ghiso, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, 12, 613.
- [164] N. Busso, S. K. Masur, D. Lazega, S. Waxman, L. Ossowski, *J. Cell Biol.* **1994**, 126, 259.
- [165] A. Stahl, B. M. Mueller, *Cancer Res.* **1994**, 54, 3066.
- [166] J. Bohuslav, V. Horejsi, C. Hansmann, J. Stoeck, U. H. Weidle, O. Majdic, I. Bartke, W. Knapp, H. Stockinger, *J. Exp. Med.* **1995**, 181, 1381.
- [167] A. L. Kindzelskii, Z. O. Laska, R. F. Todd, 3rd, H. R. Petty, *J. Immunol.* **1996**, 156, 297.

- [168] D. I. Simon, N. K. Rao, H. Xu, Y. Wei, O. Majdic, E. Ronne, L. Kobzik, H. A. Chapman, *Blood* **1996**, *88*, 3185.
- [169] Y. Wei, M. Lukashev, D. I. Simon, S. C. Bodary, S. Rosenberg, M. V. Doyle, H. A. Chapman, *Science* **1996**, *273*, 1551.
- [170] D. I. Simon, Y. Wei, L. Zhang, N. K. Rao, H. Xu, Z. Chen, Q. Liu, S. Rosenberg, H. A. Chapman, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 10228.
- [171] Y. Wei, J. A. Eble, Z. Wang, J. A. Kreidberg, H. A. Chapman, *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 2975.
- [172] J. P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2002**, *296*, 151.
- [173] T. A. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 65.
- [174] K.-E. Gottschalk, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3767.
- [175] T. Tarui, A. P. Mazar, D. B. Cines, Y. Takada, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 3983.
- [176] T. Chavakis, S. M. Kanse, R. A. Pixley, A. E. May, I. Isordia-Salas, R. W. Colman, K. T. Preissner, *FASEB J* **2001**, *15*, 2365.
- [177] R. W. Colman, R. A. Pixley, S. Najamunnisa, W. Yan, J. Wang, A. Mazar, K. R. McCrae, *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 1481.
- [178] W. Xue, A. L. Kindzelskii, R. F. Todd, III, H. R. Petty, *J. Immunol.* **1994**, *152*, 4630.
- [179] W. Xue, I. Mizukami, R. F. Todd, 3rd, H. R. Petty, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1682.
- [180] A. E. May, F. J. Neumann, A. Schomig, K. T. Preissner, *Blood* **2000**, *96*, 506.
- [181] A. E. May, S. M. Kanse, L. R. Lund, R. H. Gisler, B. A. Imhof, K. T. Preissner, *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 1029.
- [182] T. Chavakis, A. E. May, K. T. Preissner, S. M. Kanse, *Blood* **1999**, *93*, 2976.
- [183] S. Hapke, H. Kessler, N. Arroyo de Prada, A. Benge, M. Schmitt, E. Lengyel, U. Reuning, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 26340.
- [184] J. A. Aguirre Ghiso, K. Kovalski, L. Ossowski, *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 89.
- [185] W. Yu, J. Kim, L. Ossowski, *J. Cell Biol.* **1997**, *137*, 767.
- [186] D. Liu, J. A. A. Ghiso, Y. Estrada, L. Ossowski, *Cancer Cell* **2002**, *1*, 445.
- [187] M. Yebra, G. C. Parry, S. Stromblad, N. Mackman, S. Rosenberg, B. M. Mueller, D. A. Cheresh, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 29393.
- [188] M. V. Carriero, S. D. Vecchio, M. Capozzoli, P. Franco, L. Fontana, A. Zannetti, G. Botti, G. D'Áiuto, M. Solvatore, M. P. Stoppelli, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 5307.
- [189] I. Silvestri, I. Longanesi Cattani, P. Franco, G. Pirozzi, G. Botti, M. P. Stoppelli, M. V. Carriero, *Int. J. Cancer* **2002**, *102*, 562.
- [190] Y. Koshelnick, M. Ehart, H. Stockinger, B. R. Binder, *Thromb. Haemost.* **1999**, *82*, 305.
- [191] D. Cooper, F. P. Lindberg, J. R. Gamble, E. J. Brown, M. A. Vadas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1995**, *92*, 3978.
- [192] C. A. Fenczik, T. Sethi, J. W. Ramos, P. E. Hughes, M. H. Ginsberg, *Nature* **1997**, *390*, 81.
- [193] H. Tang, D. M. Kerins, Q. Hao, T. Inagami, D. E. Vaughan, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 18268.
- [194] S. Monier, R. G. Parton, F. Vogel, J. Behlke, A. Henske, T. V. Kurzchalia, *Mol. Biol. Cell* **1995**, *6*, 911.
- [195] H. A. Chapman, Y. Wei, D. I. Simon, D. A. Waltz, *Thromb. Haemostasis* **1999**, *82*, 291.
- [196] K. K. Wary, A. Mariotti, C. Zurzolo, F. G. Giancotti, *Cell* **1998**, *94*, 625.
- [197] Y. Wei, X. Yang, Q. Liu, J. A. Wilkins, H. A. Chapman, *J. Cell Biol.* **1999**, *144*, 1285.
- [198] Y. Koshelnick, M. Ehart, P. Hufnagl, P. C. Heinrich, B. R. Binder, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 28563.
- [199] I. Dumler, A. Weis, O. A. Mayboroda, C. Maasch, U. Jerke, H. Haller, D. C. Gulba, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 315.
- [200] D. H. Nguyen, A. D. Catling, D. J. Webb, M. Sankovic, L. A. Walker, A. V. Somlyo, M. J. Weber, S. L. Gonias, *J. Cell. Biol.* **1999**, *146*, 149.

- [201] J. A. Aguirre-Ghiso, D. Liu, A. Mignatti, K. Kovalski, L. Ossowski, *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 863.
- [202] W. F. White, G. H. Barlow, M. M. Mozen, *Biochemistry* **1966**, *5*, 2160.
- [203] B. Åstedt, L. Holmberg, *Nature* **1976**, *261*, 595.
- [204] W. Hollas, F. Blasi, D. Boyd, *Cancer Res.* **1991**, *51*, 3690.
- [205] M. Schmitt, O. G. Wilhelm, U. Reuning, A. Krüger, N. Harbeck, E. Lengylel, H. Graeff, B. Gänsbacher, H. Kessler, M. Bürgle, J. Stürzebecher, S. Sperl, V. Magdolen, *Fibrinolysis & Proteolysis* **2000**, *14*, 114.
- [206] U. Reuning, V. Magdolen, O. Wilhelm, K. Fischer, V. Lutz, H. Graeff, M. Schmitt, *Int. J. Oncol.* **1998**, *13*, 893.
- [207] A. P. Mazar, *Anti-Cancer Drugs* **2001**, *12*, 387.
- [208] L. Dubuisson, A. Monvoisin, B. S. Nielsen, B. Le Bail, P. Bioulac-Sage, J. Rosenbaum, *J. Pathol.* **2000**, *190*, 190.
- [209] H. Ohtani, C. Pyke, K. Dano, H. Nagura, *Int. J. Cancer* **1995**, *62*, 691.
- [210] C. Pyke, N. Graem, E. Ralfkiaer, E. Ronne, G. Hoyer-Hansen, N. Brunner, K. Dano, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 1911.
- [211] S. Mustjoki, N. Sidenius, C. F. Sier, F. Blasi, E. Elonen, R. Alitalo, A. Vaheri, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 7126.
- [212] C. Tecimer, D. L. Doering, L. J. Goldsmith, J. S. Meyer, G. Abdulhay, J. L. Wittliff, *Gynecol. Oncol.* **2001**, *80*, 48.
- [213] M. J. Duffy, T. M. Maguire, E. W. McDermott, N. O'Higgins, *J. Surg. Oncol.* **1999**, *71*, 130.
- [214] J. A. Foekens, H. A. Peters, M. P. Look, H. Portengen, M. Schmitt, M. D. Kramer, N. Brüner, F. Jänicke, M. E. M.-v. Gelder, S. C. Henzen-Logmans, W. L. J. v. Putten, J. G. M. Klijn, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 636.
- [215] E. Verner, B. A. Katz, J. R. Spencer, D. Allen, J. Hataye, W. Hruzewicz, H. C. Hui, A. Kolesnikov, Y. Li, C. Luong, A. Martelli, K. Radika, R. Rai, M. She, W. Shrader, P. A. Sprengeler, S. Trapp, J. Wang, W. B. Young, R. L. Mackman, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2753.
- [216] M. Rénatus, W. Bode, R. Huber, J. Stürzebecher, M. T. Stubbs, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5445.
- [217] E. Zeslawska, A. Schweinitz, A. Karcher, P. Sondermann, S. Sperl, J. Sturzebecher, U. Jacob, *J. Mol. Biol.* **2000**, *301*, 465.
- [218] 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. Wang, M. Wendt, M. Weitzberg, X. Zhao, T. Rockway, *Structure Fold Des.* **2000**, *8*, 553.
- [219] P. J. Hajduk, S. Boyd, D. Nettesheim, V. Nienaber, J. Severin, R. Smith, D. Davidson, T. Rockway, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3862.
- [220] S. Kunzel, A. Schweinitz, S. Reissmann, J. Sturzebecher, T. Steinmetzer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 645.
- [221] A. G. Geyer, W. J. McClellan, T. W. Rockway, K. D. Stewart, M. Weitzberg, M. D. Wendt, U.S.A., **2001**.
- [222] P. M. Mohan, S. S. Lakka, S. Mohanam, Y. Kin, R. Sawaya, A. P. Kyritsis, G. L. Nicolson, J. S. Rao, *Clin. Exp. Metastasis* **1999**, *17*, 617.
- [223] P. M. Mohan, S. K. Chintala, S. Mohanam, C. L. Gladson, E. S. Kim, Z. L. Gokaslan, S. S. Lakka, J. A. Roth, B. Fang, R. Sawaya, A. P. Kyritsis, J. S. Rao, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 3369.
- [224] H. Li, H. Lu, F. Griscelli, P. Opolon, L. Q. Sun, T. Ragot, Y. Legrand, D. Belin, J. Soria, C. Soria, M. Perricaudet, P. Yeh, *Gene Ther.* **1998**, *5*, 1105.
- [225] H. Li, F. Griscelli, F. Lindenmeyer, P. Opolon, L. Q. Sun, E. Connault, J. Soria, C. Soria, M. Perricaudet, P. Yeh, H. Lu, *Hum. Gene Ther.* **1999**, *10*, 3045.
- [226] O. G. Wilhelm, M. Schmitt, S. Höhl, R. Senekowitsch, H. Graeff, *Clin. Exp. Metastasis* **1995**, *13*, 296.
- [227] S. A. Rabbani, J. Gladu, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 2390.

