

Institut für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

**Multivalente zyklische RGD-Peptide
und RGD-Mimetika für den Einsatz
in Tumordiagnostik und Tumorthherapie**

Georgette Thumshirn

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 22.10.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 19.11.2003 angenommen.

Meiner Familie

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

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Horst Kessler, danke ich sehr herzlich für das große Interesse an dieser Arbeit und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Neben der Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen waren es vor allem die außergewöhnliche wissenschaftliche Freiheit, seine Unterstützung in allen Belangen sowie die Schaffung eines hervorragenden Arbeitsklimas, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Mein herzlicher Dank gilt weiterhin:

- Herrn Dr. Gábor Sulyok für die Einführung in das Gebiet der RGD-Mimetika und die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen,
- meinen Laborkollegen Bobby Arndt, Timo Weide und Dr. Martin Kantlehner für gegenseitige Hilfe, Aufmunterung und sehr viel Spaß, wodurch das ausgezeichnete Laborklima entstand,
- den Herren Drs. Dirk Gottschling, Martin Sukopp, Uli Hersel sowie Armin Modlinger, Axel Meyer und Frau Dr. Claudia Dahmen für den regen wissenschaftlichen Austausch und die stete Diskussionsbereitschaft,
- Frau Mona Wolff und meinen Praktikanten Stefanie Gasteyer, Draganco Veljanovski und Janez Barbaric für die tatkräftige Unterstützung bei dieser Arbeit,
- den Herren Drs. Matthias Wiesner, Simon L. Goodman und Dirk Finsinger für das Interesse an meiner Arbeit auf dem Gebiet der RGD-Mimetika, sowie allen Mitarbeitern der Merck KGaA für die Durchführung der biologischen Testungen,
- den Herren Thorsten Poethko, Dr. Roland Haubner und Dr. Hans-Jürgen Wester der Arbeitsgruppe Radiochemie/Radiopharmakologie der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München für die hervorragende Zusammenarbeit in dem Projekt „Radionuklidtherapie“ der DFG-Forschergruppe und insbesondere Herrn Dr. Hans-Jürgen Wester für die engagierte Durchsicht des Manuskriptes,

- Herrn Prof. Dr. Bernd Clement für die hervorragende Diskussion und die biologischen Untersuchungen auf dem Gebiet der Hydroxyguanidin-Mimetika,
- der Klinischen Forschergruppe an der Frauenklinik der Technischen Universität München mit den Damen Dr. Ute Reuning und Daniela Lössner sowie Dr. Eva-Kathrin Sinner am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, für die erfolgreiche Zusammenarbeit in dem SFB-Projekt 456 „Zielstrukturen für selektive Tumorinterventionen“,
- den Herren Alex Frenzel und Dr. Rainer Haeßner für die Hilfe bei allen Hardware- und Softwarefragen,
- Frau Maria Kranawetter für die gute Zusammenarbeit im HPLC-Bereich, sowie die Durchführung zahlreicher HPLC-Trennungen,
- den Herren Burghard Cordes und Helmut Krause für die reibungslose und prompte Aufnahme der ESI-MS bzw. CI-MS und MALDI-MS,
- Frau Dr. Claudia Dahmen sowie den Herren Armin Modlinger und Dr. Martin Sukopp für die kritische Durchsicht des Manuskriptes,
- allen (auch bisher nicht namentlich genannten Mitarbeiter) und insbesondere den Herren Drs. Martin Sukopp und Gábor Sulyok für das hervorragende Arbeitsklima, sowie für die lustigen und entspannenden Spieleabende, Kino- und Museumsbesuche, Squashmatche und Feiern,
- Herrn Stephan Dellinger und allen anderen Beteiligten für viele wunderschöne Bergtouren, wobei ich sehr viel neue Energie gewinnen konnte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter und meinen Geschwistern, ohne deren Unterstützung mein Studium und die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wären. Vor allem danke ich Herrn Dr. Elmar Wefers für das entgegengebrachte Verständnis, die Unterstützung ganz besonders in den arbeitsintensiven Phasen und den Fokus auf andere wichtige Dinge im Leben.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Biologischer Hintergrund	3
2.1	Struktur der Integrine und ihre natürlichen Liganden	4
2.2	Vorkommen und Funktion der αv -Integrine	8
2.3	Rolle des $\alpha v \beta 3$ -Integrins in der tumorinduzierten Angiogenese, der Tumormetastasierung und im Knochenstoffwechsel	9
2.4	Peptidische und nicht-peptidische Integrinliganden	12
3	Grundlagen der Medizinischen Chemie	17
3.1	ADME-Parameter	17
3.2	Das Prodrug-Konzept	20
4	Tumor Imaging	23
4.1	Positronenemissionstomographie (PET)	24
4.2	Methoden der Radiomarkierung	25
4.3	$\alpha v \beta 3$ als Target für das Angiogenese-Imaging	27
5	Multivalente RGD-Peptide für die Tumordiagnostik	32
5.1	Theorie der multivalenten Wechselwirkungen	32
5.2	Grundlagen der Peptidsynthese	35
5.3	Allgemeine Synthesestrategie	38
5.4	Konzeption und Synthese der Bausteine	40
5.4.1	Zyklopeptide	40
5.4.2	Verzweigungseinheit	41
5.4.3	Spacer	43
5.5	Synthese von multimeren RGD-Peptiden	46
5.6	Biologische Evaluation	53
6	RGD-Mimetika für die Tumordiagnostik	63
6.1	Allgemeine Synthesestrategie	63
6.2	Synthese eines Iod-RGD-Mimetikums	66
6.3	Synthese von RGD-Mimetika für PET	67
6.3.1	Synthese eines Amino-RGD-Mimetikums	67
6.3.2	Synthese eines Aminooxy-RGD-Mimetikums	70
6.4	Biologische Evaluation der RGD-Mimetika für PET	74

7	RGD-Mimetika für die Tumorthherapie	79
7.1	Allgemeine Synthesestrategie	79
7.2	Variation des Basenbausteins.....	82
7.2.1	Basenbaustein Aminodihydroimidazol	84
7.2.2	Basenbaustein Aminotetrahydropyrimidin	85
7.2.3	Basenbaustein Benzamidin	86
7.2.4	Basenbaustein Aminodihydropyrrol	88
7.2.5	Basenbaustein Aminotetrahydropyridin	89
7.2.6	Basenbausteine Aminochlorpyridazin und Aminopyridazin	90
7.2.7	Basenbaustein Aminochinazolin.....	91
7.2.8	Affinitäts-Studien an isolierten Integrinrezeptoren.....	92
7.2.9	Untersuchungen zur Pharmakokinetik	95
7.3	Erhöhung der Rigidität des Backbones	97
7.3.1	Substitution einer Amid- durch eine Sulfonamidbindung	97
7.3.2	Modifikation des C-Terminus	99
7.4	Ein Hydroxyguanidin-Mimetikum als Prodrug	103
8	Zusammenfassung und Ausblick	107
9	Experimenteller Teil.....	110
9.1	Material und Methoden	110
9.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	113
9.3	Synthese von RGD-Peptiden für die Tumordiagnose.....	123
9.3.1	Synthese der Bausteine	123
9.3.2	Synthese von multimeren RGD-Peptiden	127
9.3.3	Konjugation der multimeren RGD-Peptide zu Oximen.....	132
9.4	Synthese von RGD-Mimetika für die Tumordiagnostik.....	136
9.4.1	Synthese der Bausteine	136
9.4.2	RGD-Mimetika	145
9.5	Synthese von RGD-Mimetika für die Tumorthherapie	149
9.5.1	Synthese der Bausteine	149
9.5.2	RGD-Mimetika	163
9.5.3	Synthese eines Prodrugs und seiner Referenzverbindung	186
9.6	Synthese von RGD-Verbindungen für SPFS	188
10	Anhang	194
11	Literatur	201

ABKÜRZUNGEN

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
abs.	absolut
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination
ADO	8-Amino-3,6-dioxooctansäure
Ahx	Aminohexansäure
Äq.	Äquivalent(e)
Ar	Aromat
AS	Aminosäure
AUC	<i>area under curve</i>
Bel.	Belegung
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
Bmi	Benzamidin
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-
BOP	Benzotriazol-1-yloxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat
br.	breit
BV	orale Bioverfügbarkeit
Bz	Benzyl
<i>c</i>	zyklo, <i>cyclo</i>
Ch	Chinazolin
CL	<i>Clearance</i>
Col	Kollagen
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Doppeldublett
Dhim	Aminodihydroimidazol
Dhpyr	Aminodihydropyrrol
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethyl-4-aminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DPPA	Diphenylphosphorylazid

DQF-COSY	<i>double quantum filtered correlated spectroscopy</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
EDCI	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -[3-(dimethylamino)-propyl]-carbodiimid
Ep	Epiligrin
ESI-MS	<i>electrospray ionization mass spectrometry</i>
Fb	Fibrinogen
Fbu	Fibulin
Fib	Fibrillin
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
Fn	Fibronektin
GC	Gaschromatographie
ges.	gesättigt
Gua	Guanidin
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
Hegas	20-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaeicosansäure, Heptaethylenglykolaminocarbonsäure
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOObt	3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin
HYNIC	Hydrazinonicotinamid
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IC	<i>inhibitory capacity</i>
iC3b	<i>inactivate complement factor 3b</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
In	Invasin
ivDde	(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)-3-methylbutyl
<i>J</i>	Kopplungskonstante
LC-MS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
Ln	Laminin
Log <i>P</i>	Logarithmus des Verteilungskoeffizienten <i>P</i>
<i>m</i>	meta
<i>m</i>	Multipllett
MAdCAM	<i>mucosal adressing cell adhesion molecule</i>
MALDI-TOF	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation - time of flight</i>
MIDAS	<i>metal ion dependent adhesion site</i>
MMP	Metallomatrixproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie

NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
Opn	Osteopontin
<i>p</i>	para
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronenemissionstomographie
Phe	Phenyl
ppm	<i>parts per million</i>
PS	permanente Schutzgruppe
Py	Aminopyridin
Pya	Pyridazin
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxy-tris-pyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
q	Quartett
qn	Quintett
R _f	Retentionsfaktor
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
R _t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
Smp	Schmelzpunkt
SPECT	<i>single photon emission computer tomography</i>
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
SST(R)	Somatostatin(rezeptor)
t	Triplett
TBTU	<i>O</i> -(1H-Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-tetrafluoroborat
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCP	Tritylchlorid-Polystyrol-Harz
TEA	Triethylamin
Teoc	Trimethylsilyloxycarbonyl
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
Thich	Tetrahydroisochinolinessigsäure
Thpy	Aminotetrahydropyridin
Thpym	Aminotetrahydropyrimidin
TIPS	Triisopropylsilan
TMS-Cl	Trimethylsilyl-Chlorid
Tn	Tenascin
TS	temporäre Schutzgruppe

TsOH	Toluolsulfonsäure
Tsp	Thrombospondin
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule.</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vn	Vitronektin
vWF	von Willebrand Faktor
z	Ladung
Z	Benzyloxycarbonyl
δ	chemische Verschiebung

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

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Die Vielzahl an wissenschaftlichen Veröffentlichungen in den letzten Jahren zeigt, dass nicht-invasive, bildgebende Verfahren (*Imaging*) in der Nuklearmedizin bei Tumordiagnostik und -therapie an Bedeutung gewonnen haben.^[1-3] Bei nicht-invasiven Verfahren ist eine Untersuchung des Patienten ohne chirurgischen Eingriff möglich.

Tumorwachstum und -entwicklung sind von der ausreichenden Versorgung mit Nährstoffen abhängig.^[4] Ohne ausreichende Durchblutung (Vaskularisation) ist die Tumorgroße auf 2 - 3 mm³ begrenzt, da der Bedarf an Sauerstoff und Glucose durch die ungenügende Diffusion in das Gewebe nicht gedeckt werden kann.^[5] Für Wachstum und Metastasierung des Tumors ist ein Netzwerk aus funktionierenden Blutgefäßen essentiell. Deshalb induzieren Tumoren durch die Stimulierung benachbarter Endothelzellen mittels der Freisetzung von Wachstumsfaktoren die Ausbildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden.^[5-7] Dieser Vorgang wird als Angiogenese bezeichnet. Die aktivierten Endothelzellen exprimieren transmembrane Zelladhäsionsmoleküle wie den Integrinrezeptor $\alpha\beta3$, weshalb dieser als Indikator der invasiven Phase von Tumorzellen wie z.B. von Melanomzellen betrachtet wird.^[8-10] Als eines der am häufigsten verwendeten $\alpha\beta3$ -Integrinbindungsmotive dient die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD).^[11] Durch den Einsatz eines radioaktiv markierten RGD-Liganden und der richtigen szintigraphischen Methode kann die $\alpha\beta3$ -Expression bildlich dargestellt werden.^[12] Das molekulare *Target* $\alpha\beta3$ -Integrin kann spezifisch nachgewiesen, eine optimale Dosierung der Chemotherapeutika bzw. der Endoradiotherapeutika bestimmt und der Verlauf der Therapie kontrolliert werden. Der Erfolg des inzwischen routinemäßig eingesetzten Octreoscan[®] gab den Anstoß für die Entwicklung vieler anderer Liganden für Tumorspezifische Rezeptoren, wie z.B. $\alpha\beta3$ -Integrinrezeptoren. Octreoscan[®] ist ein ¹¹¹In-markiertes Peptid (Octreotid) zur nicht-invasiven Diagnostik verschiedener Tumoren, die Somatostatinrezeptoren aufweisen.^[13, 14] Für die Bestimmung der Aufnahme und Verteilung der Radioaktivität stellt PET (Positronenemissionstomographie) bei Weitem die beste Technik dar.^[2] Die kurze Halbwertszeit einiger hierfür geeigneter Radionuklide harmoniert sehr gut mit der schnellen Verteilung (Distribution) und

Ausscheidung zahlreicher Peptide.^[15] Besonders ^{18}F ist aufgrund seiner physikalischen und kernspezifischen Eigenschaften ein exzellentes Radioisotop zur Markierung bioaktiver Peptide. Es ist ein leicht erzeugbarer und 100%iger Positronenstrahler, weshalb es ein großes Potential für den klinischen Einsatz besitzt. Bislang schränkten die zeitintensiven ^{18}F -Markierungsmethoden im Hinblick auf die kurze Halbwertszeit von 110 min und die schlechten Markierungseffizienzen die routinemäßige Anwendung ein.^[15]

Die vorliegende Arbeit untersucht in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Radiochemie/Radiopharmakologie der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München das Design, die Synthese und die Anwendung von peptidischen und nicht-peptidischen $\alpha\beta_3$ -Integrinliganden in der Tumordiagnostik und Tumorthherapie. Um kontrastreiche Aufnahmen von $\alpha\beta_3$ -exprimierenden Tumoren zu ermöglichen, sollen *Tracer* mit hoher Anreicherung im Tumorgewebe auf der Basis von RGD-Peptiden entwickelt werden. Multivalente Liganden versprechen eine verbesserte Anbindung^[16] an das *Target*. Das größere Molekulargewicht der Moleküle bewirkt gleichzeitig eine Veränderung des pharmakokinetischen Profils. Außerdem soll eine ^{18}F -Radiomarkierung der von G. Sulyok entwickelten nicht-peptidischen RGD-Mimetika^[17-19] unter Erhalt von Integrinaffinität und -selektivität ermöglicht werden.

Die Beeinflussung der adhäsiven Vorgänge bei der tumorinduzierten Angiogenese durch peptidische und nicht-peptidische $\alpha\beta_3$ -Liganden ist ein weiterer Ansatzpunkt weltweiter Forschung.^[10, 20-23] Im Hinblick auf die Entwicklung potentieller Tumorwirkstoffe wurde von G. Sulyok eine Bibliothek hochaktiver und selektiver RGD-Mimetika synthetisiert.^[17-19] In Kooperation mit *Merck KGaA* (Darmstadt) wird basierend auf diesen Arbeiten die Auswirkung der Modifikation verschiedener pharmakophorer Gruppen auf Affinität und Selektivität gegenüber α_v -Integrinrezeptoren sowie auf orale Bioverfügbarkeit untersucht. Neben der Variation des Basenbausteins wird das *Backbone* z. B. durch Verbrückung mehrerer Atome versteift. Darüber hinaus wird eine Möglichkeit des *Prodrug*konzeptes näher beleuchtet.

2 BIOLOGISCHER HINTERGRUND

Adhäsive Kontakte von Zellen untereinander sowie zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM) steuern das Zellverhalten und die Zellentwicklung (z.B. Adhäsion, Migration, Maturation und Differenzierung). In mehrzelligen Organismen spielen sie eine entscheidende Rolle beim Erhalt und der Neubildung verschiedenster Gewebsstrukturen und sind unter anderem bei Embryogenese, Hämostase, Wundheilung und Immunantwort von Bedeutung,^[24-27] aber auch bei pathologischen Prozessen wie z.B. tumorinduzierter Angiogenese, Tumormetastasierung, Thrombose, Osteoporose, Retinopathie, Arthritis und akutem Nierenversagen.^[7, 28-44]

Diese Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen werden durch Proteine der Zelloberfläche, sogenannte Zelladhäsionsrezeptoren vermittelt, die in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden können: Cadherine,^[45-47] Immunglobulin-Superfamilie,^[48, 49] Selectine^[50, 51] und Integrine.^[52-55] Dabei bilden die Integrine die größte und vielseitigste Rezeptorfamilie. Neben der Verankerung der Zelle übernehmen sie die Aufgabe der Signaltransduktion in beiden Richtungen durch die Zellwand.^[53, 56-62] Durch Bindung eines Liganden der ECM an ein Integrin wird ein Signal in die Zelle übertragen (*outside-in signaling*), was zu einer Umorientierung des Cytoskeletts führt. Dieser Prozess kann die Veränderung der Zellform, die Migration oder die verankerungsabhängige Proliferation sowie die Gewebeorganisation steuern.^[63, 64] Der umgekehrte Weg der Signaltransduktion vom Zellinneren nach außen wird als *inside-out signaling* bezeichnet, wobei Faktoren in der Zelle die Integrine aus einem passiven, schwach adhäsiven in einen aktiven, adhäsiven Zustand umschalten.^[65]

Die Liganden-stimulierte Ausbildung von Integrin-Clustern bewirkt eine verstärkte Wechselwirkung zwischen Ligand und Zelle und beeinflusst die Signaltransduktion.^[66] Das Clustern der Integrine führt zu einer Steigerung von Ligandenbindungsstärke und –geschwindigkeit,^[67, 68] induziert die Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen^[69] und bewirkt eine Übertragung von Signalen, die von der monovalenten Ligandenbindung verschieden sind^[70].

Im Rahmen dieser Arbeit dient das Integrin $\alpha v \beta 3$ als *Target* bei bildgebenden Verfahren und bei der Entwicklung von Tumorthapeutika, weshalb die Klasse der Integrine im Folgenden näher charakterisiert wird.

2.1 Struktur der Integrine und ihre natürlichen Liganden

Integrine sind heterodimere transmembrane Glykoproteine, die in Säugetieren in 24 unterschiedlichen Kombinationen aus je einer der 18 α - und einer der 8 β -Untereinheiten aufgebaut sind (Tab. 2.1).^[8, 53, 64, 71]

Die größten Integrinfamilien sind die beiden β -Familien $\beta 1$ (12 Integrine) und $\beta 2$ (4 Integrine) sowie die αv -Familie mit 5 Integrinen (Kapitel 2.2). Die Untereinheiten sind nicht kovalent miteinander verknüpft (Abb. 2.2a) und müssen zunächst *N*-glycosyliert werden, bevor sie im endoplasmatischen Retikulum $\alpha\beta$ -Heterodimere ausbilden können.^[55] Die größere α -Untereinheit besitzt ca. 1100 Aminosäuren und besteht aus zwei meist unterschiedlich langen Aminosäureketten, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die *N*-terminalen Regionen aller α -Untereinheiten enthalten sieben hintereinander angeordnete, sich wiederholende Abschnitte, die in Form eines siebenblättrigen β -Propellers gefaltet sind (Abb. 2.1).^[75] Einige α -Untereinheiten (z.B. $\alpha 1$, $\alpha 2$, αM , αL , nicht jedoch αv) enthalten zwischen dem zweiten und dritten Propellerblatt eine zusätzliche I-Domäne (*inserted domain*, ca. 200 Aminosäuren).^[76] Oberhalb der β -Faltblätter, in der I-Domäne, befindet sich eine Bindungsstelle für divalente Kationen (z.B. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}), die als MIDAS (*metal ion dependent adhesion site*) bezeichnet werden. Das Kation ist von fünf Aminosäureresten des Integrins umgeben, während an die sechste, freie Koordinationsstelle möglicherweise ein Carbonsäurerest (z.B. Asparaginsäurerest) des Liganden koordinieren kann.^[77]

Die β -Untereinheit besteht mit Ausnahme von $\beta 4$ (ca. 1750 Aminosäuren)^[78] 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. Integrine ohne I-Domäne in der α -Untereinheit, wie z.B. die αv -Integrine, besitzen eine putative I-Domäne in der β -Untereinheit. Auch in dieser β -Untereinheit wurde eine ca. 200 Aminosäuren lange

Tab. 2.1: Darstellung der bekannten Kombinationen aus α - und β -Untereinheit und ihre natürlichen Liganden.^[8, 55, 72, 73] Grau hinterlegte Felder kennzeichnen Integrine mit RGD-abhängiger Ligand-Bindung.^[11, 74]

	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\beta 5$	$\beta 6$	$\beta 7$	$\beta 8$
$\alpha 1$	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, VCAM-1							
$\alpha 10$	Col							
$\alpha 11$	Col							
αE							E-Cadherin	
αL		ICAM-1, ICAM-2						
αM		iC3b, Fb, Faktor X, ICAM-1, ICAM-2						
αX		iC3b, Fb						
αD		ICAM-3, VCAM-1						
αIIb			Fb, Fn, Vn, vWF, Tsp					
αv	Vn, Fn, Opn		Vn, Ln, Fn, vWF, Tsp Tn, Opn, Fib, Fbu		Vn, Fn, Opn, Fb, vWF	Fn, Fb, Tn		Vn

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

hochkonservierte Region mit einem MIDAS-ähnlichen Bindungsmotiv gefunden.^[76, 77, 79, 80] Der C-Terminus der β -Untereinheit^[26, 52] verbindet über intrazelluläre Proteine wie Talin,^[81] Vinculin^[82, 83] und α -Actinin^[84] 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.