- [228] Y. Guo, A. A. Higazi, A. Arakelian, B. S. Sachais, D. Cines, R. G. Goldfarb, T. R. Jones, H. Kwaan, A. P. Mazar, S. A. Rabbani, *FASEB J.* **2000**, *14*, 1400.
- [229] V. Magdolen, P. Rettenberger, M. Koppitz, L. Goretzki, H. Kessler, U. H. Weidle, B. König, H. Graeff, M. Schmitt, O. Wilhelm, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *237*, 743.
- [230] M. Bürgle, M. Koppitz, C. Riemer, H. Kessler, B. König, U. H. Weidle, J. Kellermann, F. Lottspeich, H. Graeff, M. Schmitt, L. Goretzki, U. Reunig, O. Wilhelm, V. Magdolen, *Biol. Chem.* **1997**, *378*, 231.
- [231] M. Bürgle, *Dissertation 1998*, TU München.
- [232] V. Magdolen, M. Bürgle, N. A. d. Prada, N. Schmiedeberg, C. Riemer, F. Schroeck, J. Kellermann, K. Degitz, O. G. Wilhelm, M. Schmitt, H. Kessler, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 1197.
- [233] C. Riemer, *Dissertation 1999*, TU München.
- [234] N. Schmiedeberg, *Dissertation 2002*, TU München.
- [235] N. Schmiedeberg, M. Schmitt, C. Rolz, V. Truffault, M. Sukopp, M. Burgle, O. G. Wilhelm, W. Schmalix, V. Magdolen, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4984.
- [236] S. Sato, C. Koppitz, W. Schmalix, B. Muehlenweg, H. Kessler, M. Schmitt, A. Kruger, V. Magdolen, *FEBS Lett.* **2002**, *528*, 212.
- [237] R. J. Goodson, M. V. Doyle, S. E. Kaufman, S. Rosenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7129.
- [238] R. J. Tressler, P. A. Pitot, J. R. Stratton, L. D. Forrest, S. Zhuo, R. J. Drummond, S. Fong, M. V. Doyle, L. V. Doyle, H. Y. Min, S. Rosenberg, *APMIS* **1999**, *107*, 168.
- [239] K. S. Lam, M. Lebl, V. Krchnak, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411.
- [240] M. Ploug, S. Østergaard, H. Gårdsvoll, K. Kovalski, C. Holst-Hansen, A. Holm, L. Ossowski, K. Danø, *Biochemistry* **2001**, *40*, 12157.
- [241] L. H. Engelholm, N. Behrendt, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 435.
- [242] E. Fischer, *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 2868.
- [243] T. Curtius, *J. Prakt. Chem.* **1904**, *70*, 57.
- [244] M. Bergmann, *Chem. Ber.* **1932**, *65*, 1192.
- [245] R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 801.
- [246] G. Barany, N. Kneib-Cordonier, D. G. Mullen, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, *30*, 705.
- [247] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161.
- [248] L. A. Carpino, D. Sadat-Aalae, H. G. Chao, R. H. DeSelms, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9651.
- [249] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404.
- [250] K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 513.
- [251] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, W. Q. Yao, W. Schafer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943.
- [252] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091.
- [253] I. W. James, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4855.
- [254] J. M. Humphrey, A. R. Chamberlin, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243.
- [255] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678.
- [256] L. P. Miranda, P. F. Alewood, *Biopolymers (Peptide Science)* **2000**, *55*, 217.
- [257] J.-N. Bertho, A. Loffet, C. Pinel, F. Reuther, G. Sennyey, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1303.
- [258] L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, M. Bienert, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 268.
- [259] L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Faham, P. Henklein, H. Wenschuh, M. Bienert, M. Beyermann, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 241.
- [260] H. Wenschuh, M. Beyermann, R. Winter, M. Bienert, D. Ionescu, L. A. Carpino, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5483.
- [261] Y. M. Angell, C. García-Echeverría, D. H. Rich, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5981.
- [262] L. A. Carpino, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2279.
- [263] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.

- [264] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2034.
- [265] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2024.
- [266] Y. Han, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4307.
- [267] S. Nozaki, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1999**, *54*, 162.
- [268] L. A. Carpino, H. Shroff, S. A. Triolo, E.-S. M. E. Mansour, H. Wenschuh, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7829.
- [269] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2559.
- [270] N. A. Solé, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5399.
- [271] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739.
- [272] T. Shioiri, S. Yamada, K. Ninomiya, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6203.
- [273] J. P. Tam, C. R. Wu, W. Liu, J. W. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6657.
- [274] J. C. Spetzler, M. Meldal, *Lett. Pept. Sci.* **1997**, *3*, 327.
- [275] H. Tamamura, T. Ishihara, H. Oyake, M. Imai, A. Otaka, T. Ibuka, R. Arakaki, H. Nakashima, T. Murakami, M. Waki, A. Matsumoto, N. Yamamoto, N. Fujii, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, *3*, 495.
- [276] T. J. Wallace, J. J. Mahon, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 4099.
- [277] T. J. Wallace, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 2018.
- [278] D. F. Veber, R. M. Freidinger, *Trends Neurosci.* **1985**, *8*, 392.
- [279] H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512.
- [280] C. Gilon, D. Halle, M. Chorev, Z. Selinger, G. Byk, *Biopolymers* **1991**, *31*, 745.
- [281] E. Fischer, *J. Chem. Soc.* **1907**, *91*, 1749.
- [282] E. Fischer, *Chem. Ber.* **1894**, *3*, 2985.
- [283] D. E. Koshland, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *33*, 2375.
- [284] D. E. Koshland, *Science* **1963**, *142*, 1533.
- [285] D. E. Koshland, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1958**, *44*, 98.
- [286] C. M. Deber, V. Madison, E. R. Blout, *Accounts Chem. Res.* **1976**, *9*, 106.
- [287] B. Charpentier, A. Dor, P. Roy, P. England, H. Pham, C. Durieux, B. P. Roques, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1184.
- [288] F. Al-Obeidi, A. M. Castrucci, M. E. Hadley, V. J. Hruby, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2555.
- [289] R. F. Nutt, D. F. Veber, R. Saperstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6539.
- [290] R. Kishore, S. Raghothama, P. Balaram, *Biopolymers* **1987**, *26*, 873.
- [291] C. Toniolo, *Biopolymers* **1989**, *28*, 247.
- [292] C. Gilon, C. Mang, E. Lohof, A. Friedler, H. Kessler, in *Houben-Weyl: Methods of Organic Chemistry, Vol. E 22b, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics* (Ed.: A. F. M. Goodman, L. Moroder), Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2003**, pp. 461.
- [293] M. Kurz, Dissertation, Technische Universität (München), **1991**.
- [294] J. S. Richardson, *Adv. Protein Chem.* **1981**, *34*, 167.
- [295] C. M. Venkatachalam, *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425.
- [296] A. Cornishbowden, *Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 9.
- [297] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1374.
- [298] H. Kessler, H. Matter, G. Gemmecker, A. Kling, M. Kottenhahn, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7550.
- [299] H. Kessler, H. Matter, G. Gemmecker, M. Kottenhahn, J. W. Bats, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4805.
- [300] N. Gresh, G. Tiraboschi, D. R. Salahub, *Biopolymers* **1998**, *45*, 405.
- [301] H. Kessler, P. Kondor, *Chem. Ber.* **1979**, *112*, 3538.
- [302] H. Kessler, G. Hölzemann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, *20*, 124.
- [303] R. Schwyzer, A. Tunkyi, J. P. Carrion, B. Gorup, H. Nolting, *Helv. Chim. Acta* **1964**, *47*, 441.
- [304] J. E. Bugaj, S. Achilefu, R. B. Dorshow, R. Rajagopalan, *J. Biomed. Opt.* **2001**, *6*, 122.

- [305] J. S. Lewis, S. Achilefu, J. R. Garbow, R. Laforest, M. J. Welch, *Eur. J. Cancer* **2002**, *38*, 2173.
- [306] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922.
- [307] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *4*, 696.
- [308] M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2755.
- [309] L. L. Kiessling, N. L. Pohl, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 71.
- [310] J. H. Rao, J. Lahiri, L. Isaacs, R. M. Weis, G. M. Whitesides, *Science* **1998**, *280*, 708.
- [311] H. Kessler, A. Schudok, M. Haupt, K. Ziegler, M. Frimmer, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1988**, *32*, 183.
- [312] E. K. Woller, M. J. Cloninger, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 7.
- [313] J. E. Gestwicki, L. L. Kiessling, *Nature* **2002**, *415*, 81.
- [314] J. R. Cochran, L. J. Stern, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 683.
- [315] J. R. Allen, C. R. Harris, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1890.
- [316] N. Horan, L. Yan, H. Isobe, G. M. Whitesides, D. Kahne, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 11782.
- [317] R. E. Bruehl, F. Dasgupta, T. R. Katsumoto, J. H. Tan, C. R. Bertozzi, W. Spevak, D. J. Ahn, S. D. Rosen, J. O. Nagy, *Biochemistry* **2001**, *40*, 5964.
- [318] V. Kudryashov, P. W. Glunz, L. J. Williams, S. Hintermann, S. J. Danishefsky, K. O. Lloyd, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2001**, *98*, 3264.
- [319] J. D. Reuter, A. Myc, M. M. Hayes, Z. Gan, R. Roy, D. Qin, R. Yin, L. T. Piehler, R. Esfand, D. A. Tomalia, J. R. Baker, Jr., *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 271.
- [320] K. Barlos, D. Gatos, O. Hatzi, N. Koch, S. Koutsogianni, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, *47*, 148.
- [321] S. Matysiak, T. Boldicke, W. Tegge, R. Frank, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1733.
- [322] S. A. W. Gruner, G. Kéri, R. Schwab, A. Venetianer, H. Kessler, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3723.
- [323] E. Locardi, M. Stöckle, S. Gruner, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8189.
- [324] M. Bergmann, L. Zervas, *Chem. Ber.* **1932**, *65*, 1192.
- [325] E. Schnabel, Klostern.H, H. Berndt, *Ann. Chem.* **1971**, *749*, 90.
- [326] S. R. Chhabra, B. Hothi, D. J. Evans, P. D. White, B. W. Bycroft, W. C. Chan, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1603.
- [327] B. W. Bycroft, W. C. Chan, S. R. Chhabra, N. D. Hone, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 778.
- [328] G. Thumshirn, U. Hersel, S. L. Goodman, H. Kessler, *Chem. Eur. J.*, submitted **2003**.
- [329] A. M. P. Koskinen, T. Valo, S. Vihavainen, J. M. L. Hakala, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 573.
- [330] T. Minko, P. V. Paranjpe, B. Qiu, A. Laloo, R. Won, S. Stein, P. J. Sinko, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2002**, *50*, 143.
- [331] V. E. Zaitseva, N. S. Badaev, A. I. Zosimovskaia, V. V. Terskikh, *Tsitologiya* **1979**, *21*, 112.
- [332] K. J. McAnaney, R. F. Harris, W. R. Gardner, *Soil Science Society of America Journal* **1982**, *46*, 542.
- [333] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033.
- [334] G. Steinbach, *Acta Histochemica* **1974**, *50*, 19.
- [335] H. Maeda, N. Ishida, H. Kawauchi, K. Tuzimura, *J. Biochem.* **1969**, *65*, 777.
- [336] M. N. Maisey, *Br. J. Radiol.* **2002**, *1*.
- [337] W. A. Volkert, T. J. Hoffman, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2269.
- [338] P. A. Schubiger, R. Alberto, A. Smith, *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 165.
- [339] W. Wolf, J. Shani, *Nucl. Med. Biol.* **1986**, *13*, 319.
- [340] Y. H. Jang, M. Blanco, S. Dasgupta, D. A. Keire, J. E. Shively, W. A. Goddard, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6142.
- [341] M. Li, C. F. Meares, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 275.
- [342] D. Parker, *Chem. Soc. Rev.* **1990**, *19*, 271.



- [343] M. W. Brechbiel, O. A. Gansow, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 187.
- [344] C. J. Broan, J. P. L. Cox, A. S. Craig, R. Katakya, D. Parker, A. Harrison, A. M. Randall, G. Ferguson, *J. Chem. Soc. Perk. T 2* **1991**, 87.
- [345] M. W. Brechbiel, O. A. Gansow, R. W. Atcher, J. Schlom, J. Esteban, D. E. Simpson, D. Colcher, *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 2772.
- [346] D. A. Keire, M. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 454.
- [347] Y. F. Liu, C. C. Wu, *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 427.
- [348] S. Froidevaux, A. N. Eberle, *Biopolymers* **2002**, *66*, 161.
- [349] B. F. Bernard, E. Krenning, W. A. P. Breeman, T. J. Visser, W. H. Bakker, A. Srinivasan, M. De Jong, *Nucl. Med. Commun.* **2000**, *21*, 1079.
- [350] A. Otte, E. Jermann, M. Behe, M. Goetze, H. C. Bucher, H. W. Roser, A. Heppeler, J. MuellerBrand, H. R. Maecke, *Eur. J. Nucl. Med.* **1997**, *24*, 792.
- [351] E. P. Krenning, D. J. Kwekkeboom, W. H. Bakker, W. A. P. Breeman, P. P. M. Kooij, H. Y. Oei, M. Vanhagen, P. T. E. Postema, M. Dejong, J. C. Reubi, T. J. Visser, A. E. M. Reijs, L. J. Hofland, J. W. Koper, S. W. J. Lamberts, *Eur. J. Nucl. Med.* **1993**, *20*, 716.
- [352] W. H. Bakker, R. Albert, C. Bruns, W. A. P. Breeman, L. J. Hofland, P. Marbach, J. Pless, D. Pralet, B. Stolz, J. W. Koper, S. W. J. Lamberts, T. J. Visser, E. P. Krenning, *Life Sci.* **1991**, *49*, 1583.
- [353] S. Liu, E. Cheung, M. C. Ziegler, M. Rajopadhye, D. S. Edwards, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 559.
- [354] R. Borade, R. Weissleder, T. Nakakoshi, A. Moore, C. H. Tung, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 301.
- [355] M. F. Giblin, N. Wang, T. J. Hoffman, S. S. Jurisson, T. P. Quinn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1998**, *95*, 12814.
- [356] L. Ning, J. Jiannan, Z. Shuyuan, L. Deyuan, W. Juan, Z. Maolun, L. Lin, W. Fangyuan, *J. Labelled Compd. Rad.* **1995**, *36*, 1105.
- [357] A. Heppeler, S. Froidevaux, H. R. Macke, E. Jermann, M. Behe, P. Powell, M. Hennig, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1974.
- [358] K. Kumar, M. Magerstaedt, O. A. Gansow, *Chem. Commun.* **1989**, 145.
- [359] E. G. von Roedern, E. Lohof, G. Hessler, M. Hoffmann, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10156.
- [360] H. Kessler, B. Kutscher, *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, *0*, 869.
- [361] S. Wolfe, M. G. Jokinen, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1388.
- [362] E. Lerch, M. Hesse, *Helv. Chim. Acta* **1974**, *57*, 1584.
- [363] S. A. Kates, N. A. Sole, C. R. Johnson, D. Hudson, G. Barany, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1549.
- [364] P. Rovero, L. Quartara, G. Fabbri, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2639.
- [365] W. C. Chan, B. W. Bycroft, D. J. Evans, P. D. White, *Chem. Commun.* **1995**, 2209.
- [366] D. H. Live, Z. G. Wang, U. Iserloh, S. J. Danishefsky, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 851.
- [367] T. Johnson, M. Liley, T. J. Cheeseright, F. Begum, *J. Chem. Soc. Perk. T 1* **2000**, 2811.
- [368] D. Delforge, M. Dieu, E. Delaive, M. Art, B. Gillon, B. Devreese, M. Raes, J. VanBeeumen, J. Remacle, *Lett. Pept. Sci.* **1996**, *3*, 89.
- [369] E. Nicolas, E. Pedroso, E. Giralt, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 497.
- [370] C. Flouzat, F. Marguerite, F. Croizet, M. Percebois, A. Monteil, M. Combourieu, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1191.
- [371] J. Alsina, F. Rabanal, E. Giralt, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9633.
- [372] A. Trzeciak, W. Bannwarth, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4557.
- [373] J. S. McMurray, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7679.
- [374] B. Kellam, W. C. Chan, S. R. Chhabra, B. W. Bycroft, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5391.
- [375] R. Albert, J. Danklmaier, H. Honig, H. Kandolf, *Synthesis* **1987**, 635.
- [376] R. J. Tennant-Eyles, A. J. Fairbanks, *Tetrahedron Asymmetr.* **1999**, *10*, 391.
- [377] R. Roeske, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 1251.

- [378] A. Armstrong, I. Brackenridge, R. F. W. Jackson, J. M. Kirk, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 2483.
- [379] E. Taschner, B. Bator, A. Chimiak, T. Sokolowska, *Ann. Chem.* **1961**, 646, 134.
- [380] S. C. Story, J. V. Aldrich, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, 43, 292.
- [381] R. B. Merrifield, B. F. Gisin, A. N. Bach, *J. Org. Chem.* **1977**, 42, 1291.
- [382] T. Rückle, P. d. Lavallaz, M. Keller, P. Dumy, M. Mutter, *Tetrahedron* **1999**, 55, 11281.
- [383] N. Schmiedeberg, H. Kessler, *Org. Lett.* **2002**, 4, 59.
- [384] V. G. Gore, M. D. Chordia, N. S. Narasimhan, *Tetrahedron* **1990**, 46, 2483.
- [385] J. A. Fix, *Pharm. Res.* **1996**, 13, 1760.
- [386] G. L. Olson, D. R. Bolin, M. P. Bonner, M. Bos, C. M. Cook, D. C. Fry, B. J. Graves, M. Hatada, D. E. Hill, M. Kahn, et al., *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 3039.
- [387] S. J. Weber, D. L. Greene, V. J. Hruby, H. I. Yamamura, F. Porreca, T. P. Davis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, 263, 1308.
- [388] B. Riniker, R. Schwyzer, *Helv. Chim. Acta* **1964**, 47, 2357.
- [389] D. L. Steer, R. A. Lew, P. Perlmutter, A. I. Smith, M. I. Aguilar, *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 811.
- [390] M. Rodriguez, P. Fulcrand, J. Laur, A. Aumelas, J. P. Bali, J. Martinez, *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 522.
- [391] M. A. Ondetti, S. L. Engel, *J. Med. Chem.* **1975**, 18, 761.
- [392] D. Seebach, S. Abele, J. V. Schreiber, B. Martinoni, A. K. Nussbaum, H. Schild, H. Schulz, H. Hennecke, R. Woessner, F. Bitsch, *Chimia* **1998**, 52, 734.
- [393] T. Hintermann, D. Seebach, *Chimia* **1997**, 51, 244.
- [394] S. A. Mantey, D. H. Coy, T. K. Pradhan, H. Igarashi, I. M. Rizo, L. Shen, W. Hou, S. J. Hocart, R. T. Jensen, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 9219.
- [395] P. E. Thompson, D. L. Steer, M. I. Aguilar, M. T. Hearn, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 2699.
- [396] T. Yamazaki, A. Probsti, P. W. Schiller, M. Goodman, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 37, 364.
- [397] B. Bozu, F. Fulop, G. K. Toth, G. Toth, M. Szucs, *Neuropeptides* **1997**, 31, 367.
- [398] H. Neumann, A. J. von Wangelin, D. Gordes, A. Spannenberg, W. Baumann, M. Beller, *Tetrahedron* **2002**, 58, 2381.
- [399] A. J. von Wangelin, H. Neumann, D. Gordes, A. Spannenberg, M. Beller, *Org. Lett.* **2001**, 3, 2895.
- [400] H. Neumann, A. J. von Wangelin, D. Gordes, A. Spannenberg, M. Beller, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8398.
- [401] J. K. Whitesell, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 953.
- [402] D. L. J. Clive, Y. X. Bo, N. Selvakumar, R. McDonald, B. D. Santarsiero, *Tetrahedron* **1999**, 55, 3277.
- [403] W. Oppolzer, M. Kurth, D. Reichlin, C. Chapuis, M. Mohnhaupt, F. Moffatt, *Helv. Chim. Acta* **1981**, 64, 2802.
- [404] E. J. Corey, H. E. Ensley, *J Am Chem Soc* **1975**, 97, 6908.
- [405] E. J. Corey, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2002**, 41, 1650.
- [406] B. Depascualteresa, J. Gonzalez, A. Asensio, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4347.
- [407] V. Branchadell, A. Oliva, R. M. Ortuno, S. Rafel, M. Ventura, *Tetrahedron* **1992**, 48, 9001.
- [408] P. R. Carlier, E. S. H. Chow, R. L. Barlow, J. R. Bloomquist, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 1985.
- [409] L. Peterlin-Masic, A. Jurca, P. Marinko, A. Jancar, D. Kikelj, *Tetrahedron* **2002**, 58, 1557.
- [410] A. F. Barrero, E. J. Alvarez-Manzaneda, R. Chahboun, C. G. Diaz, *Synlett* **2000**, 1561.
- [411] F. Campos, M. P. Bosch, A. Guerrero, *Tetrahedron-Asymmetry* **2000**, 11, 2705.
- [412] R. D. Haworth, L. H. C. Lunts, J. McKenna, *J. Chem. Soc.* **1955**, 986.