Beide Untereinheiten besitzen eine kurze membranständige Region aus 20 bis 30 Aminosäuren, welche für die Heterodimerenbildung nicht notwendig ist, und eine cytoplasmatische Domäne aus 20 bis 50 Aminosäuren, die für die korrekte Ausbildung der Heterodimeren-Struktur essentiell ist.^[85-87]

Bei der Wechselwirkung der Integrine mit Liganden sind beide Untereinheiten beteiligt, wobei sich die Bindungsstellen nahe der N-Termini befinden.^[25, 52, 53, 88] Viele der Integrine besitzen keine(n) spezifischen Liganden und können an Proteine der ECM (z.B. Osteopontin), Zelloberflächenrezeptoren anderer Zellen oder Plasma-proteine (z.B. Fibrinogen) binden. Die Erkennungssequenzen in den einzelnen Integrinliganden sind sehr verschieden, beinhalten jedoch immer eine saure Aminosäure-Seitenkette. Ein einzelner Integrinligand kann verschiedene Erkennungssequenzen besitzen, die mit unterschiedlichen Integrinen interagieren. Fibrinogen beispielsweise wechselwirkt mit α X β 2-Integrinen über GPRP, wohingegen die Interaktion mit α IIb β 3-Integrinen über die Sequenz RGD erfolgt.^[89] Andere Liganden binden über dieselbe Sequenz, aber mit unterschiedlicher Affinität, an verschiedene Integrine, wie z.B. Vitronectin über die RGD-Sequenz an α v β 1, α v β 3, α v β 5 und α IIb β 3. Die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD) wurde früher als ‚universelles‘ Zellerkennungsmotiv bezeichnet, da sie in etwa der Hälfte der Matrixproteine vorkommt (grau hinterlegte Felder in Tab. 2.2).^[25, 74, 90, 91] In umfassenden Untersuchungen u.a. mit konformationell eingeschränkten zyklischen Peptiden konnte gezeigt werden (Kapitel 2.4), dass gerade flankierende Aminosäuren der Erkennungssequenz und deren Konformation für die Integrin-Ligand-Wechselwirkung, die Ligandenaffinität und -selektivität von Bedeutung sind.^[92-97] So weist z.B. das Peptid GRGDS keine Selektivität in Bezug auf die Integrine α 5 β 1, α IIb β 3 und α v β 3 auf, während die verlängerte Sequenz GRGDSP eine erhöhte Affinität für das α 5 β 1-Integrin besitzt.^[98]

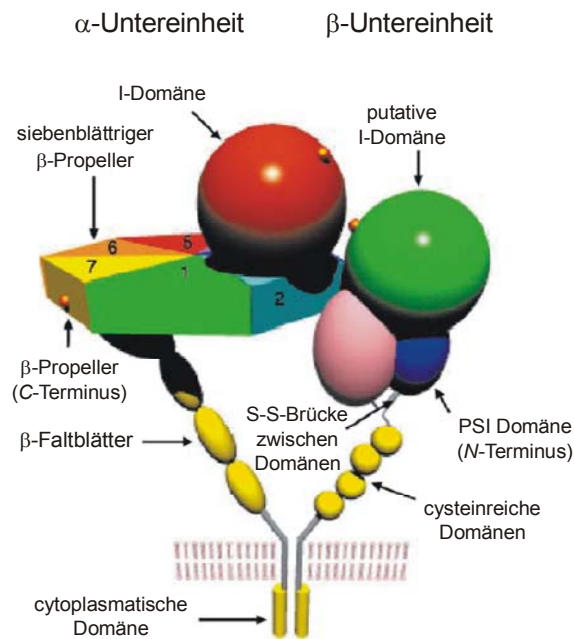


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Integrine.^[76] Die α -Untereinheit enthält einen siebenblättrigen β -Propeller und in einigen Integrinen eine zusätzliche I-Domäne, die ähnlich in der β -Untereinheit gefunden wurde.^[99]

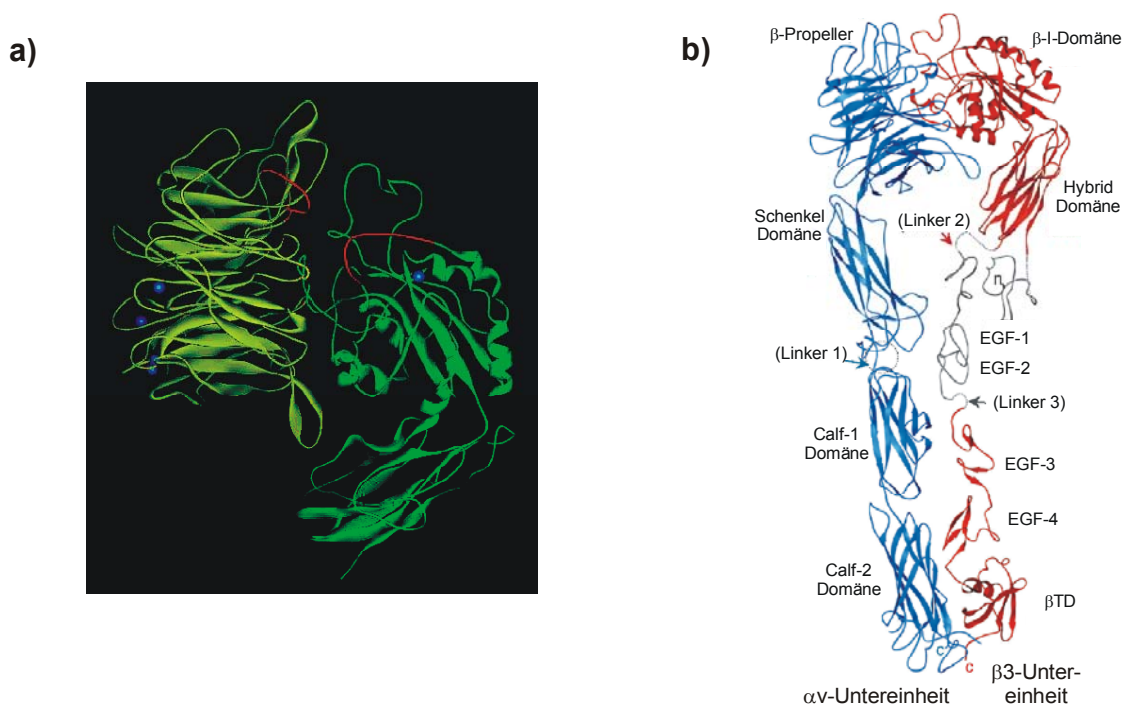


Abb. 2.2: a) Grenzflächenregion zwischen αv - und $\beta 3$ -Kopfgruppe, rot dargestellt ist die vermutete Bindungsregion.^[80] b) Korrigierte Röntgenstruktur des extrazellulären Teils von $\alpha v\beta 3$ mit 4 Domänen der α -Untereinheit und 8 Domänen der β -Untereinheit.^[99]

2.2 Vorkommen und Funktion der α v-Integrine

Die einzelnen Zelltypen exprimieren in Abhängigkeit mehrerer Faktoren, wie z.B. Anwesenheit von Wachstumsfaktoren, Maturationsstatus oder Ligandendichte, die verschiedenen Integrine in unterschiedlichem Maße.^[100] Hierbei sind einige Integrine zelltypisch.

Die α v-Untereinheit wird von nahezu allen Zelltypen exprimiert und kann mit fünf verschiedenen β -Untereinheiten zu den Integrinen α v β 1, α v β 3, α v β 5, α v β 6 und α v β 8 dimerisieren. Alle α v-Integrine zeigen ein RGD-abhängiges Ligandenbindungsverhalten und konnten auf verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden.^[8] Der Integrinrezeptor α v β 1 ist auf einer Vielzahl von Zellen zu finden,^[101] während α v β 8 überwiegend von neuronalem Gewebe exprimiert wird.^[102] Das α v β 6-Integrin ist hauptsächlich auf Epithelzellen lokalisiert und spielt eine Rolle bei der Regulation der Epithelproliferation und der Wundheilung.^[103, 104] Die Integrine α v β 3 und α v β 5 werden auf einer großen Zahl von (vor allem neoangiogenetischen) Zelltypen exprimiert: Endothelzellen, Epithelzellen, glatten Muskelzellen, Leukozyten und Osteoblasten (α v β 3 eher weniger^[10]).^[8] Das historisch als Vitronectin-Rezeptor bezeichnete α v β 3-Integrin befindet sich auf Osteoclasten, auf fast allen Zelltypen mesenchymalen Ursprungs und in geringem Maße auf Blutplättchen.^[8, 105] Dieser Rezeptor ist einer der bestuntersuchten Oberflächenrezeptoren, da er in vielen physiologischen und pathologischen Migrations- und Adhäsionsprozessen wie beispielsweise bei der Knochenresorption (Kapitel 2.3),^[106, 107] der Phagozytose apoptotischer Zellen,^[108] dem akuten Nierenversagen,^[109] der Arthritis^[110] und Fehlfunktionen des Gefäßsystems (z.B. Gefäßverschluss, vermutlich auch Schlaganfall)^[111, 112] eine wichtige Rolle spielt. Darüber hinaus ist α v β 3 an der tumorinduzierten Angiogenese^[4, 113, 114] und verschiedenen Prozessen während der Tumormetastasierung^[28, 60, 115] beteiligt.

2.3 Rolle des $\alpha\beta 3$ -Integrins in der tumorinduzierten Angiogenese, der Tumormetastasierung und im Knochenstoffwechsel

Das $\alpha\beta 3$ -Integrin ist weniger auf normalen Gewebszellen zu finden als vielmehr auf Tumorzellen^[116-120] wie z.B. Melanomzellen, Gehirntumoren im fortgeschrittenen Stadium und Ovarialkarzinomen, weshalb es auch als Indikator der invasiven Phase von Tumorzellen betrachtet wird.^[9, 10] Dieses Integrin steuert das Überleben,^[121] die Proliferation^[9] und die Metastasierung^[122, 123] von Melanomzellen.

Die Ausbildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) spielt nicht nur bei der Entwicklung von Organen, bei der Wundheilung und bei Entzündungen, sondern auch bei der Tumorbildung eine Schlüsselrolle. Für die aggressive Proliferation von Tumorzellen ist eine ausreichende Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff erforderlich.^[4] Tumoren sind in der Lage die Angiogenese selbst zu stimulieren, wobei man von tumorinduzierter Angiogenese spricht (Abb. 2.3).^[4, 6, 7] Durch das Ausschütten von Wachstumsfaktoren, wie z.B. bFGF (*basic fibroblast growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und TNF- α (*tumor necrosis factor*) werden die Endothelzellen der Gefäße zum Wachstum in Richtung Tumor stimuliert.^[124] Es werden jedoch keine neuen Blutgefäße gebildet, wenn das für die zielgerichtete Wanderung und Anheftung an das umgebende Gewebe verantwortliche^[125, 126] überexprimierte $\alpha\beta 3$ -Integrin blockiert wird.^[92, 95]

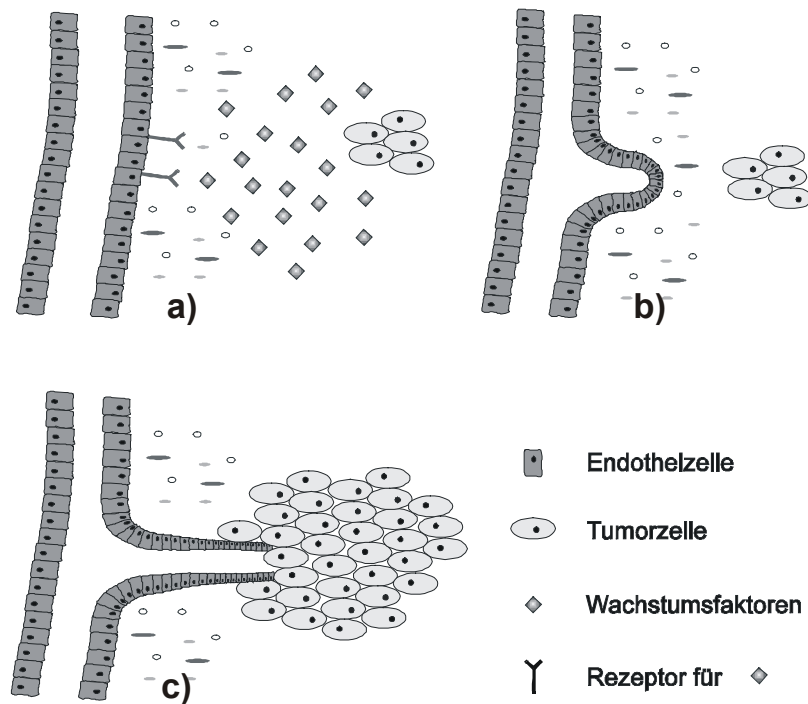


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der tumorinduzierten Angiogenese: **a)** Die Tumorzelle stimuliert benachbarte Endothelzellen durch Freisetzen von Wachstumsfaktoren zur Proliferation. **b)** Diese setzen proteolytische Enzyme frei und exprimieren verstärkt die Integrine $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$. Dadurch wird eine zielgerichtete Invasion der ECM in Richtung der Tumorzellen unter Ausbildung neuer Blutgefäße ermöglicht. **c)** Die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff ist für das Tumorwachstum essentiell.

Die neu gebildeten Blutgefäße dienen außerdem der Ausbreitung der Tumorzellen zur Bildung von Sekundärtumoren (Tumormetastasierung). Die Ausbildung von Metastasen (Abb. 2.4) ist ein sehr komplexer Prozess, in den auch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen involviert sind. Nach Auflösung adhäsiver Zell-Zell-Interaktionen im Primärtumor findet die Invasion abgelöster Tumorzellen in umliegendes Gewebe statt. Die Tumorzellen können sich anschließend über die Blutgefäße oder das lymphatische System im ganzen Körper ausbreiten. Sie adhären schließlich in den Venen oder dem Kapillarsystem des Zielorgans, durchdringen die Endothelschicht und die enzymatisch aufgelöste Basalmembran und gelangen in das Gewebe (Extravasation). Für diese Prozesse ist wiederum die Expression bestimmter adhäsiver Rezeptoren essentiell, die an der Migration durch das Gewebe beteiligt sind.

In Untersuchungen mit Melanomzellen konnte eine direkte Abhängigkeit des Metastasepotentials von der Expression des $\alpha\beta 3$ -Integrins beobachtet werden.^[9]

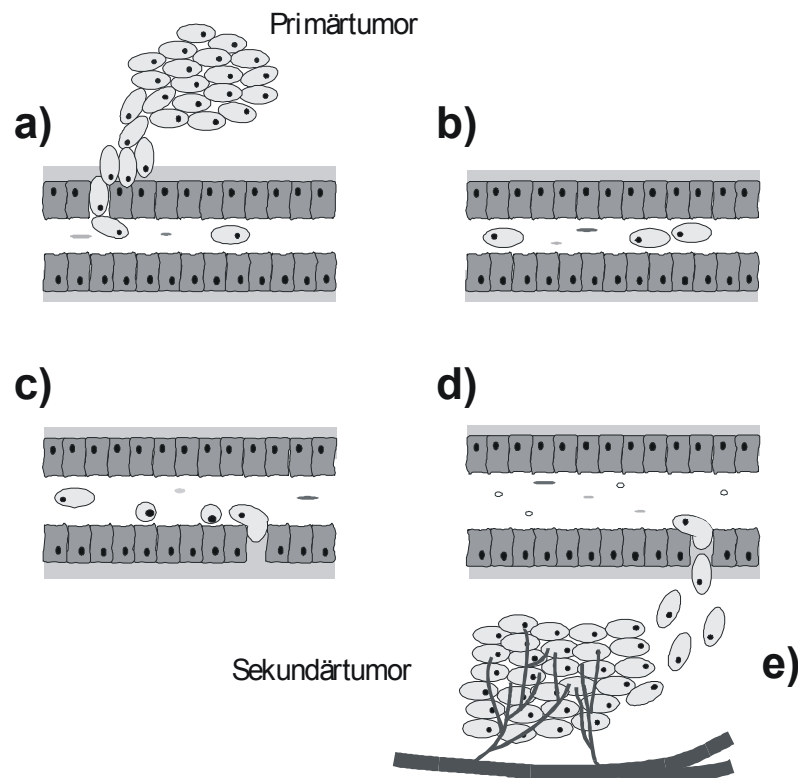


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Tumormetastasierung: **a)** Ablösen der Krebszellen vom Primärtumor und deren Invasion in ein Gefäß; **b)** Wanderung der Tumorzellen im Blut- oder Lymphsystem; **c)** Adhäsion im Kapillarsystem; **d)** Extravasation; **e)** Festsetzen der Tumorzellen in fremdem Gewebe und tumorinduzierte Angiogenese.

Das $\alpha\beta 3$ -Integrin und seine Liganden sind auch an verschiedenen Prozessen des Knochenstoffwechsels beteiligt. Das Knochenskelett unterliegt einem permanenten Umbau durch knochenaufbauende Osteoblasten und knochenabbauende Osteoclasten. Ein Östrogenmangel, der während des Klimakteriums auftritt und neben ernährungsbedingtem Kalziummangel für Osteoporose verantwortlich ist,^[127, 128] stimuliert die Aktivierung von Osteoclasten.^[128, 129] Diese binden vor allem über das $\alpha\beta 3$ -Integrin an extrazelluläre Proteine der Knochenmatrix wie Osteopontin.^[23] Dies führt zur Ausschüttung von Salzsäure und zum Abbau der mineralischen Knochensubstanz. Durch die Osteoclastenadhäsion wird die Proliferation von

Osteoblasten gefördert, die durch den Knochenaufbau der Knochenresorption entgegenwirken. Die Wechselwirkungen von Osteoblasten mit dem Knochengewebe werden neben dem $\alpha v \beta 3$ -Integrinrezeptor auch durch andere Integrine, wie z.B. $\alpha v \beta 5$ vermittelt.^[130] Im Knochenstoffwechsel führt eine reduzierte Osteoblastenadhäsion mit Matrixproteinen, verursacht durch inhibierte Integrine, zu einem erhöhten Apoptosepotential.^[131]

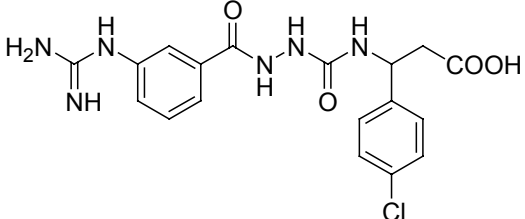
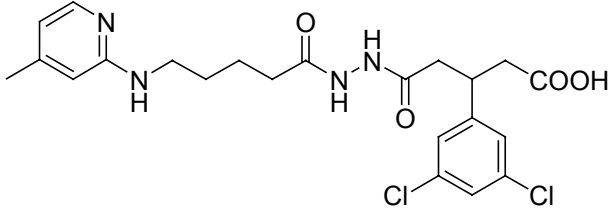
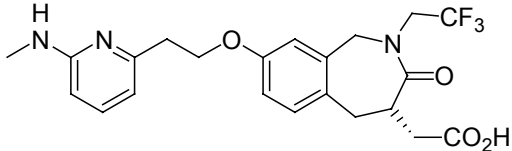
2.4 Peptidische und nicht-peptidische Integrinliganden

Aufgrund der vielfältigen pathophysiologischen Wechselbeziehungen in die das $\alpha v \beta 3$ -Integrin involviert ist, wurden in den letzten Jahren zahlreiche neue lösliche $\alpha v \beta 3$ -Integrinliganden beschrieben. Dieses Kapitel soll einen kurzen Überblick über diese Entwicklung schaffen.

1984 wurde von Pierschbacher und Ruoslahti in Fibronectin die Peptidsequenz RGD als minimales Fragment zur Stimulierung der Zelladhäsion identifiziert und als Integrinbindungsstelle beschrieben.^[132] Ausgehend von dieser natürlichen Bindungssequenz wurde eine Vielzahl peptidischer und nicht-peptidischer Integrinliganden synthetisiert, die sich in Rezeptoraffinität, -selektivität und ADME-Parametern voneinander unterscheiden und den natürlichen Liganden z.T. deutlich überlegen sind.

In unserem Arbeitskreis führte der Einbau von D-Aminosäuren in konformationell eingeschränkte zyklische Peptide zu dem ersten synthetischen, metabolisch stabilen und $\alpha v \beta 3$ -selektiven Liganden *cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)*.^[92, 93, 95, 97] Da Peptide ungünstige pharmakokinetische Eigenschaften besitzen, wurde ab Mitte der 90er Jahre der Schwerpunkt auf die Synthese von peptidähnlichen (peptidomimetischen) bzw. nicht-peptidischen Verbindungen als potentielle, oral verfügbare Tumorthapeutika gelegt. In Tab. 2.2 sind einige ausgewählte Beispiele an Integrinliganden dargestellt.

Tab. 2.2: Übersicht ausgewählter peptidischer und nicht-peptidischer Integrinliganden.

Struktur	IC ₅₀ [nM]			Ref.
	αvβ3	αvβ5	αIIbβ3	
Vitronectin ^a	25	—	> 900	[95]
c(-RGDfV-)	2.5	—	1700	[92]
c(-RGDf(NMe)V-)	3	37	590	[19]
c(-RazaGDfV-)	3	540	3200	[19]
c(-RazaGDf(NMe)V-)	10	40	2800	[19]
	0.1	100	5500	[18]
	64	2500	> 10 ⁴	[18]
	1.2 ^b	0.3 ^b	3800 ^b	[133, 134]

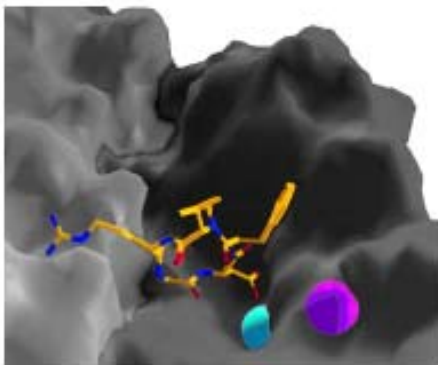
^a Angenommene Masse des Proteins 75 kDa, Testung am löslichen Rezeptor; ^b Bindungskonstante K_i.