- [413] P. A. Harland, P. Hodge, W. Maughan, E. Wildsmith, *Synthesis* **1984**, 941.
- [414] D. L. Boger, D. Johannes, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2498.
- [415] R. J. Bergeron, J. S. McManis, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3108.
- [416] H. Yajima, H. Ogawa, H. Sakurai, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 909.
- [417] S. Matsuura, C. H. Niu, J. S. Cohen, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, 451.
- [418] H. Yajima, N. Fujii, H. Ogawa, H. Kawatani, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1974**, 107.
- [419] M. Nishida, H. Hayashi, Y. Yamaura, E. Yanaginuma, O. Yonemitsu, A. Nishida, N. Kawahara, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 269.
- [420] H. Yajima, S. Futaki, A. Otaka, T. Yamashita, S. Funakoshi, K. Bessho, N. Fujii, K. Akaji, *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 4356.
- [421] J. B. Ball, P. F. Alewood, *J. Mol. Recognit.* **1990**, *3*, 55.
- [422] U. Egner, A. Mueller-Fahrnow, E. Eckle, *Pest. Sci.* **1997**, *51*, 95.
- [423] S. Hanessian, G. McNaughtonSmith, H. G. Lombart, W. D. Lubell, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 12789.
- [424] G. Hölzemann, *Kontakte (Darmstadt)* **1991**, *2*, 55.
- [425] G. Hölzemann, *Kontakte (Darmstadt)* **1991**, *1*, 3.
- [426] G. D. Rose, L. M. Gierasch, J. A. Smith, *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 1.
- [427] M. G. Hinds, N. G. J. Richards, J. A. Robinson, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 1447.
- [428] D. S. Kemp, P. E. McNamara, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5834.
- [429] U. Nagai, K. Sato, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 647.
- [430] R. M. Freidinger, D. S. Perlow, D. F. Veber, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 104.
- [431] G. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2767.
- [432] D. Seebach, M. Rueping, P. I. Arvidsson, T. Kimmerlin, P. Micuch, C. Noti, D. Langenegger, D. Hoyer, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 3503.
- [433] R. R. Gardner, G. B. Liang, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1806.
- [434] P. Wipf, T. C. Henninger, S. J. Geib, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6088.
- [435] R. R. Gardner, G. B. Liang, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3280.
- [436] S. Oishi, T. Kamano, A. Niida, Y. Odagaki, N. Hamanaka, M. Yamamoto, K. Ajito, H. Tamamura, A. Otaka, N. Fujii, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6162.
- [437] R. W. Hoffmann, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1841.
- [438] U. Schopfer, M. Stahl, T. Brandl, R. W. Hoffmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1745.
- [439] R. W. Hoffmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 1124.
- [440] R. W. Hoffmann, U. Schopfer, G. Muller, T. Brandl, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 4424.
- [441] P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier, R. Guillemin, *Science* **1973**, *179*, 77.
- [442] A. Janecka, M. Zubrzycka, T. Janecki, *J. Pept. Res.* **2001**, *58*, 91.
- [443] L. Pradayrol, H. Jornvall, V. Mutt, A. Ribet, *FEBS Lett.* **1980**, *109*, 55.
- [444] R. Benoit, F. Esch, H. P. Bennett, N. Ling, M. Ravazzola, L. Orci, E. J. Mufson, *Metabolism* **1990**, *39*, 22.
- [445] J. Alumets, F. Sundler, R. Hakanson, *Cell Tissue Res.* **1977**, *185*, 465.
- [446] T. Hokfelt, S. Efendic, C. Hellerstrom, O. Johansson, R. Luft, A. Arimura, *Acta Endocrinol. Suppl.* **1975**, *200*, 5.
- [447] S. Reichlin, *N. Engl. J. Med.* **1983**, *309*, 1556.
- [448] S. Reichlin, *N. Engl. J. Med.* **1983**, *309*, 1495.
- [449] Y. C. Patel, *J. Endocrinol. Invest.* **1997**, *20*, 348.
- [450] C. Johansson, O. Wisen, S. Efendic, K. Uvnas-Wallensten, *Digestion* **1981**, *22*, 126.
- [451] D. J. Koerker, L. A. Harker, C. J. Goodner, *N. Engl. J. Med.* **1975**, *293*, 476.
- [452] J. E. Gerich, R. Lovinger, G. M. Grodsky, *Endocrinology* **1975**, *96*, 749.
- [453] S. R. Bloom, J. M. Polak, *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* **1987**, *295*, 288.

- [454] G. Ösapay, L. Prokai, H. S. Kim, K. F. Medzihradzky, D. H. Coy, G. Liapakis, T. Reisine, G. Melacini, Q. Zhu, S. H. Wang, R. H. Mattern, M. Goodman, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2241.
- [455] Y. C. Patel, *Front. Neuroendocrinol.* **1999**, *20*, 157.
- [456] Y. Yamada, S. Kagimoto, A. Kubota, K. Yasuda, K. Masuda, Y. Someya, Y. Ihara, Q. Li, H. Imura, S. Seino, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *195*, 844.
- [457] Y. Yamada, S. R. Post, K. Wang, H. S. Tager, G. I. Bell, S. Seino, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 251.
- [458] Y. Yamada, T. Reisine, S. F. Law, Y. Ihara, A. Kubota, S. Kagimoto, M. Seino, Y. Seino, G. I. Bell, S. Seino, *Mol. Endocrinol.* **1992**, *6*, 2136.
- [459] K. Raynor, A. M. O'Carroll, H. Kong, K. Yasuda, L. C. Mahan, G. I. Bell, T. Reisine, *Mol. Pharmacol.* **1993**, *44*, 385.
- [460] K. Raynor, W. A. Murphy, D. H. Coy, J. E. Taylor, J. P. Moreau, K. Yasuda, G. I. Bell, T. Reisine, *Mol. Pharmacol.* **1993**, *43*, 838.
- [461] T. Reisine, G. I. Bell, *Endocr. Rev.* **1995**, *16*, 427.
- [462] J. C. Reubi, J. C. Schaer, B. Waser, C. Hoeger, J. Rivier, *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *345*, 103.
- [463] P. Jais, B. Terris, P. Ruzniewski, M. LeRomancer, F. Reyl-Desmars, C. Vissuzaine, G. Cadiot, M. Mignon, M. J. Lewin, *Eur. J. Clin. Invest.* **1997**, *27*, 639.
- [464] J. C. Reubi, E. Krenning, S. W. Lamberts, L. Kvols, *Digestion* **1993**, *54*, 76.
- [465] I. Virgolini, T. Pangerl, C. Bischof, P. Smith-Jones, M. Peck-Radosavljevic, *Eur. J. Clin. Invest.* **1997**, *27*, 645.
- [466] J. C. Reubi, J. C. Schaer, B. Waser, G. Mengod, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 3455.
- [467] J. R. Delfs, M. A. Dichter, *J. Neurosci.* **1983**, *3*, 1176.
- [468] Y. C. Patel, C. B. Srikant, *Endocrinology* **1994**, *135*, 2814.
- [469] C. Bruns, F. Raulf, D. Hoyer, J. Schloos, H. Lubbert, G. Weckbecker, *Metabolism* **1996**, *45*, 17.
- [470] J. Rivier, M. Brown, W. Vale, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *65*, 746.
- [471] W. Vale, P. Brazeau, C. Rivier, M. Brown, B. Boss, J. Rivier, R. Burgus, N. Ling, R. Guillemin, *Recent Prog. Horm. Res.* **1975**, *31*, 365.
- [472] M. Brown, J. Rivier, W. Vale, *Metabolism* **1976**, *25*, 1501.
- [473] M. Brown, J. Rivier, W. Vale, *Science* **1977**, *196*, 1467.
- [474] W. Vale, J. Rivier, N. Ling, M. Brown, *Metabolism* **1978**, *27*, 1391.
- [475] W. Bauer, U. Briner, W. Doepfner, R. Haller, R. Huguenin, P. Marbach, T. J. Petcher, Pless, *Life Sci.* **1982**, *31*, 1133.
- [476] B. Eriksson, E. T. Janson, N. D. Bax, M. Mignon, R. Morant, P. Opolon, P. Rougier, K. E. Oberg, *Digestion* **1996**, *57*, 77.
- [477] H. Parmar, A. Bogden, M. Mollard, B. de Rouge, R. H. Phillips, S. L. Lightman, *Cancer Treat. Rev.* **1989**, *16*, 95.
- [478] R. Z. Cai, B. Szoke, R. Lu, D. Fu, T. W. Redding, A. V. Schally, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 1896.
- [479] R. Z. Cai, T. Karashima, J. Guoth, B. Szoke, D. Olsen, A. V. Schally, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 2502.
- [480] W. A. Murphy, V. A. Lance, S. Moreau, J. P. Moreau, D. H. Coy, *Life Sci.* **1987**, *40*, 2515.
- [481] S. W. Lamberts, E. P. Krenning, J. C. Reubi, *Endocrin. Rev.* **1991**, *12*, 450.
- [482] K. Kutz, E. Nuesch, J. Rosenthaler, *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* **1986**, *119*, 65.
- [483] J. M. Kuhn, C. Basin, M. Mollard, B. de Rouge, C. Baudoin, R. Obach, G. Tolis, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1993**, *45*, 73.
- [484] T. A. Tran, R. H. Mattern, B. A. Morgan, J. E. Taylor, M. Goodman, *J. Pept. Res.* **1999**, *53*, 134.
- [485] D. F. Veber, F. W. Holly, R. F. Nutt, S. J. Bergstrand, S. F. Brady, R. Hirschmann, M. S. Glitzer, R. Saperstein, *Nature* **1979**, *280*, 512.