Das zyklische Pentapeptid c(-RGDfV-) bildet die Grundlage der in dieser Arbeit verwendeten Liganden. NMR-spektroskopische Untersuchungen ergaben hierfür eine Vorzugskonformation, bei der die Aminosäuren D-Phenylalanin und Valin die Positionen (i+1 und i) einer βII'-Schleife und Glycin die i+1-Position einer γ-Schleife einnehmen.^[135] Die Seitenketten des Arginins und der Asparaginsäure werden dadurch in eine optimale Orientierung für die Wechselwirkung mit dem αvβ3-Integrinrezeptor gedreht. Die basische und die saure Gruppe der Seitenketten wurden als essentielle

Pharmakophore identifiziert. Der zur Carboxylgruppe benachbarte aromatische Rest erhöht die Bindungsaffinität durch π -Wechselwirkung mit dem Rezeptor.^[56, 57, 136]

Anhand der von Xiong *et al.* beschriebenen Kristallstruktur des $\alpha\beta$ 3-Integrins im Komplex mit dem Liganden c -(RGDf[NMe]V-) lässt sich die Bindung der synthetischen Liganden an den $\alpha\beta$ 3-Integrinrezeptor leicht veranschaulichen (Abb. 2.5).^[79] Die Bindungstasche für RGD-Liganden ist relativ flach, weshalb gerade genügend Platz für eine hydrophobe Wechselwirkung der Methylengruppe des Glycins mit der Integrinoberfläche zur Verfügung steht. Analoge RAD-Peptide besitzen deshalb eine wesentlich geringere Affinität gegenüber diesem Integrin. Arginin und Asparaginsäure binden über ionische Wechselwirkungen in etwas tiefere Rezeptortaschen. Die Carboxylgruppe der Asp-Seitenkette koordiniert an das zweiwertige Kation in der MIDAS-Region der β -Untereinheit und an das Amin-Proton des Asn²¹⁵. Die Argininseitenkette bindet an das Asp¹⁵⁰ und das Asp²¹⁸ der α -Untereinheit (*side-on* Koordination).^[79] Das Valin geht keine Interaktion mit dem Rezeptor ein, weshalb es durch verschiedene Aminosäuren ohne Verlust der Integrinaffinität und -selektivität ersetzt werden kann.^[96]

a)



b)

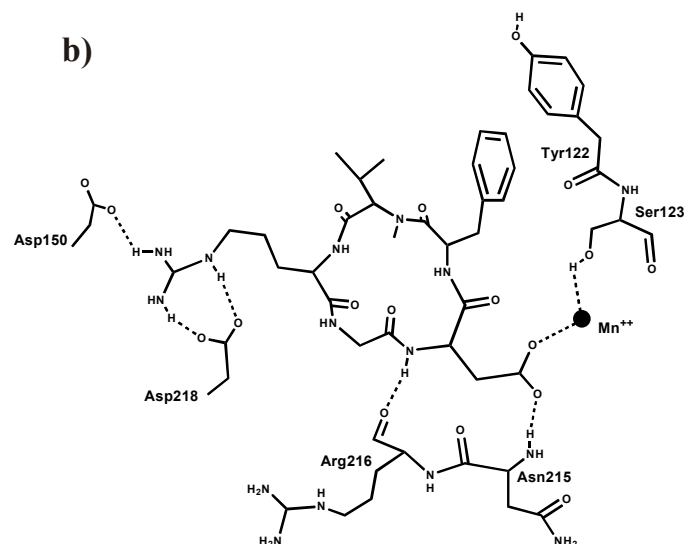


Abb. 2.5: **a)** Kristallstruktur des $\alpha\beta$ 3-Integrins mit dem Liganden c -(RGDf[NMe]V-) und zwei Mn^{2+} -Ionen (MIDAS und ADMIDAS); **b)** Ligand- $\alpha\beta$ 3-Integrin-Komplex; gestrichelte Linien geben die Wasserstoffbrückenbindungen an.^[79]

Prinzipiell gibt es zwei unterschiedliche Wirkungsweisen von synthetischen Integrinliganden mit medizinischer Relevanz (Abb. 2.6). Einerseits können lösliche, niedermolekulare Integrinliganden an Stelle der ECM-Proteine an die Integrinrezeptoren binden. Die Zelle wird daraufhin von der ECM abgelöst und verliert dabei ihre Polarität, wodurch die Zelle rund wird und in die Apoptose übergeht. Hierdurch wird die tumorinduzierte Angiogenese unterdrückt.^[137] Exprimieren die Tumorzellen selbst das $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin, so ist durch kompetitive Bindung die Migration gestört und die Metastasierung über dieses Integrin behindert. Welche Funktionen im Inneren der Zelle genau durch den Liganden ausgelöst werden, wird zur Zeit in der Literatur kontrovers diskutiert (Antagonist vs. Agonist).^[138, 139] Auf dem Gebiet der Osteoporose zeigten verschiedenen Untersuchungen, dass die Funktion der Osteoclasten in Gegenwart löslicher $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrinliganden inhibiert werden konnte.^[36, 140-143]

Andererseits können immobilisierte natürliche und künstliche Integrinliganden die Migration und die Adhäsion von $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ exprimierenden Zellen auf Oberflächen stimulieren.^[98, 144, 145] Es wird ein Ausbreiten der Zelle bewirkt, was ihr eine Polarität verleiht, wodurch die Zelle überlebt und proliferiert. Durch den Integrinliganden erhält die Zelle das gleiche Signal wie durch die natürlichen ECM-Proteine. Besonders in der Implantationsmedizin ist dies von großem Interesse. Die natürlichen Fremdkörperabwehrreaktionen sollen minimiert werden, wodurch ein guter Gewebe-Implantat-Kontakt und ein schnelleres und besseres Einwachsen der Implantate in das Gewebe ermöglicht wird. Erste *in vivo* Untersuchungen wurden diesbezüglich u.a. für Knochenersatzstoffe^[98, 144, 146] und zur Regeneration neuronalen Gewebes^[147] erfolgreich durchgeführt.

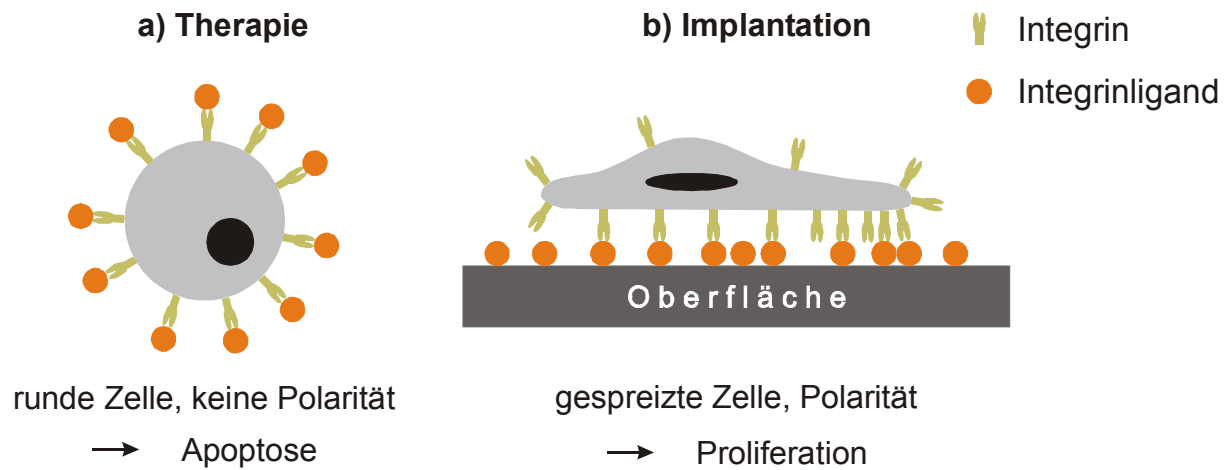


Abb. 2.6: *Unterschiedliche Wirkungsweise von Integrinliganden: a) Lösliche Integrinliganden als Antagonisten, unterbrechen die Wechselwirkung zwischen Zelle und ECM, induzieren Apoptose; b) Immobilisierte Integrinliganden als Agonisten, induzieren Zelladhäsion bis hin zur Zellspreizung.*

3 GRUNDLAGEN DER MEDIZINISCHEN CHEMIE

Die Medizinische Chemie beschäftigt sich mit der Entdeckung und dem Design neuer, therapeutisch anwendbarer, chemischer Verbindungen und deren Entwicklung zu Arzneimitteln.^[148, 149] Die biologische Aktivität eines Wirkstoffes ist von der Pharmakokinetik, welche den Weg des Medikaments von der Eintrittsstelle im Körper zum Wirkort beschreibt, und der Pharmakodynamik, welche die Wirkung auf den Organismus behandelt, abhängig. Aufgrund der Komplexität der Thematik *Medizinische Chemie* werden in den folgenden Kapiteln nur die für diese Arbeit relevanten ADME-Parameter und das *Prodrug*-Konzept kurz erläutert.

3.1 ADME-Parameter

Mit der Etablierung der kombinatorischen Chemie und dem *High-Throughput-Screening* (HTS) glaubte man zunächst neue Medikamente durch einfaches Erhöhen der Zahl an synthetisierten und biologisch evaluierten Verbindungen zu finden. Erste Generationen von erzeugten kombinatorischen Bibliotheken enthielten meist große und lipophile, biologisch inaktive Moleküle.^[107, 150] Aus dieser Erfahrung heraus wird nun bereits bei dem Design von Bibliotheken versucht, Medikamenten-ähnliche Verbindungen (*drug-like molecules*), welche potentiell oral verfügbar sind, zu generieren.^[151] Die Faktoren, die das pharmakologische Profil eines Wirkstoffes ausmachen, werden unter dem Begriff ADME-Parameter zusammengefasst. Sie beschreiben die Aufnahme einer Substanz (**A**bsorption), ihre Verteilung im Körper (**D**istribution), sowie den Abbau insbesondere in der Leber (**M**etabolismus) und die Ausscheidung vor allem über Niere und/oder Darm (**E**liminierung). Häufig werden sie durch **T** - die Toxizität- ergänzt. Um diese Parameter zu beschreiben, werden verschiedenste Methoden vom simplen Abzählen von Wasserstoff-Donatoren bis hin zur Berechnung mittels komplexer neuronaler Netzwerke verwendet.^[152]

Damit ein Wirkstoff seinen Wirkort erreichen kann, muss er sowohl mit einer wässrigen Umgebung (z.B. Cytoplasma) als auch mit einer lipophilen Umgebung (z.B. Membran) wechselwirken können. Viele quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen

zeigen daher einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Lipophilie einer Verbindung und deren biologischer Wirkung. Auch die metabolische Aktivität und die Bindung an Plasmaproteine werden durch die Lipophilie beeinflusst.^[153] Zur Beschreibung der Lipophilie hat sich der von Hansch *et al.* vorgeschlagene Verteilungskoeffizient P (*partition coefficient*) zwischen 1-Octanol und Wasser als geeignet erwiesen.^[109, 154]

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

Verbindungen mit $P > 1$ und somit positivem $\log P$ sind in 1-Octanol besser löslich. Die Beiträge einzelner Teile eines Moleküls zum Verteilungskoeffizienten verhalten sich additiv, wodurch die Berechnung bzw. Abschätzung des $\log P$ -Wertes einer Verbindung ermöglicht wird. Diese Funktion ist in einigen Chemie-Software-Programmen bereits implementiert.^[155]

Lipinski *et al.* von der Firma *Pfizer Inc.* untersuchten 2245 oral bioverfügbare Wirkstoffe auf verschiedene Parameter, die für das Absorptionsverhalten von Bedeutung sind.^[156] Die als ‚*Pfizer’s Rule of Five*‘ bekannt gewordenen Eigenschaften trafen auf ca. 90 % der analysierten Verbindungen zu:

- $\log P < 5$
- Anzahl der Wasserstoff-Donoren < 5
- Anzahl der Wasserstoff-Akzeptoren < 10 (= 2 x 5)
- Molekulargewicht < 500 g/mol (= 100 x 5)
- eine der vier vorgenannten Regeln kann verletzt sein.

Trotz der Verletzung der ‚*Rule of Five*‘ waren jedoch viele Antibiotika, Fungizide, Vitamine und herzwirksame Glykoside oral bioverfügbar. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist, dass diese Moleküle Substrate für biologische Transportsysteme darstellen. Die Regeln sind nicht verbindlich, sondern gelten nur als Orientierungshilfe bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe.^[110, 157] Weitere Eigenschaften, welche die orale

Bioverfügbarkeit beeinflussen sind u.a. Größe der polaren Oberfläche des Moleküls^[106] und Anzahl der flexiblen Bindungen^[158].

Anhand der ‚*Rule of Five*‘ lassen sich jedoch kaum Aussagen über die metabolische Stabilität der Verbindungen ableiten. Normalerweise werden fremde, in den Körper eindringende Moleküle (Xenobiotika) vom Immunsystem durch Antikörperbildung bekämpft. Kleine Fremdmoleküle lösen in der Regel jedoch keine Antikörperreaktion aus, weshalb der Körper zum Schutz vor diesen Umweltgiften einen anderen Mechanismus entwickelt hat. Sie werden durch unspezifische Enzyme in polare Verbindungen umgewandelt und können so anschließend ausgeschieden werden (Metabolismus). Da der Körper nicht zwischen Umweltgift und Medikament unterscheiden kann, werden auch Wirkstoffe durch enzymatische Biotransformationen abgebaut (Wirkstoffmetabolismus). In Abhängigkeit von der Applikationsform gibt es verschiedene Möglichkeiten für die Metabolisierung eines Arzneimittels. Der Weg eines Arzneimittels nach oraler Einnahme, der häufigsten und einfachsten Form der Applikation, ist in Abb. 3.1 dargestellt. Dabei wird der Wirkstoff über die Schleimhaut des Magens oder des Dünndarms aufgenommen (**A**bsorption). Aus dem Magen-Darm-Trakt wird er im Blutstrom zur Leber transportiert, in der er normalerweise zum ersten Mal metabolisiert wird (**M**etabolismus), was man auch als *first pass*-Effekt bezeichnet. Dieser gewinnt vor allem bei lipophilen Wirkstoffen und Substanzen mit einem Molekulargewicht über 500 g/mol an Bedeutung. Über den Blutkreislauf werden das Arzneimittel und seine Metaboliten im Körper verteilt (**D**istribution). Bei der Metabolisierung werden die Substanzen in der Regel in polare Substanzen umgewandelt und über die Niere (renal) ausgeschieden (**E**liminierung).^[148]

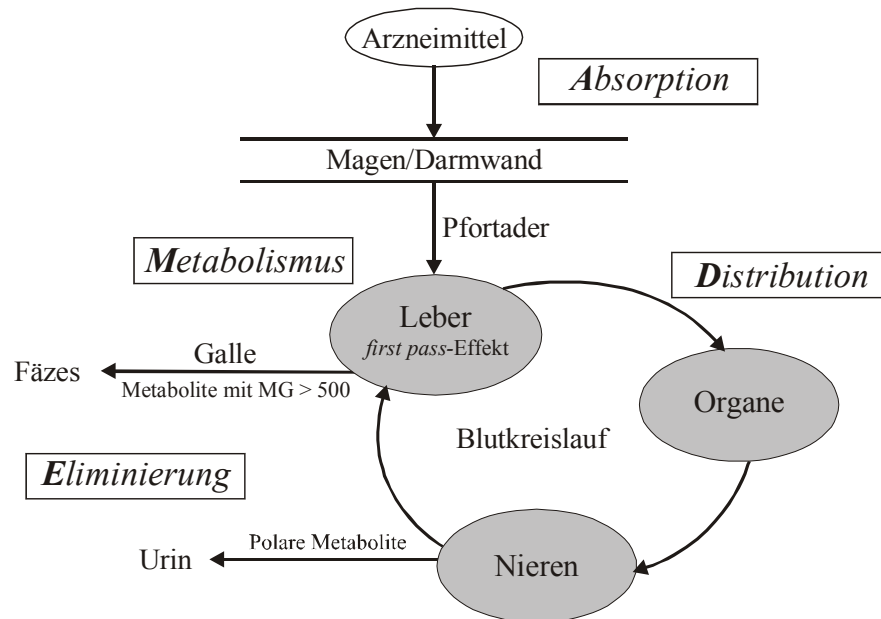


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Metabolisierung eines Arzneimittels nach oraler Gabe.

Diese Aspekte wurden bei dem Design der multimeren RGD-Peptide und der RGD-Mimetika für die PET sowie den Modifikationen der RGD-Mimetika für die Tumorthherapie berücksichtigt.

3.2 Das Prodrug-Konzept

Durch die bei der Metabolisierung stattfindenden Strukturveränderungen wird ein Wirkstoff in der Regel pharmakologisch deaktiviert. Diese Biotransformationen können jedoch auch dazu benutzt werden, um den eigentlichen Wirkstoff aus einer nicht oder nur schwach wirksamen Vorstufe freizusetzen. Hierfür wurde von A. Albert der Begriff *Prodrug* eingeführt.^[159, 160] Es gibt eine Vielzahl an Untersuchungen, die beschreiben, welche funktionellen Gruppen welchen enzymatischen Biotransformationen unterliegen.

Wermut^[161] unterscheidet *Carrier*-gebundene *Prodrugs* von denjenigen, welche auf dem Konzept der Biotransformation beruhen (Vorläufermetabolite). Die Bindung zwischen *Carrier* und *Prodrug* lässt sich enzymatisch spalten, wie z.B. durch Hydrolyse von Carbonsäureestern. Die freigesetzte *Carrier*-Komponente darf über keine biologische Aktivität oder Toxizität verfügen. Vorläufermetaboliten hingegen

besitzen eine vom Wirkstoff chemisch abweichende Struktur, die z.B. durch Oxidation oder Reduktion in ihre aktive Form umgewandelt wird. Es gibt mehrere Gründe, weshalb Carbonsäureester den wichtigsten *Prodrug*-Typ darstellen. Zum einen sind Esterasen überall im Körper vorhanden, weshalb die Freisetzung des Wirkstoffes kein Problem darstellt. Andererseits lassen sich Esterderivate mit verschiedenen hydrophilen oder lipophilen Eigenschaften herstellen, wo durch ein großer Stabilitätsbereich abgedeckt werden kann.

Eine *Prodrug*-Strategie wird aus unterschiedlichen Gründen verfolgt. So lässt sich bei einem lipophilen Wirkstoff durch Einführung einer hydrophilen Gruppe, z.B. eines Zuckers, die Wasserlöslichkeit erhöhen. Andererseits kann ein hydrophiler Wirkstoff zur Verbesserung der Resorption u.a. durch Veresterung in eine weniger polare Form überführt werden, wie z.B. bei dem Lipidsenker Clofibrat. Außerdem kann durch die Anwendung des *Prodrug*-Konzepts die Wirkortspezifität erhöht werden, z.B. wenn ein bestimmtes Enzym ausschließlich am Wirkort vorkommt. Somit erfolgt eine Aktivierung des *Prodrugs* nur am Wirkort. Dies wird bei dem krampfhemmenden Mittel Progabid^[162] ausgenutzt, das auf dem von Bodor *et al.*^[163, 164] entwickelten System zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und anschließender Freisetzung des Wirkstoffs beruht. Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet von *Prodrugs* ist die Verlangsamung der Wirkstoff-Freisetzung (Retardeffekt) im Körper. Dieser Effekt kann durch den Einsatz langkettiger, aliphatischer Ester erreicht werden, die sehr viel langsamer gespalten werden als kurzkettige.

Diese Strategie der Vorläufermetabolite wurde bei der Synthese eines RGD-Mimetikums als *Prodrug* und seiner biologischen Evaluation näher beleuchtet.

Kratz *et al.* beschreiben Hydrazon-verbrückte Doxorubizin-Antikörper-Konjugate, welche im leicht aziden Tumorgewebe gespalten werden.^[165] Dieses makromolekulare Transportsystem für ein Chemotherapeutikum zählt zu den *Carrier*-verknüpften *Prodrugs*. Neben Antikörpern können auch synthetische Polymere, Glycoproteine, Hormone, DNA oder Zellen als *Carrier* fungieren. Der physiologische pH-Wert im extrazellulären Raum beträgt 7.2-7.4, während er im Tumorgewebe 0.5-1.0 Einheiten niedriger liegt.^[108, 166-170] Deshalb wird eine Hydrazon-Verbrückung erst im Tumor gespalten und der Wirkstoff gezielt freigesetzt. Außerdem stellten Kratz *et al.* fest,

dass Oxim-verknüpfte Konjugate bei pH 5 stabil sind. Dies konnte auch bei den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten RGD-Radiomarker-Konjugaten gezeigt werden. Die radioaktiv markierten multimeren RGD-Peptide sollen keine *Prodrugs* darstellen, sondern im Gegensatz dazu metabolisch möglichst stabil sein.

4 TUMOR IMAGING

In den letzten drei Jahrzehnten wurden bei den bildgebenden Verfahren (*Imaging*) große Fortschritte erzielt. Hierdurch wurden neue Perspektiven bei der Identifizierung und Untersuchung der biologischen Natur einer Erkrankung sowie bei Design und Entwicklung von Medikamenten geschaffen.^[2, 171, 172] Bildgebende Verfahren besitzen aufgrund ihres nicht-invasiven Charakters insbesondere bei Tumordiagnostik und -therapie viele Vorteile. Mittels *Imaging* können spezifische molekulare *Targets* vor dem Therapiebeginn nachgewiesen, eine optimale Dosierung der Endoradiotherapeutika bzw. der Chemotherapeutika bestimmt, und der Verlauf der Therapie kontrolliert werden.

Um die erkrankten Bereiche gezielt anzusteuern wurden Antikörper für die Oberflächenstrukturen der Zielzellen entwickelt^[173-176] und mit Radionukliden konjugiert.^[105, 177, 178] Die Nachteile einer Therapie mit Antikörpern liegen neben der Immunogenität, welche eine mehrfache Gabe von Antikörpern einschränkt, in der erschwerten Aufnahme im Tumorgewebe sowie in der sehr langsamen Eliminierung aus dem Körper aufgrund des hohen Molekulargewichtes der Antikörper.^[179] Eine attraktive Alternative stellen zyklische Peptide oder kleinere nicht-peptidische Verbindungen dar.^[179-181] Die Radiomarkierung gestaltet sich bei kleinen Peptiden schwierig, da durch eine zusätzliche prosthetische Gruppe oder einen mehrzähligen Komplexliganden ihre Pharmakokinetik und Bindungseigenschaften gravierend verändert werden können.

In der Literatur werden viele bildgebende Verfahren, wie z.B. MRT (Magnetresonanztomographie), FMT (*fluorescence-mediated molecular tomography*), FRT (Fluoreszenzreflexionstomographie), Doppler-Sonographie und szintigraphische Methoden erfolgreich beschrieben.^[172, 182-187] In dieser Arbeit steht die szintigraphische *Tracer*-Technik PET zum *Imaging* von $\alpha\beta3$ -positivem Tumorgewebe im Vordergrund, weshalb diese im Folgenden näher erläutert wird.

4.1 Positronenemissionstomographie (PET)

PET stellt eine bildgebende Technik in der Nuklearmedizin dar, die eine Visualisierung und Messung physiologischer und biochemischer Prozesse in verschiedenen menschlichen Organen erlaubt.^[1] Sie unterscheidet sich von konventionellen szintigraphischen Techniken wie SPECT (*single photon emission tomography*) durch die Möglichkeit der quantitativen Bestimmung der Verteilung von Radioaktivität in Gewebe.^[15] Außerdem können durch die etwa doppelt so hohe räumliche Auflösung (5-6 mm) zehnmal kleinere Volumen aufgelöst werden.

Ursprünglich war PET nur für die Forschung konzipiert. In den letzten 20 Jahren zeigte sich jedoch, dass sie für die Gewinnung wichtiger diagnostischer Informationen bei der klinischen Beurteilung von individuellen Krankheitsbildern geeignet ist. Während erste Anwendungen sich auf Erkrankungen von Gehirn und Herz beschränkten, gewinnt der Einsatz für den Nachweis und für die Stadieneinteilung zahlreicher maligner Tumoren zunehmend an Bedeutung. In Abhängigkeit des gewählten radioaktiv markierten Wirkstoffes können quantitative Informationen bezüglich Blutfluss, Rezeptorstatus und Verlauf der Metabolisierung gewonnen werden. Die tomographische Abbildung ist innerhalb weniger Minuten möglich, während für die Aufnahme von SPECT-Bildern 30 Minuten oder mehr benötigt werden. Dies wirkt sich besonders auf den Einsatz von kleinen zyklischen Peptiden und Peptidmimetika als *Tracer* aus. Aufgrund ihrer schnellen Biodistribution im Organismus ist in diesem Fall nur PET als bildgebendes Verfahren geeignet.

Ausschlaggebend für den Erfolg von PET in der Onkologie war hauptsächlich die Einführung des Glucoseanalogons ¹⁸F-Fluordeoxyglucose (FDG) zum Nachweis und der Stadieneinteilung maligner Tumoren.^[1] Die Anwendung von FDG-PET erwies sich als besonders erfolgreich bei Kopf-Hals-Tumoren, Bronchialkarzinomen, kolorektalen Karzinomen, malignen Melanomen und Lymphomen. Es wurde außerdem gezeigt, dass FDG-PET bei der Differenzierung von Tumorrezidiven (Tumorrückfällen) und therapiebedingten Veränderungen häufig der konventionellen bildgebenden Diagnostik überlegen ist. Bei der Diagnostik von Hirntumoren bieten

radioaktiv markierte Aminosäuren wie ^{11}C -Methionin aufgrund des hohen Glucosestoffwechsels der normalen grauen Substanz Vorteile gegenüber FDG.

4.2 Methoden der Radiomarkierung

In der Nuklearmedizin stehen grundsätzlich verschiedene Radionuklide zur Verfügung. Die Auswahl des Radionuklids erfolgt in Abhängigkeit der gewünschten Eigenschaften wie Strahlungsart (α , β^+ , β^- , γ , Auger), Strahlungsintensität, Halbwertszeit und Verfügbarkeit. Darüber hinaus müssen für die erfolgreiche Applikation eines radioaktiv markierten Peptids folgende Aspekte berücksichtigt werden:

- Produktion des Positronenemitters durch kleine Beschleuniger,
- die Trennung der Radionuklide von den unbestrahlten *Targets*,
- verfügbare Markierungsmethoden,
- Einfluss der Markierungsmethode und des Radionuklids auf die Ausscheidung der Peptide,
- interzelluläre Speicherung der Radiokataboliten in den Zielorganen,
- schnelle Ausscheidung der Radiokataboliten aus dem Blut und anderen Organen.

Die wichtigsten Radioisotope für eine nicht-invasive Bildgebung sowie eine Auswahl weiterer, z. B. in der Therapie eingesetzter Radionuklide sind in Tab. 4.1 dargestellt.

Zu den γ -Strahlern, die in der SPECT eingesetzt werden, gehören vor allem ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ und ^{111}In . Die $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Markierung und die Markierung mit verschiedenen dreiwertigen radioaktiven Metallkationen (^{68}Ga , ^{90}Y , ^{111}In , ^{177}Lu) wird durch Komplexierung mit mehrzähligen Liganden, wie Hydrazinonicotinamid (HYNIC) bzw. 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-N,N',N'',N'''-tetraessigsäure (DOTA) erreicht, die über einen *Linker* mit der biologisch aktiven Verbindung verknüpft sind. Die radioaktive Markierung mit ^{123}I kann durch elektrophile aromatische Substitution in *ortho*-Position zu einer phenolischen OH-Gruppe mit Hilfe von Chloramin T^[189] oder nach der Iodogen[®]-Methode^[190] eingeführt werden. Da Monoiodtyrosin im

Tab. 4.1: Bei der nicht-invasiven Bildgebung und in therapeutischen Untersuchungen eingesetzte Radioisotope.^[188]

Isotop	t _{1/2}	Strahlung	Energie [keV]	Verwendung	Markierungsmethode
¹¹ C	20.4 min	β ⁺	960	PET	Alkylierung mit ¹¹ CH ₃ I, S _N 2 mit ¹¹ CN ⁻
¹⁸ F	109.8 min	β ⁺	633.5	PET	S _N 2 mit F ⁻ , S _E mit AcO ¹⁸ F, Acylierung mit prosthetischer Gruppe
⁶⁸ Ga	68 min	β ⁺ (89 %)	1899	PET	Komplexierung
⁹⁰ Y	2.7 d	β ⁻	2280	Radiotherapie	Komplexierung
^{99m} Tc	6 h	γ	140	SPECT	Komplexierung
¹¹¹ In	2.8 d	γ, Auger	245	SPECT	Komplexierung
¹²³ I	13.2 h	γ	159	SPECT	S _E Ar
¹²⁴ I	4.2 d	β ⁺ (23 %)	2138	PET	S _E Ar
¹²⁵ I	59.4 d	γ	28	<i>in vitro</i> Tests	S _E Ar
¹³¹ I	8 d	γ, β ⁻	606	Radiotherapie	S _E Ar
¹⁷⁷ Lu	6.6 d	β ⁻	498	Radiotherapie	Komplexierung
¹⁸⁸ Re	17 h	γ, β ⁻	2120	Radiotherapie	Komplexierung

Organismus einer enzymatischen Deiodierung^[191] unterliegt, werden häufig Vorläufermoleküle (*Precursor*) wie aromatische Silyl-^[192] bzw. Stannylderivate^[193, 194] durch *ipso*-Substitution in die radioiodmarkierte Verbindung überführt. Hierbei erzielen Stannylaromaten höhere radiochemische Ausbeuten als Silylaromaten.^[194]

Für PET-Untersuchungen werden hauptsächlich die Positronenstrahler ¹¹C und ¹⁸F, seltener ¹²⁴I eingesetzt. Die Radioisotope ¹¹C und ¹⁸F erlauben die Synthese zahlreicher radioaktiver Wirkstoffe^[195-200] und bieten den Vorteil, dass die Markierung normalerweise keinen Effekt auf die chemischen bzw. physiochemischen Eigenschaften ausübt, wodurch die Biodistribution eines Wirkstoffes unverändert bleibt und verfolgt werden kann.^[171] Das ¹¹C-Isotop hat eine sehr geringe Halbwertszeit (t_{1/2} = 20 min), was eine schnelle Synthese zur Einführung dieses

Isotops erfordert. Dies erfolgt häufig durch Methylierung, z.B. eines Alkohols, Amins oder einer Säure mit [^{11}C]Methyliodid oder durch nukleophile Substitution mit [^{11}C]Cyanid. ^{18}F ist ein ideales PET-Nuklid, da das Isotop ein 100 %iger Positronenstrahler ist und eine Halbwertszeit ($t_{1/2} = 110$ min) hat, welche in vielen Fällen für die Markierung und Detektion ausreichend ist, den Organismus aber nicht zu hoher Strahlenbelastung aussetzt. Fluor kann durch nukleophile Substitution mit $^{18}\text{F}^-$ (insbesondere nach Komplexbildung des Kations, z. B. mit Kryptofix 2.2.2) oder in einer Schiemann-Reaktion mit $[\text{B}^{18}\text{FF}_3]^-$ eingeführt werden.^[201, 202] Außerdem ist eine elektrophile aromatische Substitution z. B. mit ^{18}F -Acetylhypofluorid^[203] (^{18}F]AcOF) möglich. Oft werden auch sogenannte ^{18}F -markierte prosthetische Gruppen, wie 2- ^{18}F]Fluorpropionsäure oder 4- ^{18}F]Fluorbenzoesäure bzw. die entsprechenden, aktivierten Vorstufen (z.B. als 4-Nitrophenylester oder Succinimid-Aktivester) in einer Acylierungsreaktion eingesetzt.^[204-206] ^{124}I ist lediglich zu 23 % ein Positronenstrahler und wird eher in der Forschung und der Dosimetrie verwendet. Die radioaktive Markierung mit dem Iodisotop ^{124}I entspricht der für ^{123}I vorgestellten Methode.

4.3 $\alpha\beta 3$ als Target für das Angiogenese-Imaging

Die Expression des *Targets* $\alpha\beta 3$ spielt eine wichtige Rolle bei der Bestimmung von Wachstumsgeschwindigkeit und Metastasenbildung von malignen Tumoren in experimentellen Tumor-Modellen sowie in Patientenstudien.^[9, 207]

Eines der ersten $\alpha\beta 3$ -selektiven RGD-Peptide $c(-\text{RGDfV-})$ ^[92, 93] diente als Leitstruktur für die *Tracer*-Entwicklung^[3] (Tab. 4.2). Zunächst wurden die iodierten RGD-Peptide [^{125}I]c(-RGDyV-) und [^{125}I]c(-RGDfY-) synthetisiert, welche *in vitro* eine hohe $\alpha\beta 3$ -Affinität und Selektivität sowie *in vivo* eine rezeptorspezifische Tumoranreicherung aufwiesen.^[190] Diese Verbindungen unterlagen jedoch hauptsächlich der Ausscheidung über die Leber, weshalb dort eine hohe Aktivitätsanreicherung auftrat. Zur Verbesserung der Pharmakokinetik wurden Zuckeramino-säure-Konjugate entwickelt.^[12, 205] Die daraus resultierenden Glycopeptide [^{125}I]Gluc-RGD und [^{18}F]Galacto-RGD besaßen eine deutlich reduzierte Aktivitätskonzentration in der Leber und eine erhöhte Aktivitätsanreicherung im Tumor

verglichen mit *Tracern* der ersten Generation. PET-Aufnahmen zeigten, dass [^{18}F]Galacto-RGD eine nicht-invasive Bestimmung der $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrinexpression in Rezeptor-positiven Tumoren erlaubt.^[205] Darüber hinaus zeigen neueste Untersuchungen erste positive Resultate am Menschen.^[208]

In einem anderen Ansatz zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften wurde das zyklische RGD-Peptid mit Tripeptiden aus hydrophilen D-Aminosäuren wie Asp bzw. Ser konjugiert.^[209, 210] Insbesondere [^{18}F]Asp₃-RGD präsentierte eine vergleichbare Pharmakokinetik und Tumoraufnahme wie [^{18}F]Galacto-RGD und stellt somit eine Alternative in der Bildgebung der $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrinexpression dar. Aufgrund der großen Vielfalt an unterschiedlichen Aminosäuren ist hierbei eine Feinabstimmung auf das gewünschte pharmakokinetische Verhalten möglich. Die von Ogawa *et al.* beschriebene direkte elektrophile ^{18}F -Markierung von D-Phe in *c*(-RGDf[NMe]V-) mittels [^{18}F]AcOF erzeugt verschiedene mono- und difluorierte Isomere,^[203] deren Biodistribution mit [^{125}I]c(-RGDyV-) und [^{125}I]c(-RGDfY-) vergleichbar ist.^[3] Auch eine Rezeptor-abhängige Anreicherung des *Tracers* im Tumor wurde *in vivo* beobachtet.^[203]

Neben radiohalogenierten RGD-Peptiden wurden zahlreiche radiometallierte Analoga beschrieben. Das Tetrapeptid H-DKCK-OH ebenso wie DOTA wurden mit *c*(-RGDfK-) konjugiert.^[211, 212] Die hierdurch entstandenen Verbindungen wurden mit ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ und ^{188}Re markiert. In Gegenwart der $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Verbindung erhielt man eine kontrastreiche Abbildung des Tumorgewebes, aber auch eine hohe Aktivitätsanreicherung in der Niere.^[212] Su *et al.* stellten ein $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markiertes RGD-4C Peptid zum *Imaging* der $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Expression vor. Diese Verbindung erzielte in zwei Tumormausmodellen lediglich eine geringe Tumoranreicherung, was vermutlich an der geringen Bindungskonstante ($\sim 7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) von [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]HYNIC-RGD-4C gegenüber dem $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrinrezeptor liegt. Demnach scheint eine Markierung von RGD-4C mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ und HYNIC als Chelatligand ungünstig und führt zu Peptiden mit nur geringer Affinität, welche sich nicht zur Bildgebung eignen. Ein $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markiertes lineares Dekapeptid mit zwei RGD-Motiven wurde bereits zur Bildgebung in einer Patientenstudie eingesetzt.^[218] Obwohl die Hintergrundaktivität in Lunge und

Tab. 4.2: Radiomarkierte $\alpha v \beta 3$ -Liganden.^[3]

Verb.	IC ₅₀ ^a $\alpha v \beta 3$ [nM]	Tumor- modell ^b	Tumor- aufnahme	Tumor/ Muskel	Tumor/ Blut	Ref
[¹²⁵ I]c(-RGDyV-)	10	Osteo	1.46±0.16 120 min <i>p.i.</i>	4.9	8.6	[190]
[¹²⁵ I]Gluco-RGD	40	M21	1.81±0.30 120 min <i>p.i.</i>	6.2	7.9	[12]
[¹⁸ F]Galacto-RGD	5	M21	1.49±0.10 120 min <i>p.i.</i>	9.9	29.8	[205]
[¹⁸ F]Asp ₃ -RGD	33	M21	1.08±0.07 120 min <i>p.i.</i>	7.9	27	[210]
[¹⁸ F]-Ser ₃ -RGD	22	M21	0.85±0.04 120 min <i>p.i.</i>	5.3	6.1	[209, 210]
2-[¹⁸ F]c(-RGDf(NMe)V-)	1	DLD-1	0.88±0.06 120 min <i>p.i.</i>	2.7	5.2	[203]
[^{99m} Tc]DKCK-RGD	-	M21	1.08±0.14 120 min <i>p.i.</i>	8.1	9.7	[211, 212]
[¹⁸⁸ Re]DKCK-RGD	-	Osteo	1.46±0.28 120 min <i>p.i.</i>	10.4	5.4	[211]
[⁹⁰ Y]DOTA-RGD	-	Osteo	1.10±0.04 120 min <i>p.i.</i>	2.8	11.8	[211]
[¹¹¹ In]DTPA-RGD	-	CA20948	0.11±0.02 120 min <i>p.i.</i>	7.9	9.2	[213]
[^{99m} Tc]HYNIC-RGD-4C	7000 ^c	ACHN	0.59±0.1 120 min <i>p.i.</i>	2.6	1.6	[214]
[¹¹¹ In]DOTA-E-[c(-RGDfK-)] ₂	-	OVCAR-3	7.5±1.5 120 min <i>p.i.</i>	-	40 ^d	[215, 216]
[^{99m} Tc]HYNIC-E-[c(-RGDfK-)] ₂	-	OVCAR-3	5.8±0.5 120 min <i>p.i.</i>	-	10 ^d	[215, 216]
[¹²³ I]GBHO-1	0.75 ^e	M21	0.61±0.1 120 min <i>p.i.</i>	5.5	8.7	[217]

^a detaillierte Informationen über die *in vitro* Assays sind in den Referenzen zu finden; ^b Osteo: Osteosarkom von Nagetieren, M21: humanes Melanom; DLD-1: humanes Adenokarzinom des Kolons; CA20948: Pankreastumor der Ratte; ACHN: humanes Adenokarzinom der Niere; OVCAR-3: Ovarialkarzinom; ^c Bindungskonstante; ^d aus graphischen Darstellungen abgeschätzt; ^e diese Arbeit.

Unterleib hoch waren, konnten bei 11 von 14 Melanom-Patienten die Metastasen in ausreichendem Kontrast bildlich dargestellt werden. Jedoch wurde die Affinität dieses Peptids gegenüber den verschiedenen Integrinsubtypen, welche die RGD-Sequenz erkennen, nicht untersucht. Da kleine lineare RGD-Peptide wie z.B. GRGDSPK^[219]

eine geringe Selektivität besitzen, ist unklar, welches biologische Signal durch das lineare Dekapeptid bestimmt wurde.

1999 wurde von Bock *et al.* ein homo- und heterodimeres Ligandensystem für $\alpha\beta3$ und SSTR2 (Somatostatinrezeptorsubtyp 2) für den Einsatz im Tumor *Imaging* und in der Therapie vorgeschlagen.^[220] SSTR2 ist u.a. an der Inhibierung der Proliferation von Tumorzellen beteiligt.^[221, 222] De Jong *et al.*^[223] konjugierten c(-RGDfK-) mit Octreotat, einem Somatostatin-Analogon. Das resultierende Heterodimer zeigte ähnliche Affinitäten und Selektivitäten bzgl. SSTR2 bzw. $\alpha\beta3$ wie die entsprechenden Monomere. Die *Tracer*-Akkumulation wurde hauptsächlich durch die Bindung an SSTR2 hervorgerufen, was vermutlich auf die höhere Affinität von Octreotat gegenüber SSTR2 als von c(-RGDfK-) gegenüber dem $\alpha\beta3$ -Integrinrezeptor zurückzuführen ist.

Bristol-Myers Squibb beschreibt ein Homodimer bestehend aus zwei c(-RGDfK-), welche über eine Glutaminsäure verbrückt sind.^[224, 225] Das Peptid wurde mit DOTA bzw. HYNIC, wodurch die Markierung mit ^{111}In , ^{90}Y , ^{177}Lu und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ möglich ist, konjugiert. Die Verbindungen zeigten *in vitro* gegenüber dem $\alpha\beta3$ -Integrinrezeptor eine hohe Affinität und Selektivität und *in vivo* eine hohe Tumoranreicherung, wobei für das Dimer eine höhere Aktivitätskonzentration im Tumor als für das Monomer erhalten wurde.^[215] Anschließende Therapiestudien mit ^{90}Y -DOTA-E-[c(-RGDfK-)]₂ zeigten, dass eine einzige intravenöse Gabe der Verbindung in der maximal tolerierten Dosis bei Mäusen mit kleinen subkutanen Tumoren eine signifikante Wachstumsverzögerung bewirkt. Hingegen wurde dies bei Mäusen, welche mit dem Kontrollpeptid ^{90}Y -DOTA-E-[c(-RGKfD-)]₂ behandelt wurden, nicht beobachtet.^[216] Diese Daten weisen darauf hin, dass RGD-Peptide nicht nur für die nicht-invasive Bestimmung der $\alpha\beta3$ -Integrinexpression angewendet werden können, sondern auch für die Radiotherapie ein Potential besitzen.

Als Alternative zu den radiohalogenierten Peptiden wurde ein nicht-peptidisches aza-RGD-Mimetikum zur Iodmarkierung entwickelt (Kapitel 6.1),^[18, 217] welches in der Literatur unter [^{123}I]GBHO-1 (auch [^{123}I]Aza-RGD-1) bekannt ist. Es weist in $\alpha\beta3$ exprimierenden Melanoma-Zelllinien eine um ca. 66 % geringere Aktivitätsanreicherung als [^{125}I]Glucoc(-RGDyK-) auf. Die schnelle renale und hepatobiliäre

Ausscheidung führte jedoch in Leber, Niere, Haut und Lunge zu etwas besseren Tumor/Organ-Verhältnissen. Bei diesem Verhältnis wird die Aktivitätsanreicherung im $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ exprimierenden menschlichen M21 Melanom in Bezug zu den jeweiligen Akkumulationen in den Organen bzw. des Kontrolltumors M21-L gesetzt.

5 MULTIVALENTE RGD-PEPTIDE FÜR DIE TUMORDIAGNOSTIK

Um zu erforschen, ob das Konzept der Multivalenz (mehrere Bindungs epitope für einen/mehrere Rezeptoren) auf dem Gebiet des Tumor-*Imaging* Vorteile bietet, wurden multivalente RGD-Verbindungen mit einer Anbindungsstelle für einen Radiomarker entwickelt. Die Testung der Integrinaffinität der hergestellten nicht radioaktiv markierten Substanzen wurde von der Firma *Merck KGaA*, Darmstadt, im Labor von Dr. S. L. Goodman in isolierten Rezeptorassays durchgeführt. Die radioaktive Markierung und Untersuchung der Verbindungen bezüglich ihrer Anwendbarkeit in SPECT bzw. PET erfolgte durch T. Poethko und Dr. R. Haubner in der Arbeitsgruppe Radiochemie/Radiopharmakologie (Dr. H.-J. Wester) der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München (Prof. M. Schwaiger).

Nach einer kurzen Erläuterung der Bedeutung von multivalenten Wechselwirkungen wird die Synthese der Verbindungen beschrieben. Da es sich hier um Peptide handelt, werden zunächst Aspekte der Peptidsynthese und das allgemeine Synthesekonzept erläutert. Es folgen die Darstellung der einzelnen Bausteine und die Synthese des gesamten Multimers. Abschließend werden die Ergebnisse der biologischen Evaluation diskutiert.

5.1 Theorie der multivalenten Wechselwirkungen

Ein multivalenter Ligand besitzt zwei oder mehr Bindungs epitope, die gleichzeitig mit einem oder mehreren Rezeptoren wechselwirken können. Neben der einfachen Bindung eines Liganden an einen Rezeptor treten bei multivalenten Liganden zusätzliche Effekte auf, die sich in folgende Kategorien einteilen lassen (Abb. 5.1):^[226-229]

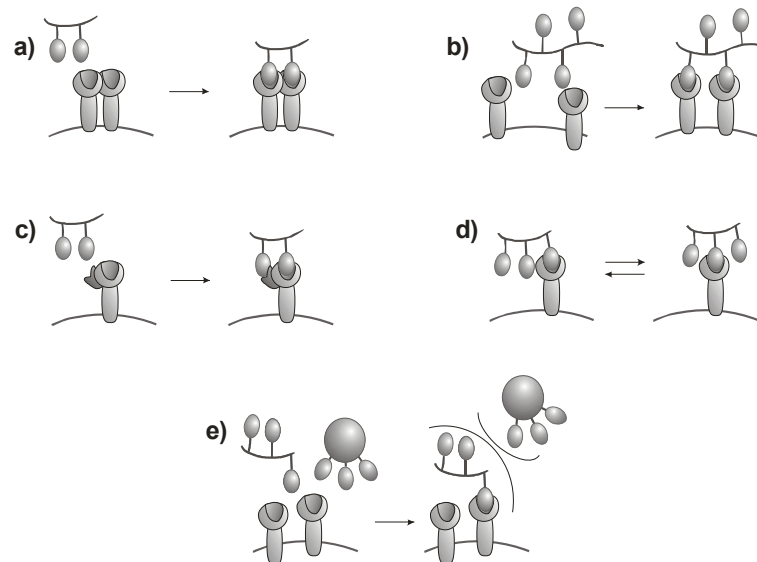


Abb. 5.1: Effekte multivalenter Liganden: **a)** Verstärkte Bindung an oligomerisierte Rezeptoren über Chelat-Effekt; **b)** Oligomerisierung bzw. Clustern von Rezeptoren durch Ligandenbindung; **c)** gleichzeitige Bindung an primäre und sekundäre Rezeptortaschen; **d)** Konzentrationserhöhung von Bindungssepitopen in der Umgebung eines Rezeptors; **e)** Abschirmung der Rezeptoren aufgrund der Ligandengröße.