- [486] D. F. Veber, R. M. Freidlinger, D. S. Perlow, W. J. Paleveda, Jr., F. W. Holly, R. G. Strachan, R. F. Nutt, B. H. Arison, C. Homnick, W. C. Randall, M. S. Glitzer, R. Saperstein, R. Hirschmann, *Nature* **1981**, 292, 55.
- [487] R. F. Nutt, D. F. Veber, P. E. Curley, R. Saperstein, R. Hirschmann, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1983**, 21, 66.
- [488] D. F. Veber, R. Saperstein, R. F. Nutt, R. M. Freidinger, S. F. Brady, P. Curley, D. S. Perlow, W. J. Paleveda, C. D. Colton, A. G. Zacchei, et al., *Life Sci.* **1984**, 34, 1371.
- [489] R. Hirschmann, K. C. Nicolaou, S. Pietranico, E. M. Leahy, J. Salvino, B. Arison, M. A. Cichy, P. G. Spoor, W. C. Shakespeare, P. A. Sprengeler, P. Hamley, A. B. Smith, III, T. Reisine, K. Raynor, L. Maechler, C. Donaldson, W. Vale, R. M. Freidinger, M. R. Cascieri, C. D. Strader, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 12550.
- [490] R. Hirschmann, K. C. Nicolaou, S. Pietranico, J. Salvino, E. M. Leahy, P. A. Sprengeler, G. Furst, A. B. Smith III, C. D. Strader, M. A. Cascieri, M. R. Candelore, C. Donaldson, W. Vale, L. Maechler, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9217.
- [491] L. Yang, L. Guo, A. Pasternak, R. Mosley, S. Rohrer, E. Birzin, F. Foor, K. Cheng, J. Schaeffer, A. A. Patchett, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 2175.
- [492] L. Yang, S. C. Berk, S. P. Rohrer, R. T. Mosley, L. Guo, D. J. Underwood, B. H. Arison, E. T. Birzin, E. C. Hayes, S. W. Mitra, R. M. Parmar, K. Cheng, T. J. Wu, B. S. Butler, F. Foor, A. Pasternak, Y. Pan, M. Silva, R. M. Freidinger, R. G. Smith, K. Chapman, J. M. Schaeffer, A. A. Patchett, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1998**, 95, 10836.
- [493] S. P. Rohrer, E. T. Birzin, R. T. Mosley, S. C. Berk, S. M. Hutchins, D. M. Shen, Y. Xiong, E. C. Hayes, R. M. Parmar, F. Foor, S. W. Mitra, S. J. Degrado, M. Shu, J. M. Klopp, S. J. Cai, A. Blake, W. W. Chan, A. Pasternak, L. Yang, A. A. Patchett, R. G. Smith, K. T. Chapman, J. M. Schaeffer, *Science* **1998**, 282, 737.
- [494] R. M. Freidinger, D. S. Perlow, W. C. Randall, R. Saperstein, B. H. Arison, D. F. Veber, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1984**, 23, 142.
- [495] H. Kessler, M. Bernd, H. Kogler, J. Zarbock, O. W. Soerensen, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 6944.
- [496] D. F. Mierke, C. Pattaroni, N. Delaet, A. Toy, M. Goodman, T. Tancredi, A. Motta, P. A. Temussi, L. Moroder, G. Bovermann, et al., *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 36, 418.
- [497] G. Melacini, Q. Zhu, G. Osapay, M. Goodman, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 2252.
- [498] S. A. Gruner, G. Keri, R. Schwab, A. Venetianer, H. Kessler, *Org. Lett.* **2001**, 3, 3723.
- [499] S. A. Gruner, *Dissertation* **2002**, TU München.
- [500] M. H. Oliver, N. K. Harrison, J. E. Bishop, P. J. Cole, G. J. Laurent, *J. Cell Sci.* **1989**, 92, 513.
- [501] A. A. van de Loosdrecht, R. H. Beelen, G. J. Ossenkuppele, M. G. Broekhoven, M. M. Langenhuijsen, *J. Immunol. Methods* **1994**, 174, 311.
- [502] T. G. Obrig, W. J. Culp, W. L. McKeehan, B. Hardesty, *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 174.
- [503] R. E. Hurd, *J. Magn. Reson.* **1990**, 87, 422.
- [504] U. Piantini, O. W. Soerensen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 6800.
- [505] G. Kontaxis, J. Stonehouse, E. D. Laue, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **1994**, 111, 70.
- [506] A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* **1985**, 65, 355.
- [507] A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* **1985**, 63, 207.
- [508] C. Griesinger, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1987**, 75, 261.
- [509] T. L. Hwang, M. Kadkhodaei, A. Mohebbi, A. J. Shaka, *Magn. Reson. Chem.* **1992**, 30, S24.
- [510] R. Abseher, S. Ludemann, H. Schreiber, O. Steinhauser, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4006.
- [511] A. Kumar, G. Wagner, R. R. Ernst, K. Wuthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 3654.
- [512] D. Kominos, A. K. Suri, D. B. Kitchen, D. Bassolino, R. M. Levi, *J. Magn. Reson.* **1992**, 97, 398.

- [513] D. F. Mierke, H. Kessler, *Biopolymers* **1993**, 33, 1003.
- [514] T. F. Havel, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1991**, 56, 43.
- [515] T. F. Havel, *Quantum Chemistry Program, Exchange No. 507, Indiana University 1988*.
- [516] A. T. Hagler, L. S., P. Dauber, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 5122.
- [517] M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2870.
- [518] M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, 30, 11.
- [519] V. F. Bystrov, A. S. Arseniev, Y. D. Gavrilov, *J. Magn. Reson.* **1978**, 30, 151.
- [520] V. I. Bystrov, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1976**, 10, 41.
- [521] Ovchinnikov, V. T. Ivanov, *Tetrahedron* **1974**, 30, 1871.
- [522] Y. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, *Tetrahedron* **1975**, 31, 2177.
- [523] Z. W. Huang, Y. B. He, K. Raynor, M. Tallent, T. Reisine, M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9390.
- [524] H. Kessler, M. Bernd, H. Kogler, J. Zarbock, O. W. Sorensen, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 6944.
- [525] Y. B. He, Z. W. Huang, K. Raynor, T. Reisine, M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8066.
- [526] H. Kessler, S. Seip, *NMR of Peptides*, VCH Publishers, **1994**.
- [527] B. Picur, I. Z. Siemion, *Org. Magn. Reson.* **1983**, 21, 271.
- [528] M. W. Holladay, M. J. Bennett, M. D. Tufano, C. W. Lin, K. E. Asin, D. G. Witte, T. R. Miller, B. R. Bianchi, A. L. Nikkel, L. Bednarz, A. M. Nadzan, *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 2919.
- [529] W. Vale, M. Brown, C. Rivier, M. Perrin, J. Rivier, in *Brain Pept.: New Endocrinol., Proc. Argenteuil Symp. 4th*, **1979**, pp. 71.
- [530] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science* **1987**, 238, 491.
- [531] S. M. Albelda, C. A. Buck, *FASEB J.* **1990**, 4, 2868.
- [532] J. Travis, *Science* **1993**, 260, 906.
- [533] R. O. Hynes, *Cell* **1992**, 69, 11.
- [534] J. A. Eble, in *Integrin-Ligand Interaction* (Ed.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, pp. 1.
- [535] C. H. Damsky, M. Bernfield, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1990**, 2, 813.
- [536] K. M. Yamada, S. Miyamoto, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1995**, 7, 681.
- [537] E. A. Clark, J. S. Brugge, *Science* **1995**, 268, 233.
- [538] A. Howe, A. E. Aplin, S. K. Alahari, R. L. Juliano, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, 10, 220.
- [539] F. G. Giancotti, E. Ruoslahti, *Science* **1999**, 285, 1028.
- [540] S. Dedhar, *Curr. Opin. Hematol.* **1999**, 6, 37.
- [541] R. R. Hantgan, C. Paumi, M. Rocco, J. W. Weisel, *Biochemistry* **1999**, 38, 14461.
- [542] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 21785.
- [543] J. Takagi, H. P. Erickson, T. A. Springer, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 412.
- [544] V. W. Engleman, M. S. Kellogg, T. E. Rogers, *Ann. Rep. Med. Chem.* **1996**, 191.
- [545] I. Ojima, S. Chakravarty, Q. Dong, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 337.
- [546] J. Samaanen, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1996**, 31, 91.
- [547] B. S. Coller, *J. Clin. Invest.* **1997**, 99, 1467.
- [548] J. S. Bennett, *Annu. Rev. Med.* **2001**, 52, 161.
- [549] D. T. Denhardt, X. Guo, *FASEB J.* **1993**, 7, 1475.
- [550] M. Grano, P. Zigrino, S. Colucci, G. Zambonin, L. Trusolino, M. Serra, N. Baldini, A. Teti, P. C. Marchisio, A. Z. Zallone, *Exp. Cell Res.* **1994**, 212, 209.
- [551] J. Savill, I. Dransfield, N. Hogg, C. Haslett, *Nature* **1990**, 343, 170.
- [552] E. Noiri, J. Gailit, D. Sheth, H. Magazine, M. Gurrath, G. Muller, H. Kessler, M. S. Goligorsky, *Kidney Int.* **1994**, 46, 1050.
- [553] C. M. Storgard, D. G. Stupack, A. Jonczyk, S. L. Goodman, R. I. Fox, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1999**, 103, 47.
- [554] H. Le Breton, E. F. Plow, E. J. Topol, *J. Am. Coll. Cardiol.* **1996**, 28, 1643.

- [555] H. P. Hammes, M. Brownlee, A. Jonczyk, A. Sutter, K. T. Preissner, *Nat. Med.* **1996**, 2, 529.
- [556] J. M. Breuss, N. Gillett, L. Lu, D. Sheppard, R. Pytela, *J. Histochem. Cytochem.* **1993**, 41, 1521.
- [557] M. Agrez, A. Chen, R. I. Cone, R. Pytela, D. Sheppard, *J. Cell Biol.* **1994**, 127, 547.
- [558] F. G. Giancotti, F. Mainiero, *Biochim. Biophys. Acta.* **1994**, 1198, 47.
- [559] J. Samanen, Z. Jonak, D. Rieman, T.-L. Yue, *Curr. Pharm. Des.* **1997**, 3, 545.
- [560] C. L. Gladson, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1991**, 88, 1924.
- [561] J. F. Marshall, S. A. Nesbitt, M. H. Helfrich, M. A. Horton, K. Polakova, I. R. Hart, *Int. J. Cancer.* **1991**, 49, 924.
- [562] R. M. Lafrenie, S. Gallo, T. J. Podor, M. R. Buchanan, F. W. Orr, *Eur. J. Cancer* **1994**, 14, 2151.
- [563] J. I. Jones, M. E. Doerr, D. R. Clemmons, *Prog. Growth Factor Res.* **1995**, 6, 319.
- [564] H. Rabb, E. Barroso-Vicens, R. Adams, J. Pow-Sang, G. Ramirez, *Am. J. Nephrol.* **1996**, 16, 402.
- [565] S. Aznavoorian, M. L. Stracke, J. Parsons, J. McClanahan, L. A. Liotta, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 3247.
- [566] J. M. Lewis, D. A. Cheresh, M. A. Schwartz, *J. Cell Biol.* **1996**, 134, 1323.
- [567] B. Felding-Habermann, B. M. Mueller, C. A. Romerdahl, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1992**, 89, 2018.
- [568] P. A. D'Amore, R. W. Thompson, *Annu. Rev. Physiol.* **1987**, 49, 453.
- [569] J. Folkman, *Nat. Med.* **1995**, 1, 27.
- [570] J. Folkman, M. Klagsbrun, *Science* **1987**, 235, 442.
- [571] P. C. Brooks, R. A. F. Clark, D. A. Cheresh, *Science* **1994**, 264, 569.
- [572] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, 291, 50.
- [573] M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. T. J. Engel, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 20233.
- [574] A. M. P. Montgomery, R. A. Reisfeld, D. A. Cheresh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 8856.
- [575] E. Ruoslahti, J. C. Reed, *Cell* **1994**, 77, 477.
- [576] C. B. Thompson, *Science* **1995**, 267, 1456.
- [577] A. Rezanian, C. H. Thomas, A. B. Branger, C. M. Waters, K. E. Healy, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 37, 9.
- [578] D. Delforge, B. Gillon, M. Art, J. Dewelle, M. Raes, J. Remacle, *Lett. Pept. Sci.* **1998**, 5, 87.
- [579] D. M. Ferris, G. D. Moodie, P. M. Dimond, C. W. Gioranni, M. G. Ehrlich, R. F. Valentini, *Biomaterials* **1999**, 20, 2323.
- [580] D. Finsinger, Dissertation, Technische Universität München (München), **1997**.
- [581] M. Kantlehner, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 587.
- [582] M. Kantlehner, Dissertation, Technische Universität München (München), **2000**.
- [583] M. A. Horton, *Bone* **1995**, 17, 51S.
- [584] J. E. Fisher, M. P. Caulfield, M. Sato, H. A. Quartuccio, R. J. Gould, V. M. Garsky, G. A. Rodan, M. Rosenblatt, *Endocrinology* **1993**, 132, 1411.
- [585] M. W. Lark, G. B. Stroup, S. M. Hwang, I. E. James, D. J. Rieman, F. H. Drake, J. N. Bradbeer, A. Mathur, K. F. Erhard, K. A. Newlander, S. T. Ross, K. L. Salyers, B. R. Smith, W. H. Miller, W. F. Huffman, M. Gowen, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, 291, 612.
- [586] M. J. Humphries, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 311.
- [587] T. A. Springer, *Nature* **1990**, 346, 425.
- [588] C. M. Isacke, M. A. Horton, in *The Adhesion Molecule Facts Book*, 2 ed., Academic Press, San Diego, **2000**, pp. 149.
- [589] M. Pfaff, in *Integrin-Ligand Interaction* (Ed.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, pp. 101.