In der Natur sind multivalente Wechselwirkungen weit verbreitet und treten in verschiedenen Ebenen von Erkennungs- und Adhäsionsprozessen auf (Tab. 5.1), da biologische Systeme eher mehrere schwache (multivalente) Wechselwirkungen eingehen als eine sehr starke monovalente.^[226] Hierfür sind u.a. mehrere Ursachen denkbar:

- Möglichkeit abgestufter Signalprozesse in Abhängigkeit von der Zahl beteiligter Liganden-Rezeptor-Paare,
- Erhöhung der Bindungsstärke und -spezifität durch heteromere Polyvalenz (Wechselwirkung mehrerer Ligandentypen mit mehr als nur einem Rezeptortyp),
- Bildung einer größeren Kontaktfläche.

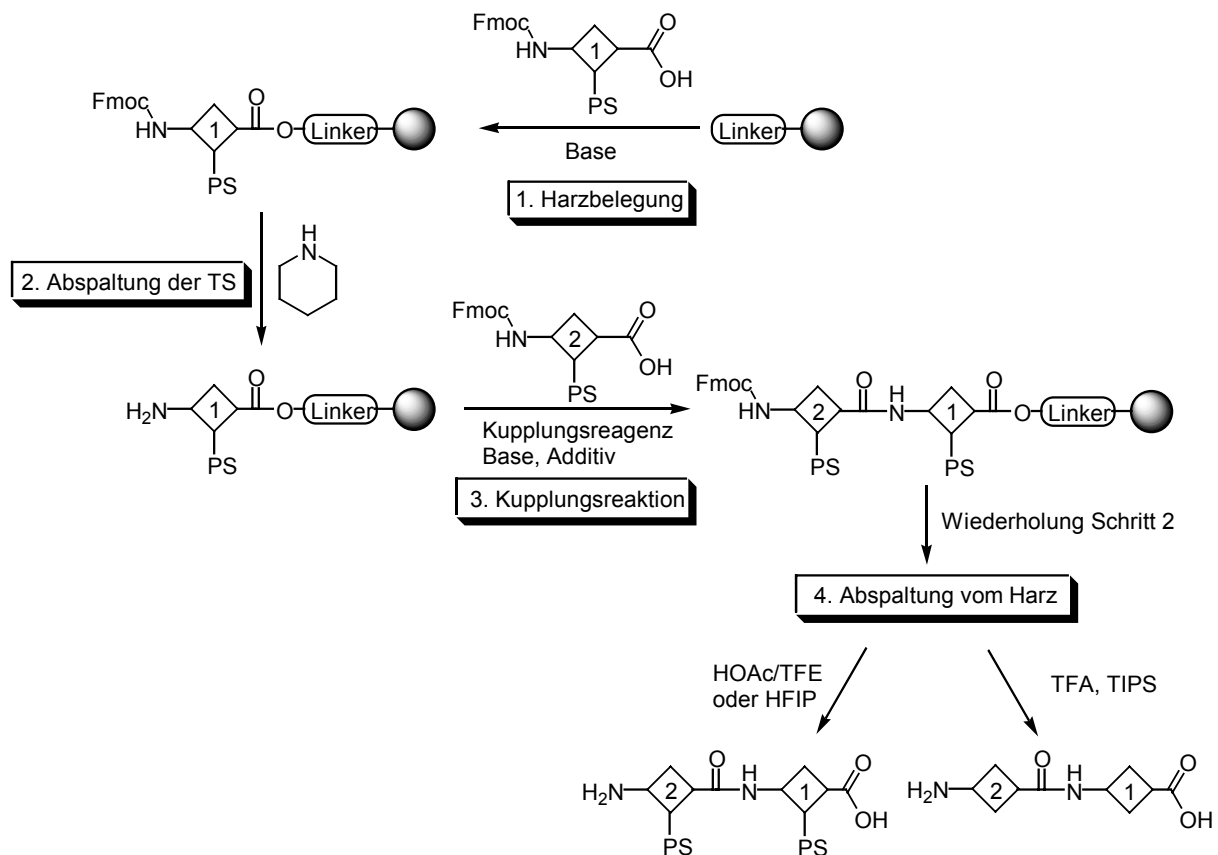
Tab. 5.1: *Beispiele multivalenter Wechselwirkungen zwischen Zelle-Virus, Zelle-Bakterium, Zelle-Zelle, Zelle-Molekül und Molekül-Molekül in biologischen Systemen.*^[226]

Ligand	Rezeptor	Wechselwirkung
Influenzavirus	Bronchiale Epithelzelle	Wechselwirkung der Hämagglutinin-Trimere mit Sialinsäure
Borrelia burgdorferi	Blutplättchen	Membranprotein P 66 bindet an α IIb β 3-Integrin
Leukozyt	Endothelzelle	Bei der Extravasation binden sLe ^x und Integrine an E- und P-Selectine
Makrophage	Bakterium	Zwei (IgG) bis zehn (IgM) Antigenbindungsstellen erkennen sich wiederholende bakterielle Epitope
retinoider RXR-Ligand-Komplex	DNA	Affinitätssteigerung durch Pentamerisierung des Transkriptionsfaktors RXR-L an DNA

In den letzten Jahren sind multivalente Wechselwirkungen verstärkt in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt.^[226-231] Multivalente Liganden, die sich in ihren kollektiven Eigenschaften quantitativ und qualitativ von den Eigenschaften der monovalenten Analoga unterscheiden, legten neue Strategien für das Design von Reagenzien und Arzneimitteln für die Forschung in der Biochemie und Biologie nahe. Es wird angenommen, dass multimere Liganden im Durchschnitt fester an Rezeptoren gebunden sind, da sich die Bindungs- und Ablöseprozesse der einzelnen Epitope positiv beeinflussen. Diese kooperative Aktivitätssteigerung lässt sich auf Entropie- und lokale Konzentrationseffekte zurückführen. Dabei spielt die Architektur der Liganden, wie die Anzahl^[232-235] und Dichte der Bindungsepitope^[236-239] sowie die Art ihrer Bindung^[240-242] eine große Rolle. Darüber hinaus besitzen multimere Liganden völlig andere pharmakokinetische Eigenschaften als monomere Analoga.^[243]

5.2 Grundlagen der Peptidsynthese

Für die Synthese der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Peptide wurde die von Merrifield entwickelte Festphasensynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) verwendet.^[244, 245] Die lineare Peptidkette wurde nach der von Carpino *et al.* entwickelten orthogonalen Fmoc/*tert*-Butyl-Schutzgruppenstrategie^[246-248] (Schema 5.1) schrittweise vom C- zum N-Terminus an einem festen Träger aufgebaut, indem eine N-terminal geschützte Aminosäure an eine N-terminal entschützte, festphasengebundene Aminosäure gekuppelt wurde. Die wesentlichen Vorteile dieser Methode liegen in der fast quantitativen Umsetzung durch Einsatz hoher Reagenzienüberschüsse und dem einfachen Entfernen der löslichen Nebenprodukte und überschüssigen Reagenzien durch Filtration.



Schema 5.1: Synthese von Peptiden an fester Phase nach Merrifield und Carpino; TS: temporäre Schutzgruppe, PS: permanente Schutzgruppe.

Im ersten Schritt wird eine partiell geschützte Aminosäure über einen zu den Kupplungsbedingungen orthogonalen *Linker* an den polymeren Träger gebunden. Als polymere Träger werden Polystyrol-Harz und TentaGel-Harz (Polystyrol-Harz mit

zusätzlichem PEG(Polyethylenglykol)-*Linker*) eingesetzt. Die Art des *Linkers* entscheidet, wie die synthetisierte Verbindung wieder von dem polymeren Träger entfernt werden kann. In dieser Arbeit wurde neben dem WANG-*Linker* hauptsächlich der Trityl-*Linker* verwendet, von welchem das Peptid unter Erhalt der permanenten Schutzgruppen abgespalten werden kann. (Abb. 5.2)

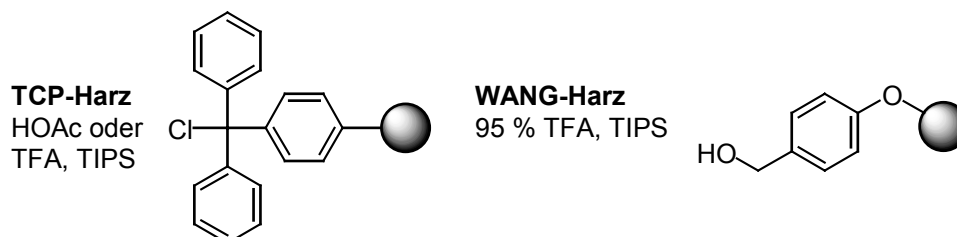


Abb. 5.2: *Verwendete Linker mit Angabe der Abspaltbedingungen.*

Für die Kupplungsreaktion (3. Schritt) muss die Carboxylgruppe der Fmoc-Aminosäure aktiviert werden. Dies kann entweder durch den Einsatz bereits voraktivierter Aminosäurederivate, wie z.B. symmetrische Anhydride, *N*-Carboxyanhydride bzw. Säurehalogenide,^[247, 249, 250] oder durch Zugabe von Aktivierungsreagenzien^[251-253] (Abb. 5.3) erfolgen.

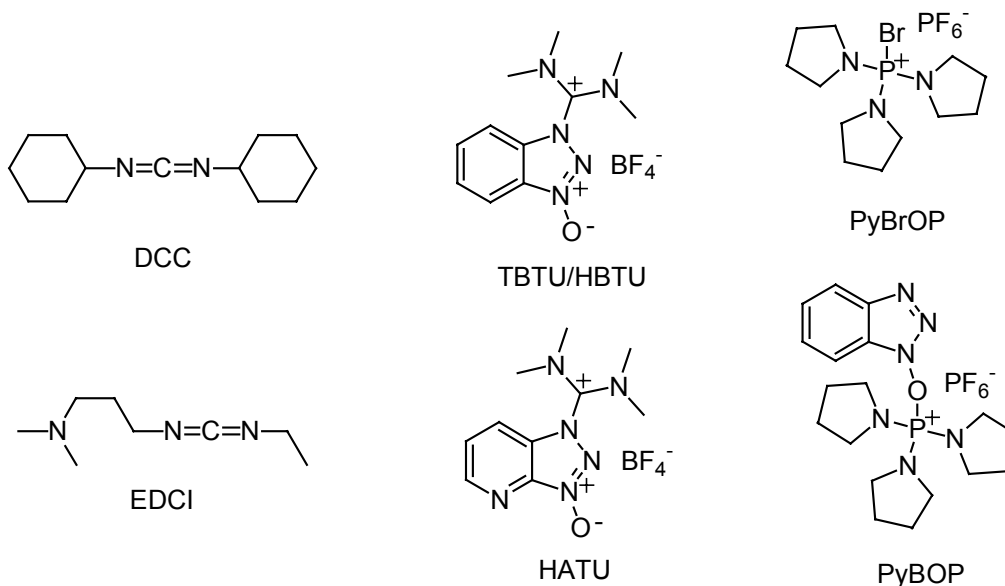


Abb. 5.3: *Kupplungsreagenzien für die in situ-Aktivierung von Aminosäuren.*

Diese Aktivierungsreagenzien erzeugen *in situ* eine hochreaktive Acyluronium- oder Acylphosphonium-Spezies, welche im nachfolgenden Schritt durch den nucleophilen Angriff von dem gebildeten Bromid, HOBt oder HOAt in das Säurehalogenid bzw. in den Aktivester umgewandelt werden. Dieser reagiert

letztendlich mit dem freien *N*-Terminus des harzgebundenen Peptids zum Amid. Die größte Reaktivität weisen OAt-Aktivester, symmetrische Anhydride und Aminosäurehalogenide auf. Die in den ersten Schritten der Aktivierungsreaktion gebildeten Acyl-Onium-Verbindungen racemisieren leicht, weshalb man durch den Zusatz von Additiven (Abb. 5.4) das Reaktionsgleichgewicht zum Aktivester verschiebt.

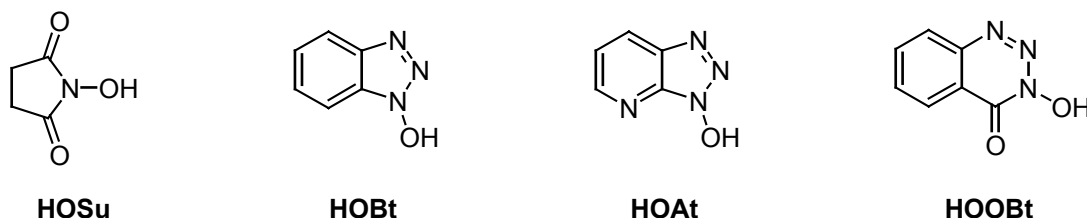


Abb. 5.4: Gebräuchliche Additive für die Kupplung von *in situ* aktivierten Aminosäurederivaten.

Um Reaktionen mit den funktionellen Gruppen der Seitenketten zu vermeiden, werden für diese permanente TFA-labile Schutzgruppen verwendet:

Tab. 5.2: Seitenkettenschutzgruppen für Aminosäuren.

Aminosäure	Schutzgruppe	Abkürzung
Tyrosin	<i>tert</i> -Butyl-Ether	^t Bu
Aspartat	<i>tert</i> -Butyl-Ester	O ^t Bu
Arginin	<i>N</i> ^α -(2,2,4,6,7)-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl-	Pbf

Die Peptidabspaltung im 4. Schritt erfolgt im Fall des *Trityl-Linkers* durch Behandlung mit schwachen Säuren wie HFIP^[254] oder Essigsäure/Trifluorethanol in Dichlormethan unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen. Soll die Harzabspaltung unter gleichzeitiger, vollständiger Entschützung des Peptids erfolgen, verwendet man TFA. Hierbei entstehen Carbokationen, die mittels geeigneter *Scavanger* abgefangen werden müssen, um die irreversible Alkylierung nukleophiler Aminosäureseitenketten zu unterdrücken. Hierbei kommen Wasser, Thioanisol, Ethandithiol oder Phenol zum Einsatz.^[255] Heute hat sich das geruchlose und sehr effektive TIPS zusammen mit geringen Mengen an Wasser in TFA als Abspaltmischung etabliert.^[256]

5.3 Allgemeine Synthesestrategie

Die Entwicklung der allgemeinen Synthesestrategie erfolgte zusammen mit U. Hersel, der auch die monomeren Analoga, sowie den ^{125}I -Precursor synthetisierte.

In erster Linie sollten Verbindungen entwickelt werden, die eine multivalente Ligand-Integrin-Wechselwirkung ermöglichen und gleichzeitig unter Erhalt der $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrinaffinität radioaktiv markiert werden können. Als Integrinligand diente das zyklische Pentapeptid ϵ (-RGDfE-) (C^{G}). Es wurde aufgrund seiner im Vergleich zu linearen RGD-Peptiden erhöhten Rezeptorselektivität ausgewählt (Kapitel 2.4). Die multimeren Verbindungen sollten mehrere Merkmale und Möglichkeiten bieten:

- Moleküle definierter Größe (keine polydispersen Polymere);
- „große“ Abstände überbrücken (u.a. Integrinabstände);
- einfache Variation in Verzweigungsgrad und *Spacer*länge;
- effizientes Einführen der RGD-Zyklopeptide;
- definierte radioaktive Markierung über funktionelle Gruppe ohne Beeinflussung der Bindungsepitope.

Als elegante Methode, um eine stabile, eindeutig definierte Radiomarkierung einzuführen, bietet sich die chemoselektive Oximligation an. Diese Reaktion erfolgt sehr rasch unter schwach sauren Bedingungen zwischen einer Aminooxy- und einer Aldehyd-Komponente. Ihre Effizienz, Selektivität und vielseitige Verwendbarkeit konnte u.a. bei der Synthese von radioaktiv markierten Proteinkonjugaten,^[257, 258] zyklischen Peptiden,^[259] Glycopeptiden,^[260] DNA- und RNA-Konjugaten^[261, 262] gezeigt werden. Eine Möglichkeit, um nur einen Radiomarker pro Verbindung einzuführen, bietet die Synthese des multimeren Peptides ausgehend von einer Aminosäure, deren Seitenkette mit der Aminooxy-Gruppe funktionalisiert ist.

Mit etablierten Methoden der Peptidkupplung konnten unter Verwendung der seitenkettenfunktionalisierten Aminosäure, verzweigter Aminosäuren und *Spacer*-Aminosäuren schnell und in guter Ausbeute Peptid-Multimere mit diverser Struktur aufgebaut werden.^[263] An die freien *N*-Termini des Gerüstmoleküls lassen sich Zyklopeptide mit freiem *C*-Terminus kuppeln. (Abb. 5.5)

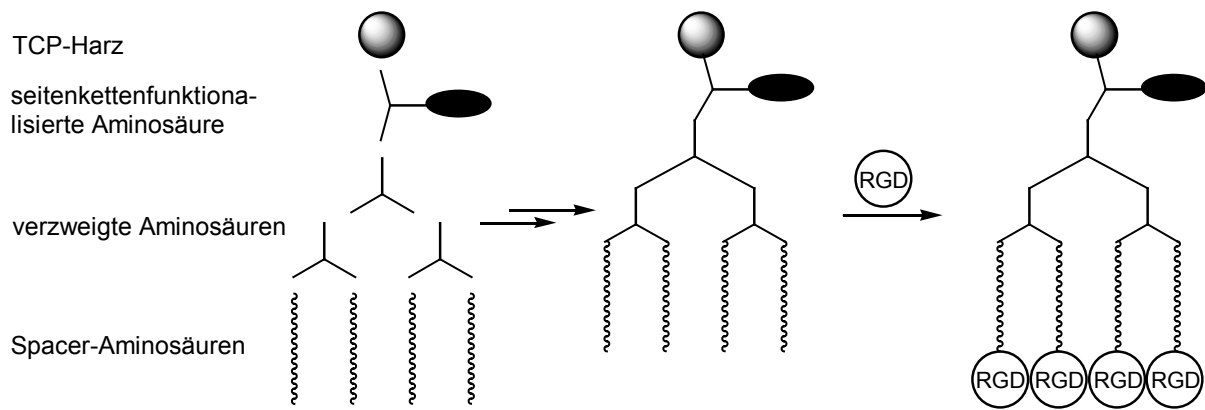


Abb. 5.5: Schematischer Aufbau eines Tetramers am Harz aus seitenkettenfunktionalisierter Starteraminosäure, verzweigter Aminosäure, Spacer-Aminosäure und teilentschütztem Zyklopeptid $c(-R[Pbf]GD[O^tBu]fE-)$.

Bei biologischen Testungen werden die zu testenden Substanzen parallel mit einer bereits bekannten nicht aktiven Verbindung, der Negativkontrolle, evaluiert, um die erhaltenen Ergebnisse überprüfen zu können. Deshalb wurde das sehr viel geringer affine Zyklopeptid $c(-RADfE-)$ (C^A) in Verbindungen integriert, die als Negativkontrolle dienen. Die multimeren Verbindungen besitzen im Vergleich zu dem entsprechenden Monomer nicht nur zusätzliche Rezeptor-Bindungsstellen, sondern aufgrund des höheren Molekulargewichtes und der größeren Anzahl an *Spacer*-molekülen auch andere pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften. Um eine Aussage über multivalente Effekte treffen zu können, war es nötig, einfach bindende multimeren Verbindungen mit sonst gleicher Beschaffenheit zu synthetisieren. Hierzu mussten alle bindenden Zyklopeptide $c(-RGDfE-)$ bis auf eines gegen das sehr viel geringer bindende Zyklopeptid $c(-RADfE-)$ ausgetauscht werden. Bei paralleler Evaluation von multivalenten und einfach bindenden multimeren Verbindungen kann man beurteilen, ob ein Effekt auf die Anzahl der zur Verfügung gestellten Bindungsstellen zurückzuführen ist.

Die Festphasensynthese der multimeren Verbindungen erfolgte divergent^[264, 265]. Das Prinzip der Konvergenz^[266, 267] kam lediglich beim Einführen des Zyklopeptids zum Tragen, da es nicht Schritt für Schritt am verzweigten Gerüstmolekül generiert, sondern als Zyklopeptid-Fragment eingeführt wurde.

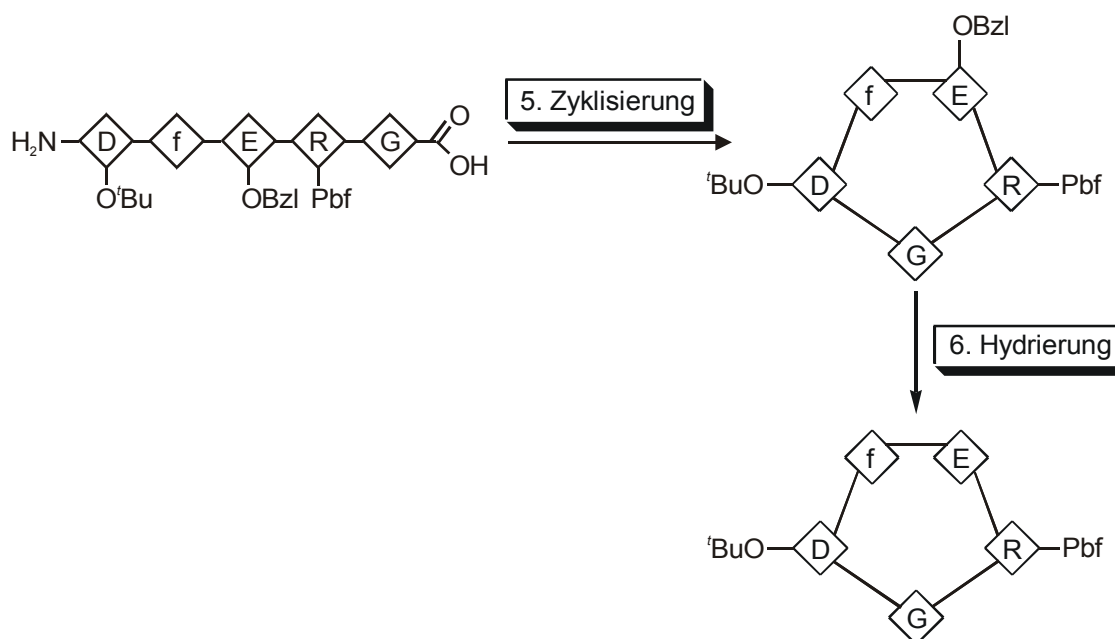
5.4 Konzeption und Synthese der Bausteine

Die Ausführung der Synthese der Bausteine beginnt mit dem Integrinliganden und wird durch die Gerüstbausteine Verzweigungseinheit und *Spacer* ergänzt.

5.4.1 Zyklopeptide

Als Integrinligand wurde das hoch affine $\alpha v \beta 3 / \alpha v \beta 5$ -selektive zyklische Pentapeptid *c*(-RGDfE-) ausgewählt. Das sehr viel geringer affine Zyklopeptid *c*(-RADfE-) wurde in Verbindungen integriert, die als Negativkontrolle dienen.

Die Synthese der Zyklopentapeptide erfolgte nach der in unserer Arbeitsgruppe etablierten Methode: Mittels Fmoc-Strategie^[246-248] wurden zuerst die linearen Pentapeptide D[O^tBu]fE[OBzl]R[Pbf]G bzw. D[O^tBu]fE[OBzl]R[Pbf]A am TCP-Harz unter Zusatz von TBTU^[268, 269], HOBT^[270, 271] und DIPEA bzw. Collidin aufgebaut, anschließend unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abgespalten (Schema 5.1), in Lösung zyklisiert^[272, 273] und mittels Hydrierung partiell entschützt (Schema 5.2).



Schema 5.2: *Synthese des teilentschützten Zyklopeptids *c*(-R[Pbf]GD[O^tBu]fE-).*

Die Zyklisierung erfolgte nach der Azidmethode, bei welcher der C-Terminus des linearen Peptids durch Einsatz von Diphenylphosphorylazid (DPPA)^[274, 275] und festem Natriumhydrogencarbonat *in situ* in ein aktives Carbonsäureazid überführt wird, und

der Ringschluss über eine Amidbildung erfolgt.^[272, 273] Für die Reaktion ist eine hohe Verdünnung erforderlich (Peptidkonzentration von $5 \cdot 10^{-3}$ mol/L in DMF), um eine intramolekulare Reaktion (Zyklisierung) gegenüber einer intermolekularen Reaktion (Oligomerisierung) zu begünstigen. Orthogonal zu den sauer abspaltbaren permanenten Schutzgruppen wurde der Benzylester (OBzl) für die Carboxylgruppe der Glutamatseitenketten verwendet. Diese lässt sich hydrogenolytisch in Anwesenheit von Pd/C als Katalysator selektiv abspalten und man erhält die Peptide $c(-R[Pbf]GD[O^tBu]fE-)$ (C^{G*}) und $c(-R[Pbf]AD[O^tBu]fE-)$ (C^{A*}), welche über die Carboxylgruppe des Glutamats weiter modifiziert werden können.

5.4.2 Verzweigungseinheit

In letzter Zeit wurden für die Festphasensynthese von verzweigten Peptiden verschiedene Aminosäurebausteine in der Literatur beschrieben. (Abb. 5.6) Diese Verzweigungseinheiten können chiral (**1**,^[263] **2**,^[276] **5**^[277]) oder achiral (**6**,^[278] **7**^[279]) sein und entweder zu einer zweifachen oder zu einer dreifachen Verzweigung führen (**8**^[280]). Für den Aufbau komplexer Peptiddendrimere stehen außerdem Aminosäuren mit verschiedenen orthogonalen *N*-Schutzgruppen zur Verfügung (**3**,^[281] **4**^[282]).

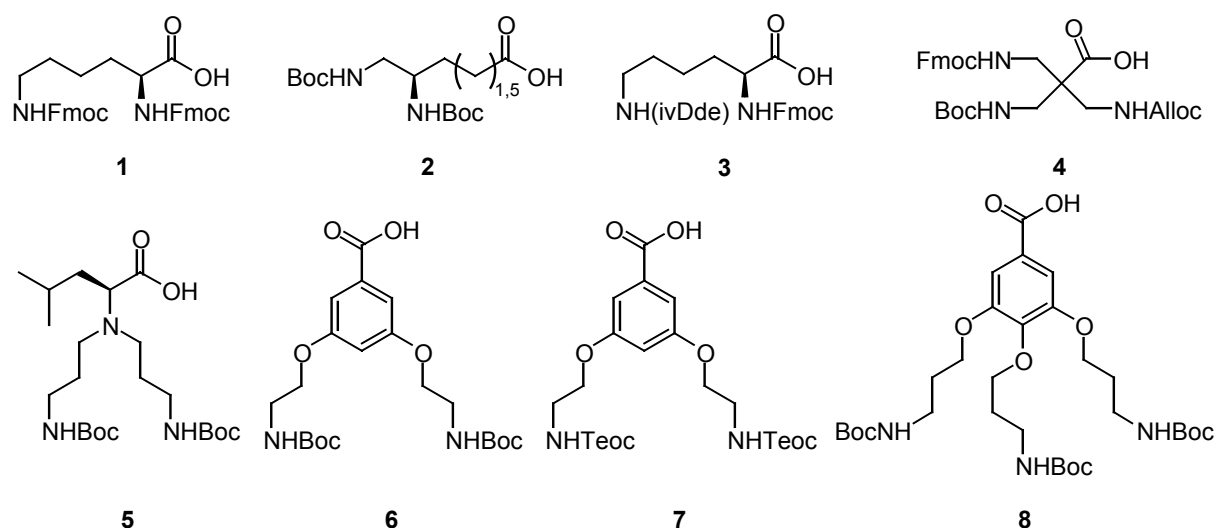


Abb. 5.6: Verzweigte Aminosäuren für die SPPS.

Ursprünglich sollte die in unserem Arbeitskreis bereits zur Synthese von multimeren Verbindungen als Verzweigungseinheit etablierte Bis-(*N,N'*-Teoc)-3,5-di-(2-aminoethoxy)-benzoesäure (**7**) verwendet werden. Diese stellte sich als ungeeignet heraus, da am TCP-Harz verankerte aliphatische Aminosäuren unter den Bedingungen

der Teoc-Entschützung (1M Bu₄NF in THF, DMSO) teilweise vom Harz abgespalten werden. Stattdessen wurde Bis-Fmoc-L-Lysin (**1**) eingesetzt, welches kommerziell erhältlich ist. Bereits Tam *et al.* verwendete **1** erfolgreich zur Festphasensynthese der MAPs (*multiple antigen peptides*), welche mehrere Kopien eines peptidischen Antigens an einem Lysinbaum (4 oder 8 Zweige) enthalten.^[263, 283-287]

Damit die allgemeine Synthesestrategie bei der Herstellung einfach bindender Multimere weiterhin angewendet werden konnte, war die Nutzung des kommerziell erhältlichen Fmoc-L-Lys(ivDde)-OH (**9**) als orthogonal geschützte Verzweigungseinheit sinnvoll. Die ivDde-Schutzgruppe ist stabil gegenüber TFA- und Piperidin-Lösungen und kann mit 2 % Hydrazin-Hydrat in NMP abgespalten werden,^[281, 288] um die Arme der multimeren Verbindung separat aufbauen zu können.

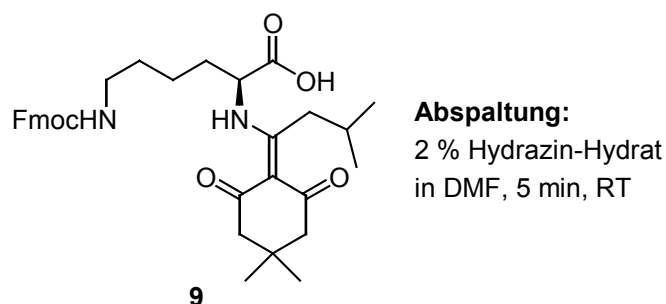
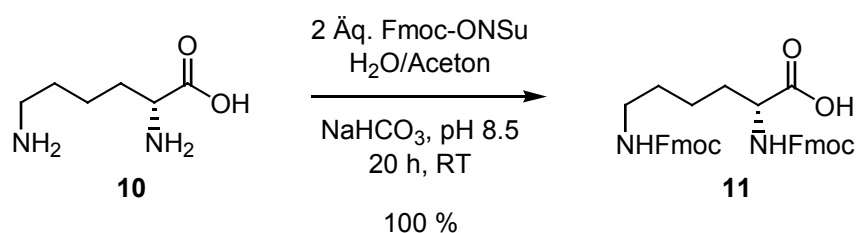


Abb. 5.7: *Fmoc-L-Lys(ivDde)-OH (9) mit Abspaltbedingungen von ivDde.*

Bei den ersten biologischen Testungen der multimeren Verbindungen stellte sich heraus, dass das synthetisierte Tetramer gegenüber dem Monomer eine geringere metabolische Stabilität besitzt (Kapitel 5.6). Dies ist vermutlich auf den proteolytischen Abbau der als Verzweigungseinheit verwendeten natürlichen Aminosäure **1** zurückzuführen. Deshalb wurden weitere Multimere unter Verwendung des nicht natürlich vorkommenden D-Lysins in Form von Bis-Fmoc-D-Lysin (**11**) (Schema 5.3) hergestellt. Dieser Baustein ist nicht kommerziell erhältlich, konnte jedoch in sehr guter Ausbeute unter Standardbedingungen^[289] hergestellt werden.



Schema 5.3: *Synthese von Fmoc-D-Lys(Fmoc)-OH (11).*

5.4.3 Spacer

Eine gewisse Distanz zwischen den Liganden ist nötig, um gleichzeitig mehrere Rezeptoren erreichen zu können. Bei der thermodynamischen Betrachtung von multivalenten Wechselwirkungen spielt der *Spacer* eine entscheidende Rolle.

Die Gibbsche Bindungsenergie setzt sich aus enthalpischen und entropischen Beiträgen zusammen, z.B. enthalpische Bindungsverstärkung bzw. -schwächung, Translations-, Rotations-, Konformations- und Solvatationsentropie. Die Beiträge des *Spacers* zur Entropie und Enthalpie können auf die Affinität multivalenter Wechselwirkungen teilweise kompensierend wirken: die konformative Flexibilität erhöht den Aufwand an Konformationsentropie für eine Assoziatbildung, steigert aber zugleich die Wahrscheinlichkeit, dass alle möglichen Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen ohne Spannungsenergie zustande kommen. Der bei einer multivalenten Bindungsausbildung auftretende Verlust an Konformationsentropie ist schwierig zu quantifizieren. Vereinfachend kann man annehmen, dass der Verlust an Konformationsentropie hauptsächlich auf dem Einfrieren von rotationsfähigen Bindungen im *Spacer* beruht.^[290] Nach einer Methode von Mammen *et al.*^[290] lässt sich die Konformationsentropie eines *Spacers* durch einfaches Aufsummieren der Torsionsentropien der einzelnen Bindungen bestimmen. Die Entropieänderung beim Einfrieren der Rotation um eine C-C-Bindung beträgt ca. 2 kJ/mol.^[290] Für einen Triethylglykols*spacer* kann der Entropieverlust somit ungünstige Werte von bis zu 40 kJ/mol annehmen.^[290] In der Literatur sind jedoch mehrere Beispiele beschrieben, bei denen trotz längerem PEG-*Spacer* eine verstärkte bivalente Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung beobachtet werden kann.^[291-293]

Unter der vereinfachten Annahme, dass sich vier Integrine mit einem gemittelten Kopfdurchmesser von 60 Å^[99] zentriert an den Ecken eines Quadrats mit der Seitenlänge 60 Å anordnen, beträgt der Abstand vom Mittelpunkt des Quadrats zum Mittelpunkt der Integrine, und damit in etwa zur RGD-Bindungsstelle, 42 Å (Abb. 5.8). Dieser Abstand sollte von den nachfolgend beschriebenen multivalenten RGD-Peptiden mit zwei Hegas(PEG)-*Spacer*bausteinen pro Verzweigungsarm überbrückt werden (mit dem Molecular Simulations Programm Insight II 2000 berechnete Länge

von Hegas im gestreckten Zustand: ca. 24 Å, Ahx im gestreckten Zustand: ca. 8 Å). Nach Wong *et al.*^[294] kann man die effektive Länge L eines PEG-*Spacers* in Wasser nach der Formel $L = a \cdot N^{0.89}$ abschätzen ($a = 3.5$ Å, Länge einer Ethoxyeinheit; N : Anzahl der Ethoxyeinheiten). Demnach erhält man für einen Hegas₂-*Spacer* (14 Ethoxyeinheiten) eine effektive Länge von ca. 37 Å. Er ist unter Einbeziehung der Verzweigungseinheit gerade ausreichend, um vier räumlich benachbarte Integrine zu erreichen. Die kalkulierte Länge von Ahx im gestreckten Zustand beträgt 8 Å.

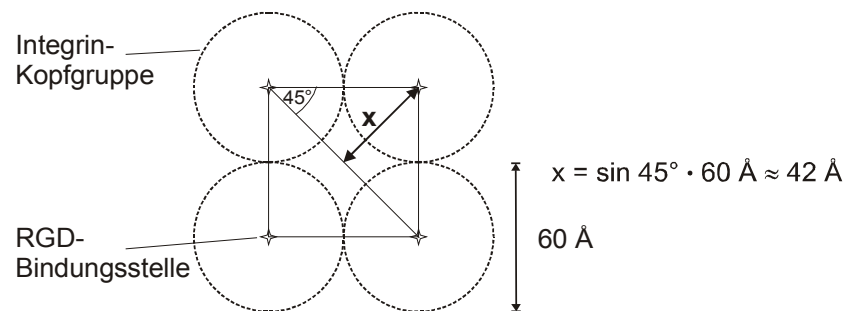


Abb. 5.8: Schematische Darstellung der quadratischen Anordnung von vier Integrinen. Aus dem Durchmesser der Kopfgruppen lässt sich der Abstand x zum Mittelpunkt des Quadrats berechnen und so die benötigte *Spacer*-Länge für ein tetravalentes RGD-Peptid abschätzen.

Um die Hydrophilie/Lipophilie bzw. Löslichkeit der Multimere zu beeinflussen, wurden die eher unpolare ϵ -Aminohexansäure (Ahx) und die gut wasserlösliche Heptaethylenglykolaminosäure (Hegas) als *Spacer* verwendet.

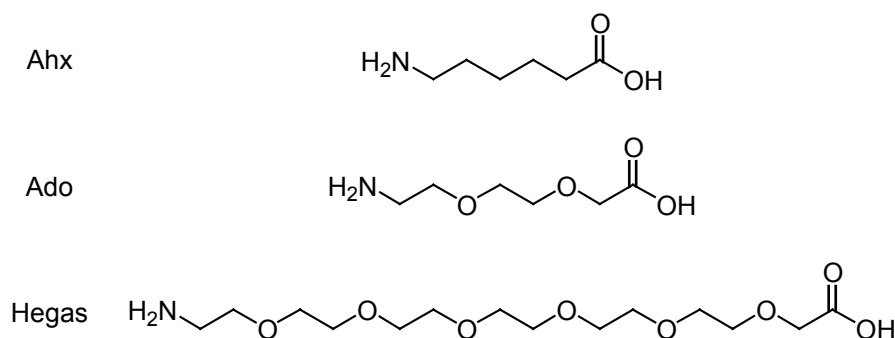
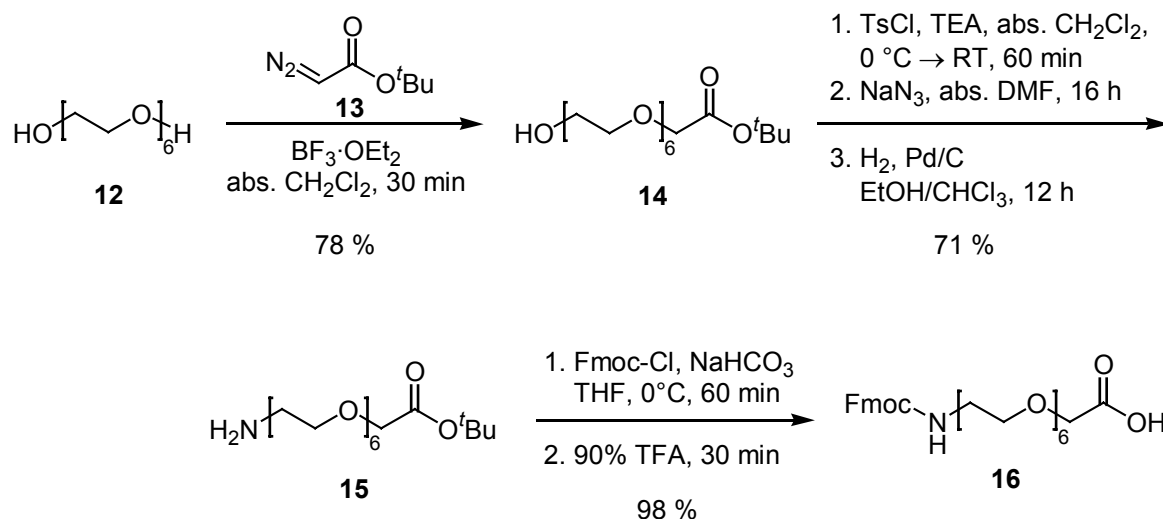


Abb. 5.9: *Spacer*-Verbindungen Ahx, Ado und Hegas.

8-Amino-3,6-dioxaoctansäure (Ado) ist als Fmoc-Aminosäure kommerziell erhältlich, jedoch sehr teuer. Daher wurde Heptaethylenglykolaminosäure ausgehend von dem längsten käuflichen Polyethylenglykol mit definierter Länge, dem Hexaethylenglykol (**12**) synthetisiert (Schema 5.4). Im ersten Schritt wurde Reaktion

mit Diazoessigsäure-*tert*-butylester (**13**) die Säurefunktion geschützt und gleichzeitig das Ethylenglykol verlängert.^[279, 295] Die Aminogruppe konnte durch Tosylierung nach Yoshida *et al.* mit Triethylamin und katalytischen Mengen Trimethylammoniumchlorid,^[296] Azidbildung mit Natriumazid^[297] und katalytischer Hydrierung generiert werden. Nach Einführung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe wurde abschließend der *tert*-Butylester sauer hydrolysiert.



Schema 5.4: Synthese von 20-(*N*-Fmoc)-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaecosansäure (Fmoc-Hegas-OH, **16**).

Durch eine HPLC-MS-Analyse erkannte man, dass das Produkt Fmoc-Hegas-OH (**16**) geringe Verunreinigungen durch Verbindungen mit zusätzlichen und fehlenden Ethoxyeinheiten enthielt. Diese stammten vermutlich aus dem Polymerisationsprozess zur Herstellung von Hexaethylenglykol und konnten auch durch die verwendete präparative HPLC kaum abgetrennt werden. Darüberhinaus war die Fmoc-Gruppe von **16** nicht stabil, weshalb die Lagerung bei -18°C erfolgte und Peptidkupplungen unter Verwendung von *sym*-Collidin statt DIPEA als Base durchgeführt wurden. Aufgrund dieser Instabilität war eine Doppelkupplung bei der Festphasensynthese nicht sinnvoll.

Es ist bekannt, dass Peptide durch Verknüpfung mit längeren Alkylketten unlösliche Präzipitate bilden.^[298] Dieses Löslichkeitsproblem trat bereits bei Verbindungen mit insgesamt vier Aminohexansäureeinheiten im Molekül auf. Es wurden deshalb u.a. Dimere und Tetramere mit nur einer Ahx-Einheit an jedem Verzweigungsarm sowie Oktamere lediglich mit der Hegas-Aminosäure als *Spacer* synthetisiert.

5.5 Synthese von multimeren RGD-Peptiden

Die aminoxyfunktionalisierten Peptide wurden am TCP-Harz unter Verwendung von TBTU/HOBt/Collidin bis einschließlich *Spacer* entsprechend Kapitel 5.2 aufgebaut. Als erste Aminosäure am Harz diente die von F. Wahl und M. Mutter in die Peptidsynthese^[259] eingeführte und kommerziell erhältliche, orthogonal geschützte Aminosäure Fmoc-Dpr[Aoa(Boc)]-OH (*N*- α -Fmoc-*N*- β -(*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-aminoxyacetyl)-*L*-diaminopropionsäure, **17**, Abb. 5.10). Ihre Seitenkette ist mit einer Aminoxygruppe funktionalisiert, wodurch das Einführen einer radioaktiv markierten prosthetischen Gruppe ermöglicht wurde.

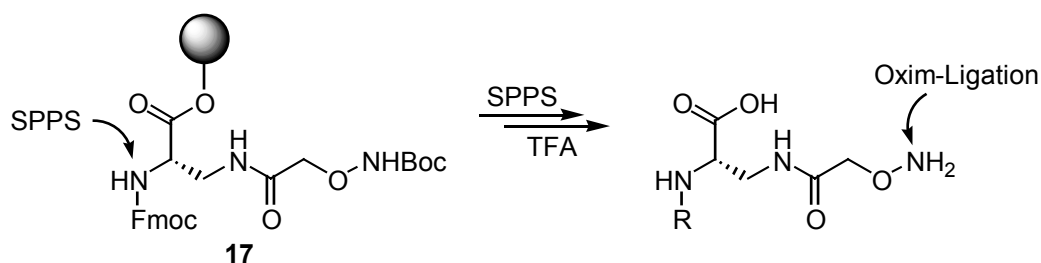


Abb. 5.10: Fmoc-Dpr[Aoa(Boc)]-OH (**17**) immobilisiert am Harz mit ihren Anwendungsmöglichkeiten.

Anschließend wurde die Verzweigungseinheit durch Kupplung mit der Aminosäure Fmoc-L-Lys(Fmoc)-OH (**1**) bzw. Fmoc-D-Lys(Fmoc)-OH (**11**, 2.5 Äquivalente pro freiem *N*-Terminus) eingeführt. Der Aufbau von tetrameren und oktameren Strukturen erfolgte durch eine bzw. zwei weiteren Kupplungen mit der Verzweigungseinheit. Die geschützten *Spacer*aminoxyacetylen Fmoc-Hegas-OH bzw. Fmoc-Ahx-OH wurden bei dimeren Verbindungen mit 2.5 Äquivalenten und bei höheren Homologen mit 2 Äquivalenten pro freiem *N*-Terminus eingeführt. Bei der *Spacer*verlängerung mit einer weiteren Aminosäure **16** wurden ebenfalls 2 Äquivalente verwendet. Nicht umgesetztes Fmoc-Hegas-OH in der Kupplungslösung konnte isoliert und in weiteren Umsetzungen verwendet werden.