- [590] S. Suzuki, Y. Naitho, *EMBO J.* **1990**, *9*, 757.
- [591] N. Dana, D. M. Fathallah, M. A. Arnaout, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 3106.
- [592] R. Briesewitz, M. R. Epstein, E. E. Marcantonio, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 2989.
- [593] J. S. Bennett, M. A. Kolodziej, G. Vilaire, M. Poncz, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 3580.
- [594] R. O. Hynes, *Cell* **1987**, *48*, 549.
- [595] D. J. Rees, E. S. Ades, S. J. Singer, R. O. Hynes, *Nature* **1990**, *347*, 685.
- [596] A. P. Gilmore, K. Burridge, *Nature* **1995**, *373*, 197.
- [597] R. P. Johnson, S. W. Craig, *Nature* **1995**, *373*, 261.
- [598] C. A. Otey, F. M. Pavalko, K. Burridge, *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 721.
- [599] J. Bella, H. M. Berman, *Structure* **2000**, *8*, R121.
- [600] J.-O. Lee, P. Rieu, M. A. Arnaout, R. C. Liddington, *Cell* **1995**, *80*, 631.
- [601] C. A. Buck, A. F. Horwitz, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1987**, *3*, 179.
- [602] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Cell* **1986**, *44*, 517.
- [603] M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911.
- [604] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461.
- [605] F. Mitjans, T. Meyer, C. Fittschen, S. Goodman, A. Jonczyk, J. F. Marshall, G. Reyes, J. Piulats, *Int. J. Cancer* **2000**, *87*, 716.
- [606] M. A. Dechantsreiter, B. Mathä, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, in *Peptides 1996 (Proc. 24th European Peptide Symposium, September 8-13, 1996, Edinburgh, Scotland)* (Eds.: R. Ramage, R. Epton), Mayflower Scientific Ltd., England, **1998**, pp. 329.
- [607] J. Wermuth, Dissertation, Technische Universität München (München), **1996**.
- [608] J. S. Schmitt, Dissertation, Technische Universität München **1998**.
- [609] V. W. Engleman, G. A. Nickols, F. P. Ross, M. A. Horton, D. W. Griggs, S. L. Settle, P. G. Ruminski, S. L. Teitelbaum, *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 2284.
- [610] C. P. Carron, D. M. Meyer, J. A. Pegg, V. W. Engleman, M. A. Nickols, S. L. Settle, W. F. Westlin, P. G. Ruminski, G. A. Nickols, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1930.
- [611] G. A. Sulyok, C. Gibson, S. L. Goodman, G. Holzemann, M. Wiesner, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1938.
- [612] T. W. Ku, F. E. Ali, L. S. Barton, J. W. Bean, W. E. Bondinell, J. L. Burgess, J. F. Callahan, R. R. Calvo, L. Chen, D. S. Eggleston, J. G. Gleason, W. F. Huffman, S. M. Hwang, D. R. Jakas, C. B. Karash, R. M. Keenan, K. D. Kopple, W. H. Miller, K. A. Newlander, A. Nichols, M. F. Parker, I. Uzinskas, J. W. Venslavsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8861.
- [613] R. M. Keenan, W. H. Miller, C. Kwon, F. E. Ali, J. F. Callahan, R. R. Calvo, S.-M. Hwang, K. D. Kopple, C. E. Peishoff, J. M. Samanen, A. S. Wong, C.-K. Yuan, W. F. Huffman, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2289.
- [614] R. M. Keenan, M. A. Lago, W. H. Miller, F. E. Ali, R. D. Cousins, L. B. Hall, S.-M. Hwang, D. R. Jakas, C. Kwon, C. Louden, T. T. Nguyen, E. H. Ohlstein, D. J. Rieman, S. T. Ross, J. M. Samanen, B. R. Smith, J. Stadel, D. T. Takata, L. Vickery, C. C. K. Yuan, T.-L. Yue, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3171.
- [615] R. M. Keenan, W. H. Miller, L. S. Barton, W. E. Bondinell, R. D. Cousins, D. F. Eppley, S.-M. Hwang, C. Kwon, F. E. Ali, M. A. Lago, T. T. Nguyen, B. R. Smith, I. N. Uzinskas, C. C. K. Yuan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1801.
- [616] R. M. Keenan, W. H. Miller, M. A. Lago, F. E. Ali, W. E. Bondinell, J. F. Callahan, R. R. Calvo, R. D. Cousins, S.-M. Hwang, D. R. Jakas, T. W. Ku, C. Kwon, T. T. Nguyen, V. A. Reader, D. J. Rieman, S. T. Ross, D. T. Takata, I. N. Uzinskas, C. C. K. Yuan, B. R. Smith, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3165.
- [617] W. H. Miller, e. al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1807.
- [618] W. H. Miller, D. P. Alberts, P. K. Bhatnagar, W. E. Bondinell, P. K. Callahan, R. R. Calvo, R. D. Cousins, K. F. Erhard, D. A. Heerding, R. M. Keenan, C. Kwon, P. J. Manley, K. A. Newlander, S. T. Ross, J. M. Samanen, I. N. Uzinskas, J. W. Venslavsky, C. C.-K. Yuan, R. C. Haltiwanger, M. Gowen, S.-M. Hwang, I. E.



- James, M. W. Lark, D. J. Rieman, G. B. Stroup, L. M. Azzarano, K. L. Salyers, B. R. Smith, K. W. Ward, K. O. Johanson, W. F. Huffman, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 22.
- [619] S. L. Goodman, G. Holzemann, G. A. G. Sulyok, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1045.
- [620] A. M. Badger, S. Blake, R. Kapadia, S. Sarkar, J. Levin, B. A. Swift, S. J. Hoffman, G. B. Stroup, W. H. Miller, M. Gowen, M. W. Lark, *Arthritis. Rheum.* **2001**, *44*, 128.
- [621] M. E. Duggan, J. H. Hutchinson, *Exp. Opin. Ther. Patents* **2000**, *10*, 1367.
- [622] G. D. Hartman, M. E. Duggan, *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 1281.
- [623] J. S. Kerr, A. M. Slee, S. A. Mousa, *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 1271.
- [624] A. E. Adang, H. Lucas, A. P. de Man, R. A. Engh, P. D. Grootenhuys, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3603.
- [625] W. J. Pitts, J. Wityak, J. M. Smallheer, A. E. Tobin, J. W. Jetter, J. S. Buynitsky, P. P. Harlow, K. A. Solomon, M. H. Corjay, S. A. Mousa, R. R. Wexler, P. K. Jadhav, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 27.
- [626] A. Peyman, V. Wehner, J. Knolle, H. U. Stilz, G. Breipohl, K.-H. Scheunemann, D. Carniato, J.-M. Ruxer, J.-F. Gourvest, T. R. Gadek, S. Bodary, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 179.
- [627] A. C. Bach II, J. R. Espina, S. A. Jackson, P. F. W. Stouten, J. L. Duke, S. A. Mousa, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 293.
- [628] A. Giannis, F. Rübsam, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 606.
- [629] M. Miyashita, M. Akamatsu, Y. Hayashi, T. Ueno, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 859.
- [630] L. Tranqui, A. Andrieux, G. Hudry-Clergeon, J. J. Ryckewaert, S. Soyez, A. Chapel, M. H. Ginsberg, E. F. Plow, G. Marguerie, *J. Cell Biol.* **1989**, *108*, 2519.
- [631] G. Müller, M. Gurrath, H. Kessler, R. Timpl, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 326.
- [632] E. Lohof, E. Planker, C. Mang, F. Burkhart, M. A. Dechantsreiter, R. Haubner, H.-J. Wester, M. Schwaiger, G. Holzemann, S. L. Goodman, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2868.
- [633] R. Haubner, W. Schmitt, G. Hölzemann, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7881.
- [634] C. E. Peishoff, F. E. Ali, J. W. Bean, R. Calvo, C. A. Dambrosio, D. S. Eggleston, S. M. Hwang, T. P. Kline, P. F. Koster, A. Nichols, D. Powers, T. Romoff, J. M. Samanen, J. Stadel, J. A. Vasko, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3962.
- [635] M. Koppitz, M. Huenges, R. Gratias, H. Kessler, S. L. Goodman, A. Jonczyk, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1280.
- [636] M. Sukopp, L. Marinelli, M. Heller, T. Brandl, S. L. Goodman, E. W. Hoffmann, H. Kessler, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 4442.
- [637] E. Osawa, T. Ouchi, N. Saito, M. Yamato, O. S. Lee, M. K. Seo, *Magn. Reson. Chem.* **1992**, *30*, 1104.
- [638] K. Imai, E. Osawa, *Magn. Reson. Chem.* **1990**, *28*, 668.
- [639] Liu, M., Mao, Xi-an, Ye, C., Huang, H., Nicholson, J. K., Lindon, J. C., *J. Magn. Reson.* **1998**, *31*, 125.