Das geschützte Zyklopentapeptid mit freiem *C*-Terminus c -(R[Pbf]GD[O^tBu]fE) (C^{G*}) bzw. c -(R[Pbf]AD[O^tBu]fE) (C^{A*}) wurde mittels Fragmentkupplung am Harz eingeführt. Hierfür wurde der *C*-Terminus mit 0.98 Äq. HATU, 1 Äq. HOAt und 10 Äq. Collidin in trockenem DMF 2 Stunden voraktiviert und anschließend zum festphasengebundenen freien Amin gegeben. Durch dieses Verfahren wird die

Tetramethylguanidinbildung am *N*-Terminus bei der Reaktion mit HATU vermieden, da HATU nach der Voraktivierung bereits vollständig zum Tetramethylharnstoff und zum Aktivester mit dem *C*-Terminus abreagiert hatte.^[299] Die Festphasenreaktion wurde nach 16 Stunden durch Waschen mit DMF beendet. Für die Fragmentkupplung wurden 1.25 - 1.5 Äq. Zyklopeptid pro freies Amin verwendet. Die relativ kleine Äquivalentmenge von 1.25 pro freiem Amino-Terminus erwies sich bei höheren Homologen als ausreichend, da die insgesamt eingesetzte Menge an Zyklopeptid sehr groß war. Unumgesetztes Zyklopeptid konnte aus der Kupplungslösung isoliert und für weitere Reaktionen genutzt werden.

Die *N*-Tetramethylguanidinbildung kann ebenfalls durch den Einsatz der phosphoniumbasierenden Kupplungsreagenzien BOP und PyBOP (Abb. 5.3) verhindert werden.^[300] Da hierbei keine Voraktivierung erforderlich ist, wurden weitere Fragmentkupplungen mittels 1 Äq. PyBOP, 1 Äq. HOBt und 10 Äq. Collidin durchgeführt.

Die dimeren Verbindungen wurden vom Harz mit 95:5 TFA:Wasser und TIPS-Zusatz abgespalten, entschützt und anschließend HPLC-gereinigt. Die höheren Homologen mussten wegen des entstandenen Produktgemisches zunächst unter Erhalt der Schutzgruppen mit 20 % HFIP in Dichlormethan vom Harz abgespalten, mittels HPLC gereinigt, analog entschützt und abschließend mittels HPLC isoliert werden. Die HPLC-Fractionen wurden rasch einrotiert und lyophilisiert, um eine *N*-Trifluoracetylierung^[241] zu vermeiden. Außerdem ist bekannt, dass die Aminoxygruppe sehr leicht mit im Labor gebräuchlichen Aldehyden und Ketonen, wie z.B. Aceton, zu stabilen Oximen reagiert,^[301] weshalb nur Lösemittel hoher Reinheit (HPLC-Qualität) verwendet wurden.

Die Synthese der einfach bindenden multimeren Verbindungen, die neben drei bzw. einem RAD- nur ein RGD-Zyklopeptid enthalten, erfolgte durch separaten Aufbau der Verzweigungsarme. In Schema 5.5 ist die Festphasensynthese des einfach bindenden Tetramers dargestellt. An die immobilisierte seitenkettenfunktionalisierte Aminosäure Fmoc-Dpr[Aoa(Boc)]-OH (**17**) wurde Fmoc-L-Lys(ivDde)-OH (**9**) gekuppelt. Die Fmoc-Schutzgruppe von **9** wurde bei der basischen ivDde-Abspaltung ebenfalls teilweise entfernt, weshalb zuerst der Verzweigungsarm der α -Aminogruppe des

Lysins bis einschließlich der RAD-Zyklopeptide aufgebaut werden musste, bevor die ivDde-Schutzgruppe abgespalten werden konnte. Anschließend wurde an die ε -Aminogruppe des Lysins ein weiteres orthogonal geschütztes Lysin **9** angebunden, wiederum der α -Verzweigungsarm bis einschließlich RAD-Zyklopeptid synthetisiert und letztlich der ε -Verzweigungsarm mit dem RGD-Zyklopeptid eingeführt. Die Abspaltung, Entschützung und Isolierung der Verbindung erfolgte analog der multivalenten RGD-Peptide. Die Synthese des einfach bindenden Dimers (**d**, Abb. 5.11) war entsprechend einfacher als der tetrameren Verbindung, da nur eine Verzweigungseinheit eingeführt werden musste.

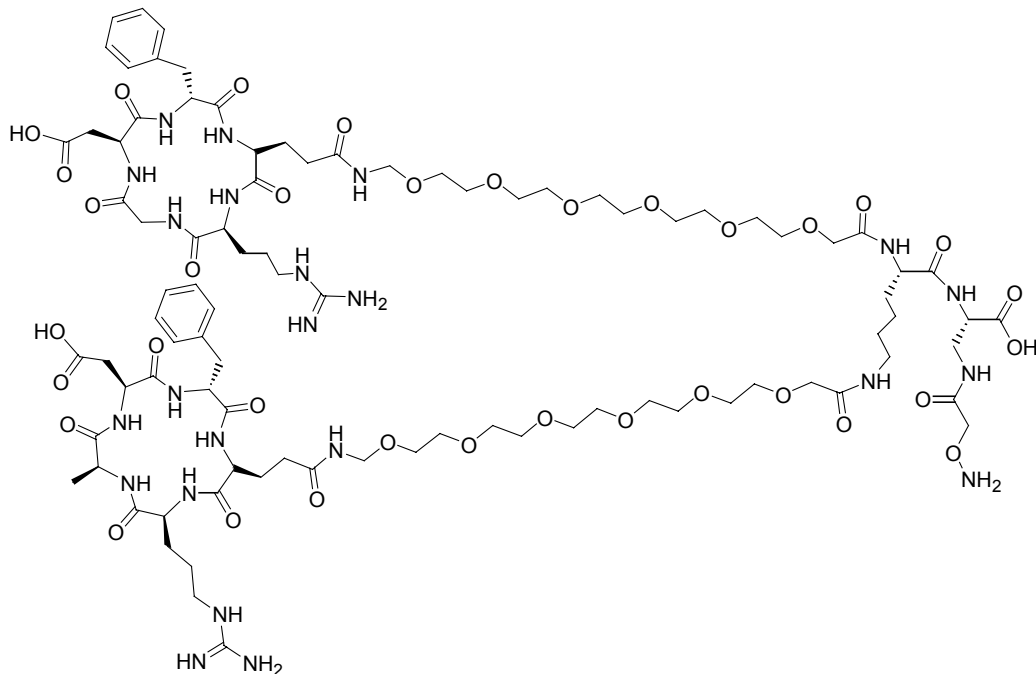
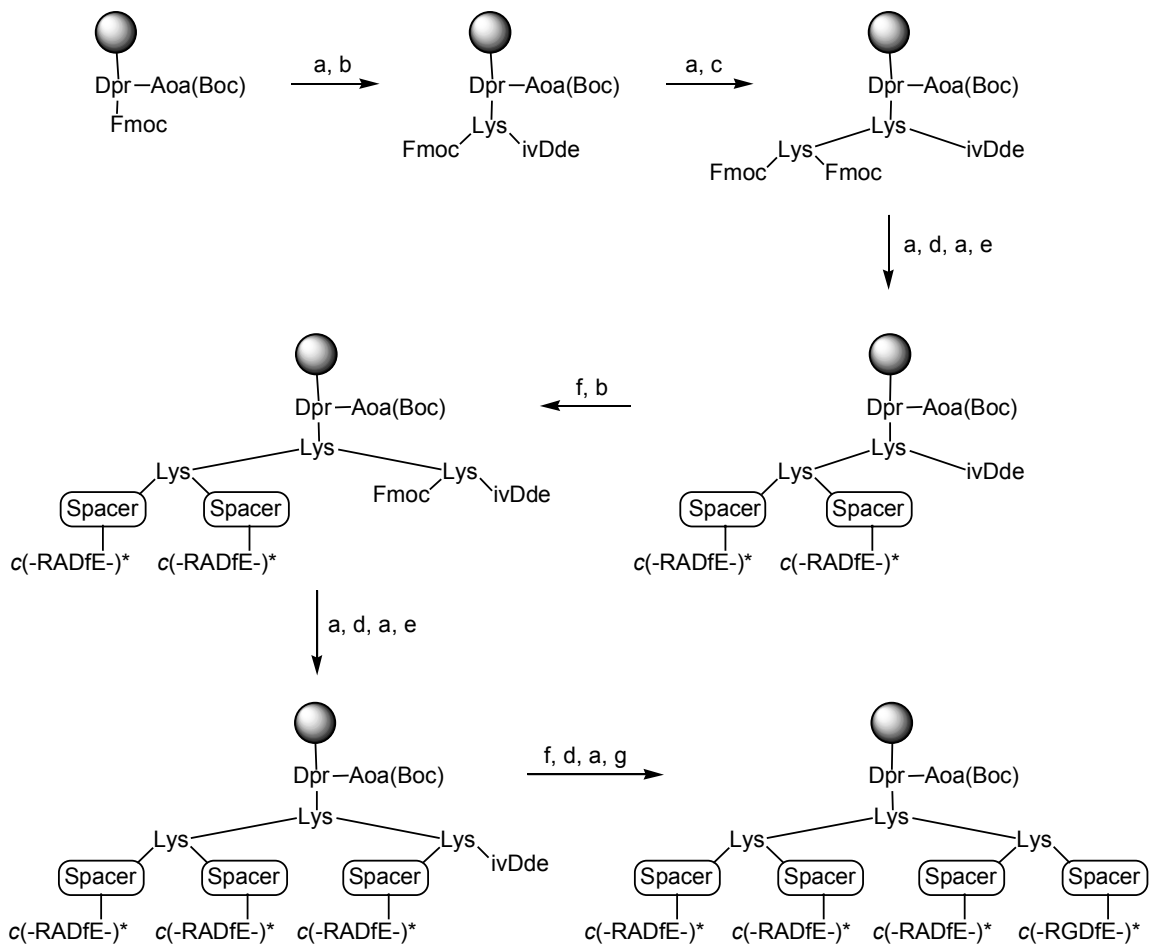


Abb. 5.11: Einfach bindendes Dimer **d**.

Die massenspektroskopische Charakterisierung der multimeren Verbindungen erfolgte mittels mehrfach geladenen Ionen durch ESI-MS bzw. einfach geladenen Ionen durch MALDI-TOF-MS. Einige Verbindungen wurden darüber hinaus durch NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Schema 5.5: Synthese des am Harz immobilisierten vollständig geschützten, einfach bindenden Tetramers **t2***. a) 20 % Piperidin in NMP; b) *Fmoc-L-Lys(ivDde)-OH* (**9**), TBTU, HOBT, Collidin, NMP; c) *Fmoc-L-Lys(Fmoc)-OH* (**1**), TBTU, HOBT, Collidin, NMP; d) *Spacer Fmoc-Hegas-OH* (**16**), TBTU, HOBT, Collidin, NMP; e) C^A* , PyBOP, HOBT, Collidin, abs. DMF; f) 2 % Hydrazin-Hydrat in NMP; g) C^G* , PyBOP, HOBT, Collidin, abs. DMF; * kennzeichnet vorhandene Seitenkettenschutzgruppen.

Insgesamt wurden folgende aminooxyfunktionalisierten Verbindungen synthetisiert:

Monomere **M1** $c(-RGDfE-)-Dpr(Aoa)-OH^a$

M2 $c(-RGDfE-)-Ahx-Dpr(Aoa)-OH^a$

M3 $c(-RGDfE-)-Hegas-Dpr(Aoa)-OH^a$

M4 $c(-RGDfE-)-Hegas_2-Dpr(Aoa)-OH^a$

^aDiese Monomere wurden von U. Hersel synthetisiert und konjugiert.^[279, 295]

M5 $c(-RADfE-)-Dpr(Aoa)-OH$

Dimere **D1** $[c(-RGDfE-)-Ahx]_2-K-Dpr(Aoa)-OH$

D2 $[c(-RGDfE-)-Hegas]_2-K-Dpr(Aoa)-OH$

D3 $[c(-RGDfE-)-Hegas_2]_2-k-Dpr(Aoa)-OH$

D4 $[c(-RADfE-)-Hegas]_2-K-Dpr(Aoa)-OH$

Tetramere **T1** $\{[c(-RGDfE-)-Ahx]_2-K\}_2-K-Dpr(Aoa)-OH$

T2 $\{[c(-RGDfE-)-Hegas]_2-K\}_2-K-Dpr(Aoa)-OH$

T3 $\{[c(-RGDfE-)-Hegas]_2-k\}_2-k-Dpr(Aoa)-OH$

T4 $\{[c(-RGDfE-)-Hegas_2]_2-k\}_2-k-Dpr(Aoa)-OH$

Oktamere **O1** $(\{[c(-RGDfE-)-Hegas]_2-k\}_2-k)_2-k-Dpr(Aoa)-OH$

O2 $(\{[c(-RGDfE-)-Hegas_2]_2-k\}_2-k)_2-k-Dpr(Aoa)-OH$

Monovalentes Dimer

d $\{[c(-RADfE-)-Hegas][c(-RGDfE-)-Hegas]\}-K-Dpr(Aoa)-OH$

Monovalente Tetramere

t1 $\{[c(-RADfE-)-Ahx]_3[c(-RGDfE-)-Ahx]\}-K_2-K-Dpr(Aoa)-OH$

t2 $\{[c(-RADfE-)-Hegas]_3[c(-RGDfE-)-Hegas]\}-K_2-K-Dpr(Aoa)-OH$

Für die Bestimmung der Integrinaffinität der multimeren Verbindungen in einem Bindungsassay mit isolierten Integrinrezeptoren wurden die kalten Referenzverbindungen mittels Oximligation hergestellt. Folgende drei nicht radioaktiven Aldehyde wurden bei der Konjugation eingesetzt (Abb. 5.12):

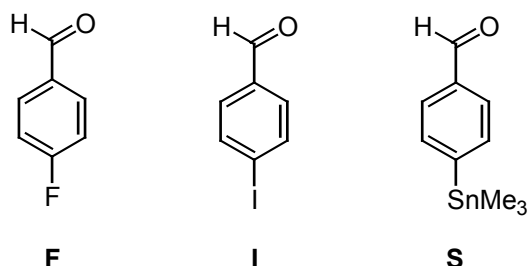
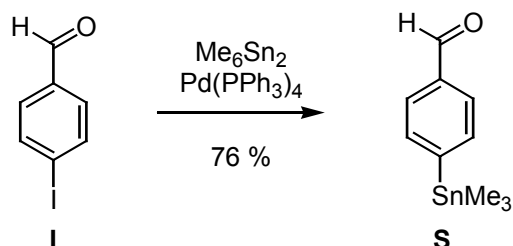


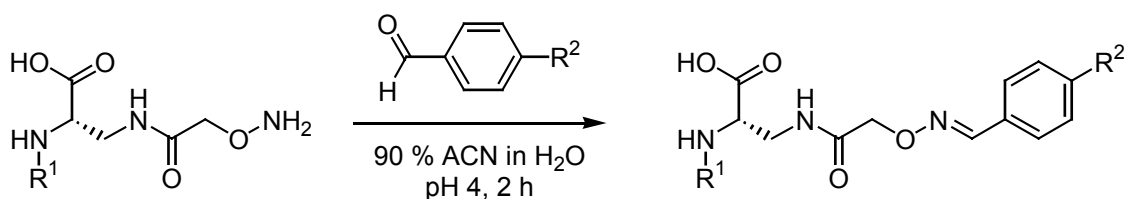
Abb. 5.12: *p*-Fluorbenzaldehyd **F**, *p*-Iodbenzaldehyd **I**, *p*-Trimethylstannylbenzaldehyd **S**.

Der einzige nicht käufliche Aldehyd, *p*-Trimethylstannylbenzaldehyd **S**, konnte modifiziert nach Kurth *et al.*^[257] unter Stille-Bedingungen in guter Ausbeute synthetisiert werden (Schema 5.6).^[279, 295]



Schema 5.6: Einstufige Synthese von *p*-Trimethylstannylbenzaldehyd **S**.^[279, 295]

Die Ligation wurde mit einem dreifachen Überschuss an Aldehyd und vollständig entschützten, isolierten Aminoxyacetylpeptiden in 90 %igem wässrigen Acetonitril bei pH 4 (TFA) durchgeführt. (Schema 5.7) Das Ligationsprodukt musste keiner aufwendigen Reinigung mehr unterzogen werden, sondern wurde durch mehrmaliges Waschen mit Diethylether in einer sehr hohen Reinheit (> 99 %) erhalten.

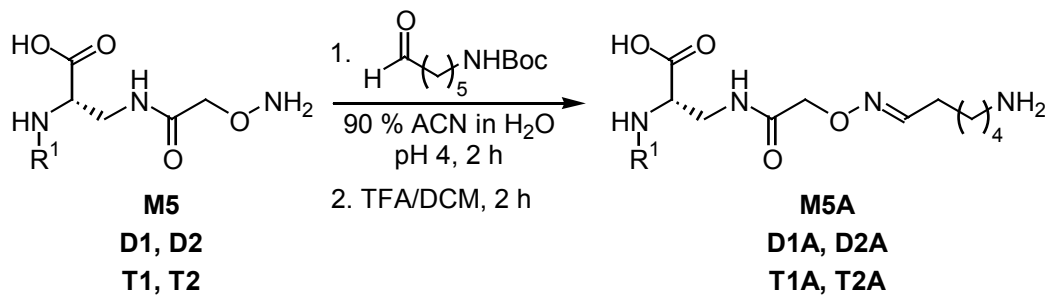


Schema 5.7: Chemoselektive Oximligation mit *p*-Benzaldehydderivaten.

Mit dieser sehr schnellen und effizienten Ligationsmethode wurden neben den *p*-Fluorbenzaldehyd-Konjugaten **D1F**, **D3F**, **D4F**, **T3F**, **T4F**, **O1F**, **O2F**, **dF**, **t1F** und **t2F** die Konjugate **D1I**, **D2I**, **T1I**, **T2I** mit *p*-Iodbenzaldehyd **I** und **D1S**, **D2S**, **T1S**, **T2S** mit *p*-Trimethylstannylbenzaldehyd **S** synthetisiert.

Die Trimethylstannyl-Konjugate dienen als *Precursor* der radioaktiven Iod-RGD-Peptide. *p*-Trimethylstannylverbindungen unterliegen mit der Zeit einer Destannylierung, wobei dies auf die Radiomarkierung keine gravierenden Auswirkungen besitzt. In der Literatur beschriebene Tri-*n*-Butylstannylderivate weisen eine höhere Stabilität auf,^[194] wurden aber aufgrund der weiteren Verwendung von *p*-Fluorbenzaldehyd im Zuge der Favorisierung von PET nicht weiter untersucht.

Darüber hinaus wurden die bereits beschriebenen multivalenten aminoxyfunktionalisierten RGD-Peptide und die monomere Negativkontrolle **M5** weiter zu einem Amin funktionalisiert (Schema 5.8, **M5A**, **D1A**, **D2A**, **T1A**, **T2A**). Diese Verbindungen werden in der Arbeitsgruppe von Dr. U. Reuning in der Klinischen Forschergruppe an der Frauenklinik der Technischen Universität München (Leiter: Prof. M. Schmitt) von D. Lössner im Rahmen des SFB 456 „Zielstrukturen für selektive Tumorinterventionen“ weiter untersucht. Nach Fluoreszenzmarkierung mit Cy5 werden die Substanzen in $\alpha v \beta 3$ - und $\alpha v \beta 5$ -Integrinbindungsstudien mittels Oberflächenplasmonfluoreszenzspektroskopie (*surface plasmon resonance fluorescence spectroscopy*, SPFS) eingesetzt. Die löslichen Integrinrezeptoren sind hierbei in eine artifizielle Lipiddoppelschicht inkorporiert, die als Modellsystem für biologische Membranen dient. Die Bindungsstudien erfolgen in Zusammenarbeit mit Dr. E.-K. Sinner am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried (AG Membranbiochemie, Leiter: Prof. D. Oesterhelt).



Schema 5.8: Oximilation von aminoxyfunktionalisierten Peptiden und nachfolgende Entschützung zu analogen Aminen für die Fluoreszenzmarkierung mit Cy5.

5.6 Biologische Evaluation

Die *p*-Iodbenzaldehyd- und *p*-Fluorbenzaldehyd-Konjugate wurden als nicht radioaktive Referenzen im Labor von Dr. S. L. Goodman der Firma *Merck KGaA*, Darmstadt, in isolierten Rezeptorassays (Kapitel 7.2.8) auf ihre Affinität gegenüber dem $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrin untersucht (Tab. 5.3; Affinitäten zu weiteren αv -Integrinrezeptoren Tab. 10.1).

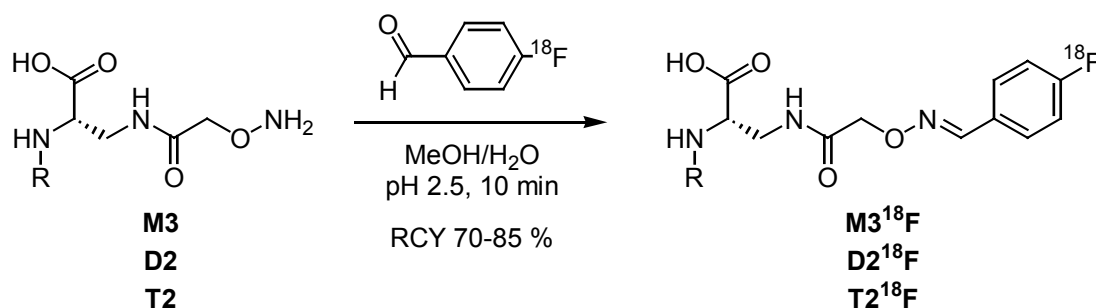
Es wird bestätigt, dass die Affinität durch Modifikation der Glutamatseitenkette des RGD-Zyklusses nicht beeinträchtigt wird, und alle multimeren RGD-Peptide eine nanomolare $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrinaffinität besitzen. Von Dimer **D1I**, **D2I**, **D3F** (IC_{50} : 0.9 - 3.3 nM) über Tetramer **T1F**, **T2I**, **T3F**, **T4F** (IC_{50} : 0.2 - 0.75 nM) bis hin zu Oktamer **O1F**, **O2F** (IC_{50} : 0.12 - 0.21 nM) ist ein Trend zu kleineren IC_{50} -Werten zu erkennen. Die einfach bindenden Multimere **dF**, **t1F** und **t2F** (IC_{50} : 12 - 25 nM) zeigen zu den Monomeren **C^G**, **M1I**, **M2I**, **M3I**, **M4I** (IC_{50} : 10 - 24 nM) vergleichbare IC_{50} -Werte. Die monomere Negativkontrolle **D4F** besitzt tatsächlich keine nennenswerte Integrinaffinität (IC_{50} : 10 μM , 1 %). Eine Bewertung des Einflusses der Multivalenz ist in diesem Bindungsassay an isolierten Integrinrezeptoren nicht möglich. Es wird nur das Inhibierungsverhalten der multimeren Verbindungen in einem Verdrängungsexperiment gegenüber dem löslichen biotinylierten Liganden Vitronectin bestimmt, wobei evtl. auftretende kooperative Effekte keine Auswirkung haben.