## 7 Anhang

### 7.1 Strukturdaten von *cyclo(-D-Trp-Nle-Thr(Trt)-cβAA-Tyr-)* 258

**Table 7.1:** Chemische  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Verschiebung von *cyclo(-D-Trp-Nle-Thr(Trt)-cβAA-Tyr-)* 258 in DMSO bei 300 K und Temperaturgradienten der Amidprotonen.

	Chemische Verschiebung (ppm)						
	$\text{H}^{\text{N}}$	$\text{H}^{\alpha}$	$\text{H}^{\beta}$	$\text{H}^{\gamma}$	Aromat		
<b>Tyr</b>	7.85 4.4 <sup>b)</sup>	4.55	2.55 <sup>proS</sup> 2.64 <sup>proR</sup>			6.58 6.99	9.09 OH
<b>Trp</b>	8.16 9.2 <sup>b)</sup>	4.44	2.78 2.91		7.12 $\text{H}^2_{\text{Arom}}$	6.97/ 7.04 7.29/ 7.51	10.77 NH
<b>Nle</b>	8.61 4.9 <sup>b)</sup>	3.67	1.32	0.84 0.91	1.03 $\text{H}^{\delta}$ 0.72 $\text{H}^{\epsilon}$		
<b>Thr</b>	6.86 -1.0 <sup>b)</sup>	4.30	4.09	0.31			
<b>Trt</b>						7.22 7.26/ 7.42	
<b>cβAA<sup>a)</sup></b>	7.53 13.1 <sup>b)</sup>	2.47 $\text{H}^1$	4.78 $\text{H}^2$	5.34 $\text{H}^4$	2.09 $\text{H}^5$	1.63 $\text{H}^{6\text{proR}}$ 1.46 $\text{H}^{6\text{proS}}$	1.56 $\text{C}^3\text{-CH}_3$ 0.98 $\text{C}^5\text{-CH}_3$
	$\text{C}^{\alpha}$	$\text{C}^{\beta}$	$\text{C}^{\gamma}$	Aromat			
<b>Tyr</b>	56.1	37.9				115.2/ 130.7	
<b>Trp</b>	54.0	27.7			124.1 $\text{C}^{\delta}$	111.7/ 118.6 118.9/ 121.3	
<b>Nle</b>	55.1	30.5	28.0		21.7 $\text{C}^{\delta}$ 14.2 $\text{C}^{\epsilon}$		
<b>Thr</b>	56.5	69.2	15.5				
<b>Trt</b>						127.4 128.2/ 129.3	
<b>cβAA<sup>a)</sup></b>	44.3 $\text{C}^1$	47.7 $\text{C}^2$	131.3 $\text{C}^4$	31.2 $\text{C}^5$	28.4 $\text{C}^6$	21.8 $\text{C}^3\text{-CH}_3$ 22.1 $\text{C}^5\text{-CH}_3$	

<sup>a)</sup> Die Nummerierung der cβAA-Atome erfolgte in Übereinstimmung mit der IUPAC-Nomenklatur. <sup>b)</sup> Die Temperaturgradienten sind angegeben in  $-\Delta\delta/\Delta T$  [ppb/K].

**Tabelle 7.2:**  $^3J_{H,H}$ -Kopplungskonstanten der Amid- und Seitenkettenprotonen von cyclo(-D-Trp-Nle-Thr(Trt)-c $\beta$ AA-Tyr-) **258** gemessen in DMSO bei 300 K.

	$^3J_{H^N,H^\alpha}$	$^3J_{H^\alpha,H^\beta}$
<b>D-Trp</b>	7.7 Hz	7.3 Hz/ 7.5 Hz
<b>Nle</b>	7.3 Hz	–
<b>Thr(Trt)</b>	5.2 Hz	4.8 Hz
<b>c<math>\beta</math>AA</b>	9.9 Hz	3.6 Hz
<b>Tyr</b>	8.7 Hz	4.6 Hz/ 9.5 Hz

**Tabelle 7.3:** Abstand-restraints und ihre Verletzung während 150 ps MD-Simulation in DMSO von cyclo(-D-Trp-Nle-Thr(Trt)-c $\beta$ AA-Tyr-) **258**. Die Abstandsverletzungen wurden aus dem  $(r^{-3})^{-1/3}$ -Durchschnitt berechnet.

Proton 1	Proton 2	berechnete	berechnete	gemessener	
		Ober- grenze <sup>a)</sup> [Å]	Unter- grenze <sup>a)</sup> [Å]	Abstand [Å]	Abweichung [Å]
H <sup>1</sup> -c $\beta$ AA	H <sup>4</sup> -c $\beta$ AA	4.51	3.69	4.05	0.00
H <sup>1</sup> -c $\beta$ AA	H <sup>N</sup> -c $\beta$ AA	3.73	3.09	3.91	0.18
H <sup>1</sup> -c $\beta$ AA	H <sup>N</sup> -Tyr	2.34	1.92	2.28	0.00
H <sup>1</sup> -c $\beta$ AA	H <sup>6proS</sup> -c $\beta$ AA	2.75	2.25	2.50	0.00
H <sup>1</sup> -c $\beta$ AA	H <sup>5</sup> -c $\beta$ AA	2.53	2.07	2.62	0.09
H <sup>1</sup> -c $\beta$ AA	H <sup>2</sup> -c $\beta$ AA	2.42	2.02	2.33	0.00
H <sup>2</sup> -c $\beta$ AA	H <sup>6proR</sup> -c $\beta$ AA	3.84	3.14	3.89	0.05
H <sup>2</sup> -c $\beta$ AA	CH <sub>3</sub> <sup><math>\gamma</math></sup> -Thr	5.94	4.54	5.27	0.00
H <sup>4</sup> -c $\beta$ AA	H <sup>6proR</sup> -c $\beta$ AA	4.21	3.45	3.93	0.00
H <sup>4</sup> -c $\beta$ AA	H <sup>5</sup> -c $\beta$ AA	2.55	2.13	2.63	0.08
H <sup>5</sup> -c $\beta$ AA	H <sup>6proS</sup> -c $\beta$ AA	2.57	2.10	2.40	0.00
H <sup>N</sup> -c $\beta$ AA	H <sup>6proR</sup> -c $\beta$ AA	2.75	2.25	2.54	0.00
H <sup>N</sup> -c $\beta$ AA	CH <sub>3</sub> <sup>C3</sup> -c $\beta$ AA	4.56	2.87	3.70	0.00
H <sup>N</sup> -c $\beta$ AA	H <sup><math>\alpha</math></sup> -Thr	2.42	1.98	2.16	0.00
H <sup>N</sup> -c $\beta$ AA	H <sup><math>\beta</math></sup> -Thr	4.08	3.34	4.24	0.16
H <sup><math>\alpha</math></sup> -Nle	H <sup>N</sup> -Thr	3.58	2.93	3.52	0.00
H <sup><math>\alpha</math></sup> -Nle	H <sup>N</sup> -Nle	3.71	3.03	2.98	-0.05
H <sup>N</sup> -Nle	H <sup><math>\alpha</math></sup> -Trp	2.33	1.95	2.14	0.00
H <sup>N</sup> -Nle	H <sup>N</sup> -Thr	2.61	2.13	2.73	0.12

H <sup>N</sup> -Nle	H <sup>2</sup> <sub>Arom</sub> -Trp	3.86	3.15	4.25	0.39
H <sup>β</sup> -Thr	H <sup>N</sup> -Thr	3.34	2.74	3.55	0.20
H <sup>β</sup> -Thr	H <sup>α</sup> -Thr	2.94	2.40	2.47	0.00
H <sup>N</sup> -Thr	H <sup>α</sup> -Thr	3.16	2.58	2.93	0.00
H <sup>N</sup> -Thr	CH <sub>3</sub> <sup>γ</sup> -Thr	4.03	2.68	3.52	0.00
H <sup>α</sup> -Thr	CH <sub>3</sub> <sup>γ</sup> -Thr	4.99	2.88	3.52	0.00
CH <sub>3</sub> <sup>C3</sup> -cβAA	CH <sub>3</sub> <sup>γ</sup> -Thr	5.79	4.38	5.05	0.00
H <sup>N</sup> -Tyr	H <sup>βproS</sup> -Tyr	2.78	2.28	2.55	0.00
H <sup>N</sup> -Tyr	H <sup>βproR</sup> -Tyr	3.80	3.15	3.72	0.00
H <sup>N</sup> -Tyr	H <sup>2</sup> -cβAA	2.57	2.10	2.51	0.00
H <sup>α</sup> -Tyr	H <sup>N</sup> -Trp	2.39	1.99	2.20	0.00
H <sup>N</sup> -Trp	H <sup>βproR</sup> -Tyr	3.59	2.73	3.02	0.00
H <sup>N</sup> -Trp	H <sup>α</sup> -Trp	3.10	2.54	2.95	0.00
H <sup>N</sup> -Trp	H <sup>2</sup> <sub>Arom</sub> -Trp	3.90	3.42	4.87	0.97
H <sup>α</sup> -Trp	H <sup>2</sup> <sub>Arom</sub> -Trp	2.97	2.43	2.99	0.02
H <sup>6</sup> <sub>Arom</sub> -Trp	CH <sub>3</sub> <sup>ε</sup> -Nle	5.47	4.23	4.23	0.00

a) Die Berechnung der Ober- bzw. Untergrenze erfolgt durch einen 10%igen Auf- bzw. Abschlag.

## 7.2 Strukturdaten von *cyclo(-Arg-Gly-Asp-cβAA-)* 272

**Table 7.4:** Chemische <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Verschiebung von *cyclo(-RGD-cβAA-)* 272 in H<sub>2</sub>O bei 300K und <sup>3</sup>J<sub>NH-Hα</sub>-Kopplungskonstanten<sup>a)</sup>

	Chemische Verschiebung (ppm)					
	H <sup>N</sup>	H <sup>α</sup>	H <sup>β</sup>	H <sup>γ</sup>	H <sup>δ</sup>	H <sup>Nε</sup>
<b>Arg</b>	8.12 6.7 Hz <sup>a)</sup>	4.16	1.76 1.66	1.55 1.46	3.13	7.11
<b>Gly</b>	8.35 5/8 Hz <sup>a)</sup>	4.23 <sup>proR</sup> 3.27 <sup>proS</sup>				
<b>Asp</b>	7.52 9.5 Hz <sup>a)</sup>	4.54	2.81 2.59			
<b>cβAA</b>	7.86 H <sup>N</sup> 10 Hz <sup>a)</sup>	2.78 H <sup>1</sup>	4.50 H <sup>2</sup>	5.45 H <sup>4</sup>	2.06 H <sup>5</sup>	
		1.17 H <sup>6proR</sup> 1.72 H <sup>6proS</sup>	1.53 CH <sub>3</sub> -C <sup>3</sup>	0.92 CH <sub>3</sub> -C <sup>5</sup>		
		C <sup>α</sup>	C <sup>β</sup>	C <sup>γ</sup>	C <sup>δ</sup>	
<b>Arg</b>		54.1	25.8	24.7	41.1	
<b>Gly</b>		44.6				
<b>Asp</b>		50.9	36.5			
<b>cβAA</b>		44.5 C <sup>1</sup> 28.5 C <sup>6</sup>	48.7 C <sup>2</sup> 20.1 CH <sub>3</sub> -C <sup>3</sup>	132.8 C <sup>4</sup> 21.1 CH <sub>3</sub> -C <sup>5</sup>	30.1 C <sup>5</sup>	

**Tabelle 7.5:** Berechnete Interprotonen-Abstände von cyclo(-RGD-cβAA-) 272 ermittelt aus ROESY-Spektrum (Mischzeit 250 ms) im Vergleich mit gemessenen Abständen der energieminierten Struktur (Abbildung 3.26).

Proton 1	Proton 2	berechnete	berechnete	gemessener
		Obergrenze <sup>a)</sup> [Å]	Untergrenze <sup>a)</sup> [Å]	Abstand [Å]
H <sup>N</sup> -Asp	H <sup>αproR</sup> -Gly	2.72	2.22	2.25
H <sup>N</sup> -Gly	H <sup>α</sup> -Arg	2.49	2.03	2.15
H <sup>N</sup> -Arg	H <sup>1</sup> -cβAA	2.75	2.25	2.31
H <sup>N</sup> -Arg	H <sup>2</sup> -cβAA	2.84	2.32	2.57
H <sup>N</sup> -cβAA	H <sup>α</sup> -Asp	2.49	2.03	2.15
H <sup>N</sup> -cβAA	H <sup>1</sup> -cβAA	4.29	3.51	3.84
H <sup>N</sup> -cβAA	H <sup>6proR</sup> -cβAA	2.90	2.38	2.48
H <sup>1</sup> -cβAA	H <sup>6proS</sup> -cβAA	2.77	2.27	2.50
H <sup>1</sup> -cβAA	H <sup>5</sup> -cβAA	2.68	2.20	2.67
H <sup>N</sup> -Asp <sup>b)</sup>	H <sup>N</sup> -Arg	4.40	3.60	4.96
H <sup>N</sup> -Gly <sup>b)</sup>	H <sup>N</sup> -cβAA	4.60	3.80	4.84

<sup>a)</sup> Die Berechnung der Ober- bzw. Untergrenze erfolgt durch einen 10%igen Auf- bzw. Abschlag. <sup>b)</sup> Die Wechselwirkungen zwischen den gegenüberliegenden Amidprotonen ist im ROESY-Spektrum nur schwach erkennbar.

### 7.3 Strukturdaten von *cyclo(-Arg-Gly-Asp-ATUA-)* 273

**Table 7.6:** Chemische  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Verschiebung von *cyclo(-Arg-Gly-Asp-ATUA-)* 273 in  $\text{H}_2\text{O}$  bei 300 K und Temperaturgradienten der Amidprotonen.

	Chemische Verschiebung (ppm)					
	$\text{H}^{\text{N}}$	$\text{H}^{\alpha}$	$\text{H}^{\beta}$	$\text{H}^{\gamma}$	$\text{H}^{\delta}$	$\text{H}^{\text{N}\epsilon}$
<b>Arg</b>	8.22 9.5 <sup>b)</sup>	4.25	1.78 1.88	1.70	3.24	7.31
<b>Gly</b>	8.50 5.8 <sup>b)</sup>	3.86 4.02				
<b>Asp</b>	8.17 3.3 <sup>b)</sup>	4.63	2.80			
<b>ATUA<sup>a)</sup></b>	7.70 $\text{H}^{\text{N}}$ 5.9 <sup>b)</sup>	3.12 $\text{H}^{11}$ 2.97 $\text{H}^{11'}$ 5.19 $\text{H}^6$	1.65 $\text{H}^{10}$ 2.18 $\text{H}^5$	1.01 $\text{H}^{9\text{proR}}$ 1.27 $\text{H}^{9\text{proS}}$ 1.11 $\text{H}^{4\text{proR}}$ 1.26 $\text{H}^{4\text{proS}}$	2.21 $\text{H}^8$  1.90 $\text{H}^3$	5.16 $\text{H}^7$  2.06 $\text{H}^2$ 2.26 $\text{H}^{2'}$
		0.81 $\text{CH}_3\text{-C}^3$ 0.95 $\text{CH}_3\text{-C}^8$			0.92 $\text{CH}_3\text{-C}^5$ 0.84 $\text{CH}_3\text{-C}^{10}$	
		$\text{C}^{\alpha}$	$\text{C}^{\beta}$	$\text{C}^{\gamma}$	$\text{C}^{\delta}$	
<b>Arg</b>		56.6	30.5	27.3	43.4	
<b>Gly</b>		45.9				
<b>Asp</b>		54.0	39.6	178.5		
<b>ATUA<sup>a)</sup></b>		47.1 $\text{C}^2$ 118.8 $\text{C}^6$ 33.5 $\text{C}^{10}$	31.9 $\text{C}^3$ 118.9 $\text{C}^7$ 49.1 $\text{C}^{11}$	46.5 $\text{C}^4$ 36.8 $\text{C}^8$	36.8 $\text{C}^5$ 43.6 $\text{C}^9$	
		20.4 $\text{CH}_3\text{-C}^3$	24.6 $\text{CH}_3\text{-C}^5$	24.8 $\text{CH}_3\text{-C}^8$	18.4 $\text{CH}_3\text{-C}^{10}$	

<sup>a)</sup> Die Nummerierung der ATUA-Atome erfolgte in Übereinstimmung mit der IUPAC-Nomenklatur. <sup>b)</sup> Die Temperaturgradienten sind angegeben in  $-\Delta\delta/\Delta T$  [ppb/K].

**Tabelle 7.7:** Abstand-restraints und ihre Verletzung während 150 ps MD-Simulation von cyclo(-Arg-Gly-Asp-ATUA-) 273 in H<sub>2</sub>O. Die Abstandsverletzungen wurden aus dem  $(r^{-3})^{-1/3}$ -Durchschnitt berechnet.

Proton 1	Proton 2	berechnete Obergrenze [Å] <sup>a)</sup>	berechnete Untergrenze [Å] <sup>a)</sup>	gemessener Abstand [Å]	Abwei- chung [Å]
H <sup>N</sup> -Arg	H <sup>β</sup> -Arg	2.39	2.96	2.64 <sup>b)</sup>	0.00
H <sup>N</sup> -Arg	H <sup>α</sup> -Arg	2.31	2.93	2.99	0.06
H <sup>N</sup> -Arg	H <sup>2</sup> -ATUA	2.15	2.94	2.48 <sup>b)</sup>	0.00
H <sup>N</sup> -Arg	CH <sub>3</sub> -C <sup>3</sup> -ATUA	4.20	5.40	4.23 <sup>b)</sup>	0.00
H <sup>α</sup> -Arg	H <sup>N</sup> -Gly	2.15	2.63	2.18	0.00
H <sup>N</sup> -Gly	H <sup>N</sup> -Arg	3.87	4.73	4.32	0.00
H <sup>N</sup> -Asp	H <sup>α</sup> -Asp	2.51	3.07	3.03	0.00
H <sup>N</sup> -Asp	H <sup>N</sup> -Gly	3.01	4.52	4.39	0.00
H <sup>β</sup> -Asp	H <sup>N</sup> -Asp	2.81	3.81	2.94 <sup>b)</sup>	0.00
H <sup>N</sup> -ATUA	H <sup>β</sup> -Asp	3.67	4.52	3.99 <sup>b)</sup>	0.00
H <sup>N</sup> -ATUA	H <sup>N</sup> -Asp	2.35	2.97	3.30	0.33
H <sup>N</sup> -ATUA	H <sup>α</sup> -Asp	2.34	2.86	2.38	0.00
H <sup>N</sup> -ATUA	H <sup>10</sup> -ATUA	2.39	2.93	2.54	0.00
H <sup>11</sup> -ATUA	CH <sub>3</sub> -C <sup>10</sup> -ATUA	2.35	3.16	2.57 <sup>b)</sup>	0.00
H <sup>10</sup> -ATUA	H <sup>9proS</sup> -ATUA	2.73	3.33	3.07	0.00
H <sup>10</sup> -ATUA	H <sup>9proR</sup> -ATUA	2.31	2.83	2.52	0.00
H <sup>7</sup> -ATUA	H <sup>8</sup> -ATUA	2.61	3.19	3.10	0.00
CH <sub>3</sub> -C <sup>8</sup> -ATUA	H <sup>7</sup> -ATUA	2.39	3.63	2.94 <sup>b)</sup>	0.00
H <sup>3</sup> -ATUA	H <sup>4proR</sup> -ATUA	2.24	2.74	2.55	0.00
H <sup>3</sup> -ATUA	H <sup>4proS</sup> -ATUA	2.76	3.30	3.07	0.00
H <sup>6</sup> -ATUA	H <sup>5</sup> -ATUA	2.61	3.19	3.11	0.00
CH <sub>3</sub> -C <sup>3</sup> -ATUA	H <sup>5</sup> -ATUA	2.69	3.29	2.93 <sup>b)</sup>	0.00
H <sup>5</sup> -ATUA	H <sup>3</sup> -ATUA	3.06	3.70	3.15	0.00
H <sup>6</sup> -ATUA	CH <sub>3</sub> -C <sup>5</sup> -ATUA	2.39	3.63	2.92 <sup>b)</sup>	0.00
H <sup>6</sup> -ATUA	H <sup>5</sup> -ATUA	2.16	2.55	2.43	0.00
H <sup>5</sup> -ATUA	H <sup>6</sup> -ATUA	2.16	2.55	2.45	0.00
H <sup>6</sup> -ATUA	H <sup>4proS</sup> -ATUA	3.60	4.49	3.81	0.00
CH <sub>3</sub> -C <sup>3</sup> -ATUA	H <sup>2</sup> -ATUA	2.48	3.73	2.56 <sup>b)</sup>	0.00

<sup>a)</sup> Die Berechnung der Ober- bzw. Untergrenze erfolgt durch einen 10%igen Auf- bzw. Abschlag. <sup>b)</sup> Keine stereospezifische Zuordnung. Für den *restraint* wurde das Kohlenstoffatom verwendet, an das entsprechende Proton gebunden ist.