Tab. 5.3: Inhibierungsverhalten der nicht radioaktiven Konjugate im isolierten Rezeptorassay. Der IC_{50} -Wert wird erst ab einer Inhibierung von 50 % bei einer Peptidkonzentration von 100 nM austitriert und ansonsten in Prozent der Inhibierung bei entsprechender Peptidkonzentration angegeben.

Peptid	IC_{50} [nM] $\alpha v \beta 3$
C^G c(-RGDfE-) ^a	24
C^A c(-RADfE-) ^a	10^4 , 68 %
M1I c(-RGDfE-)-Dpr[Ac ^b I ^c]-OH	10
M2I c(-RGDfE-)-Ahx-Dpr[AcI]-OH	10
M3I c(-RGDfE-)-Hegas-Dpr[AcI]-OH	20
M4I c(-RGDfE-)-Hegas ₂ -Dpr[AcI]-OH	7
D1I [c(-RGDfE-)-Ahx] ₂ -K-Dpr[AcI]-OH	0.9
D2I [c(-RGDfE-)-Hegas] ₂ -K-Dpr[AcI]-OH	3
D3F [c(-RGDfE-)-Hegas ₂] ₂ -k-Dpr[AcF ^d]-OH	3.3
D4F [c(-RADfE-)-Hegas] ₂ -K-Dpr[AcF]-OH	10^4 , 1 %
T1I {[c(-RGDfE-)-Ahx] ₂ -K} ₂ -K-Dpr[AcI]-OH	0.35
T1F {[c(-RGDfE-)-Ahx] ₂ -K} ₂ -K-Dpr[AcF]-OH	0.3
T2I {[c(-RGDfE-)-Hegas] ₂ -K} ₂ -K-Dpr[AcI]-OH	0.2
T3F {[c(-RGDfE-)-Hegas] ₂ -k} ₂ -k-Dpr[AcF]	0.41
T4F {[c(-RGDfE-)-Hegas ₂] ₂ -k} ₂ -k-Dpr[AcF]-OH	0.75
O1F ({[c(-RGDfE-)-Hegas] ₂ -k} ₂ -k) ₂ -k-Dpr[AcF]-OH	0.21
O2F ({[c(-RGDfE-)-Hegas ₂] ₂ -k} ₂ -k) ₂ -k-Dpr[AcF]-OH	0.12
dF {[c(-RADfE-)-Hegas][c(-RGDfE-)-Hegas]}-K-Dpr[AcF]-OH	12
t1F {[c(-RADfE-)-Ahx] ₃ [c(-RGDfE-)-Ahx]}-K ₂ -K-Dpr[AcF]-OH	21
t2F {[c(-RADfE-)-Hegas] ₃ [c(-RGDfE-)-Hegas]}-K ₂ -K-Dpr[AcF]-OH	25

^a Angabe des unmodifizierten RXD-Zyklopeptids als Vergleich; ^b Ac = Acetyl; ^c I = 2-p-Iodbenzaldehydoxim; ^d 2-p-Fluorbenzaldehydoxim.

In der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München wurde von T. Poethko eine neue, sehr rasche und effiziente Strategie der ^{18}F -Markierung auf der Basis der bereits beschriebenen Oximligation entwickelt.^[302-304] Diese Methode verwendet einen ^{18}F -markierten Aldehyd als *Precursor* für die chemoselektive Konjugationsreaktion. 4- ^{18}F Fluorbenzaldehyd wird über die nukleophile aromatische Substitution von „Trimethylamin“ durch $^{18}\text{F}^-$ in 4-*N,N,N*-Trimethylammoniumbenzaldehyd Triflat generiert. Als Gegenion des Fluorids diente das aus Kryptofix und Kaliumcarbonat gebildete Kryptat $[\text{K} \llcorner 2.2.2]^+$, bei welchem das Kaliumion in den Kryptanden Kryptofix eingelagert wurde. Durch diese Methode konnte 4- ^{18}F Fluorbenzaldehyd trägerfrei in weniger als 0.5 h hergestellt und mittels Kartuschenextraktion oder HPLC gereinigt werden. Die zerfallskorrigierte radiochemische Ausbeute nach der Reinigung betrug ca. 75 %. Schema 5.9 zeigt die Oximligation der Verbindungen **M3**, **D2** und **T2** (jeweils eine HeGas-Aminosäure pro Verzweigungsarm), welche bei pH 2.5 (TFA) in einem Methanol-Wasser-Gemisch (4:1, 0.5 mM Peptid) innerhalb von 10 min durchgeführt wurde. Die radiochemische Ausbeute nach Isolierung der Konjugate **M3** ^{18}F , **D2** ^{18}F und **T2** ^{18}F betrug 70 - 85 % bezogen auf den 4- ^{18}F Fluorbenzaldehyd.



Schema 5.9: Oximligation von **M3**, **D2** und **T2** mit radioaktiv markiertem *p*-Fluorbenzaldehyd (**F**).

Die ^{18}F -markierten Verbindungen **M3** ^{18}F , **D2** ^{18}F und **T2** ^{18}F wurden in Hinblick auf ihre Anwendbarkeit für die PET näher untersucht. Für die Untersuchung der *in vivo*-Stabilität und Biodistribution in Mäusen wurden tumortragende Nacktmäuse (M21 und M21-L Melanome) verwendet. Während die Zelllinie M21 den $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrinrezeptor stark exprimiert,^[190, 305] dient M21-L aufgrund ihrer schwachen $\alpha\text{v}\beta 3$ -Expression als Negativkontrolle.^[305] Die stark $\alpha\text{v}\beta 3$ -exprimierende Zelllinie M21 wird im Folgenden

als Tumor(gewebe) bezeichnet. Die Verabreichung von 1 – 2 MBq $M3^{18}F$, $D2^{18}F$ bzw. $T2^{18}F$ erfolgte intravenös in die Schwanzvene in Gruppen von jeweils 2 bis 5 Mäusen für jede Substanz. Die Tiere wurden 60 bzw. 120 min nach der Injektion (*post injection, p.i.*) getötet, sezirt und der **prozentuale** Anteil der injizierten Dosis (Radioaktivität) normiert auf **ein Gramm** des Organs (% ID/g) bestimmt. Die Tumor/Organ-Verhältnisse wurden aus dem Quotienten der Aktivitätsanreicherung im M21 Melanom und der Radioaktivitätsanreicherung in den Organen berechnet. Die Spezifität der Akkumulation der Radioaktivität im Tumorgewebe wurde in Wettbewerbsstudien 60 min *p.i.* durch die gleichzeitige Verabreichung von 18 mg *c*(-RGDfV-)/kg Maus nachgewiesen.

In Abb. 5.13 sind die Biodistributionsdaten 60 min *p.i.* der monomeren ($M3^{18}F$), dimeren ($D2^{18}F$) und tetrameren ($T2^{18}F$) Verbindung gegenübergestellt. Die vergleichenden Abbildungen der Daten jeder Verbindung mit Wettbewerbsstudie sind in Abb. 10.1 bis Abb. 10.5 zu finden.

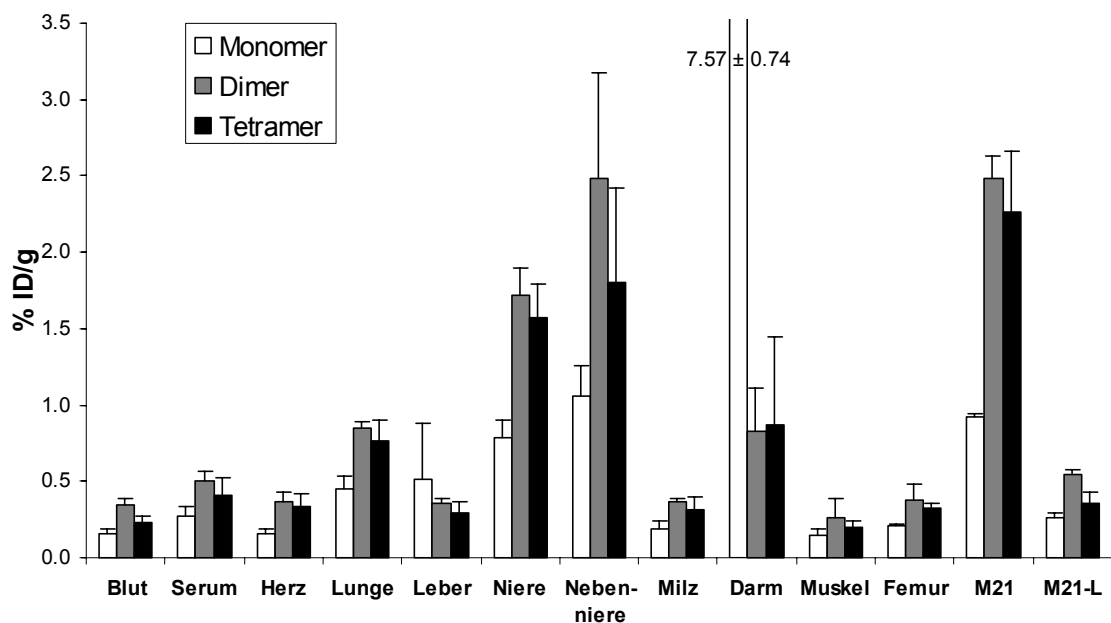


Abb. 5.13: Biodistribution von Monomer $M3^{18}F$, Dimer $D2^{18}F$ und Tetramer $T2^{18}F$ 60 min *p.i.* in Mäusen.

$T2^{18}F$ zeigt eine schnelle, hauptsächlich renale Exkretion (1.58 ± 0.22 % ID/g), was in einer niedrigen Aktivitätsanreicherung in Blut (0.23 ± 0.04 % ID/g) und Muskel (0.20 ± 0.04 % ID/g) bereits 60 min *p.i.* resultiert. $M3^{18}F$ hingegen weist 60 min nach Injektion eine hohe Anreicherung in der Leber (0.52 ± 0.36 % ID/g) und im Darm

(7.57 ± 0.74 % ID/g) auf, was auf eine Ausscheidung über Leber, Galle und letztlich Darm schließen lässt. Die Anreicherung im Tumor von $\mathbf{M3}^{18}\mathbf{F}$ beträgt 60 min *p.i.* 0.92 ± 0.02 % ID/g, 120 min *p.i.* 0.48 ± 0.07 % ID/g, was zusammen mit der relativ langsamen Gesamtausscheidung (Darm 120 min: 6.98 ± 0.73 % ID/g, Abb. 5.14) in z.T. geringen Tumor/Organ-Verhältnissen (60 min *p.i.* Abb. 5.15, insbesondere 120 min *p.i.* Abb. 5.16) resultiert. Ein Vergleich der Biodistributionsdaten von $\mathbf{M3}^{18}\mathbf{F}$, $\mathbf{D2}^{18}\mathbf{F}$ und $\mathbf{T2}^{18}\mathbf{F}$ (Abb. 5.14) 120 min *p.i.* zeigen hingegen eine höhere Aktivitätsanreicherung der dimeren und tetrameren Verbindung im Tumor ($\mathbf{D2}^{18}\mathbf{F}$: 1.63 ± 0.13 % ID/g, $\mathbf{T2}^{18}\mathbf{F}$: 1.65 ± 0.08 % ID/g) als in allen Organen. Die Aufnahme des Tetrameren im Tumorgewebe ist 3.4-mal so hoch wie die des Monomeren (0.48 ± 0.07 % ID/g) und innerhalb des Fehlerbereiches vergleichbar mit dem Dimer. Somit besitzt $\mathbf{T2}^{18}\mathbf{F}$ gegenüber $\mathbf{D2}^{18}\mathbf{F}$ bei gleichbleibender Aktivitätsanreicherung im Tumor eine schnellere *Clearance* und Exkretion, d.h. eine verbesserte Biodistribution.

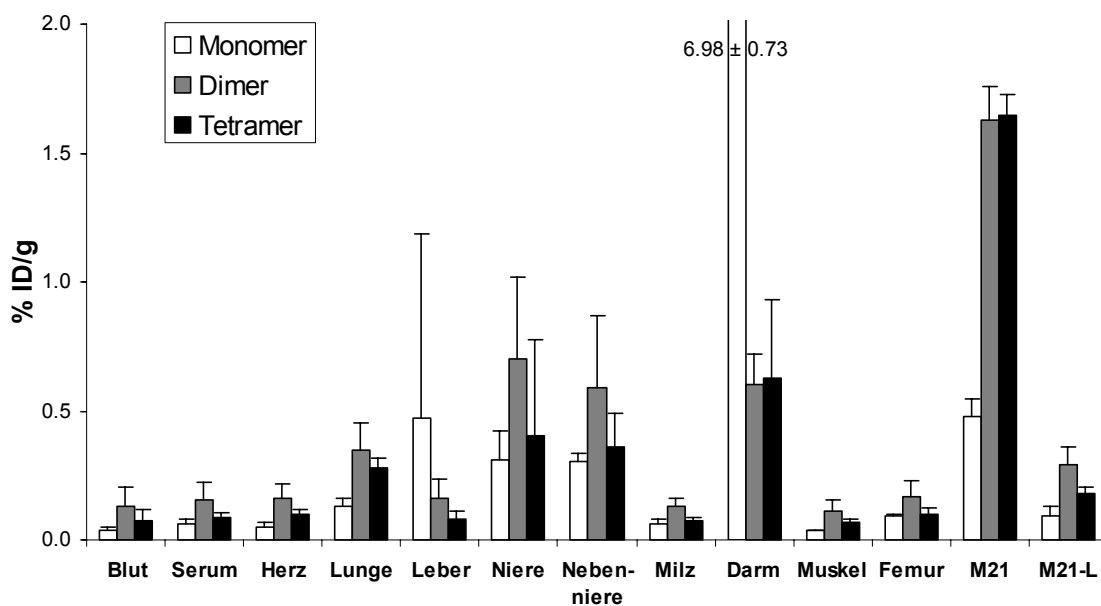


Abb. 5.14: Biodistribution von Monomer $\mathbf{M3}^{18}\mathbf{F}$, Dimer $\mathbf{D2}^{18}\mathbf{F}$ und Tetramer $\mathbf{T2}^{18}\mathbf{F}$ 120 min *p.i.* in Mäusen.

Dieses *in vivo*-Verhalten der tetrameren Verbindung $\mathbf{T2}^{18}\mathbf{F}$ spiegelt sich in hohen Tumor/Hintergrund-Verhältnissen verglichen mit $\mathbf{D2}^{18}\mathbf{F}$ und $\mathbf{M3}^{18}\mathbf{F}$ 60 min *p.i.* (Abb. 5.15) und insbesondere 120 min *p.i.* (Tumor/Blut 21.25 ± 11.76 , Tumor/Muskel 23.12 ± 3.63 ; $\mathbf{D2}^{18}\mathbf{F}$: T/B: 12.43 ± 7.06 , T/M: 14.23 ± 5.38 ; $\mathbf{M3}^{18}\mathbf{F}$: T/B 13.97 ± 5.61 , T/M 13.23 ± 2.24 ; Abb. 5.16) wider.

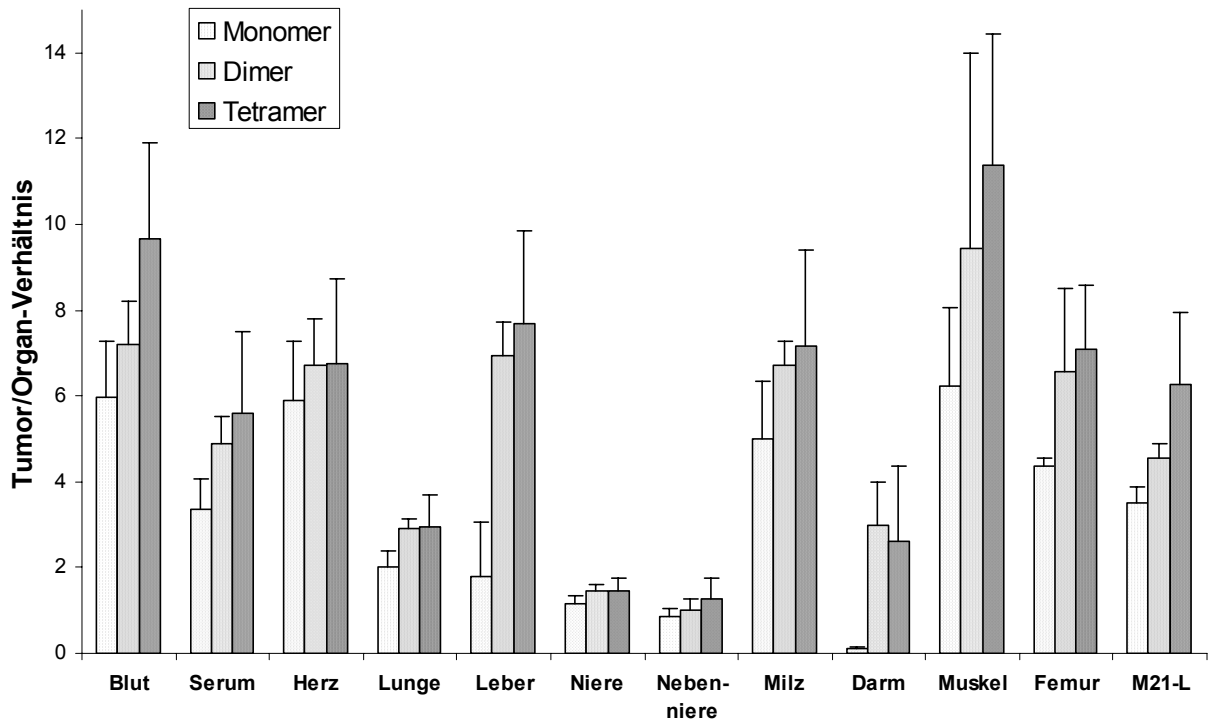


Abb. 5.15: Tumor/Organ-Verhältnisse von $M3^{18}F$, $D2^{18}F$ und $T2^{18}F$ 60 min p.i. in Mäusen.

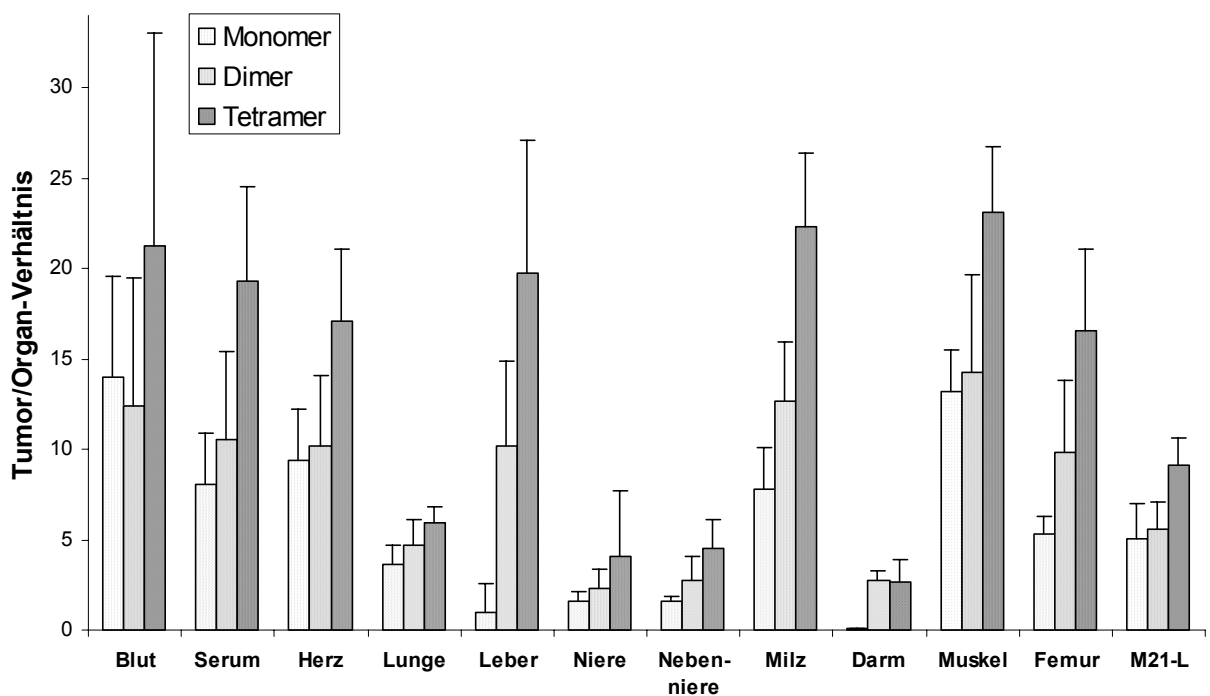


Abb. 5.16: Tumor/Organ-Verhältnisse von $M3^{18}F$, $D2^{18}F$ und $T2^{18}F$ 120 min p.i. in Mäusen.

Die Selektivität der Radioaktivitätsanreicherung im Tumorgewebe zeigt sich bereits in der niedrigen Akkumulation des *Tracers* in der Negativkontrolle M21-L mit **M3¹⁸F** 21 %, **D2¹⁸F** 18 % und **T2¹⁸F** 11 % der im $\alpha\beta3$ -positiven Tumor M21 bestimmten Radioaktivitätskonzentration. Der direkte Nachweis der Spezifität wurde in Blockadestudien durch Verabreichung von 18 mg *c*(-RGDfV-)/kg vor der Injektion von **M3¹⁸F**, **D2¹⁸F** und **T2¹⁸F** durchgeführt. Hierbei wurde eine Rezeptorsättigung vor der *Tracergabe* erreicht und die Aktivitätskonzentration im Tumor reduzierte sich auf 26 % (**M3¹⁸F**), 14 % (**D2¹⁸F**) bzw. 28 % (**T2¹⁸F**) der nicht blockierten Kontrolle.

Als Faustregel erscheint in der Praxis für eine *in vivo*-Detektion von Tumoren ein Tumor/Hintergrund-Verhältnis ab > 3 hinreichend. Dies wird von **T2¹⁸F** 120 min *p.i.* erfüllt. Bereits 90 min *p.i.* waren kontrastreiche Aufnahmen von Mäusen, denen **M3¹⁸F**, **D2¹⁸F** bzw. **T2¹⁸F** injiziert wurde, möglich und sind in Abb. 5.17 dargestellt. Zur Veranschaulichung wurde zuvor von einem Tier eine Kernspinaufnahme durchgeführt. Diese zeigt die Tumoren, wobei auf der rechten Seite der $\alpha\beta3$ -Rezeptor stark (M21) und auf der linken schwach (M21-L) exprimiert ist. In der transaxialen sowie in der longitudinalen Aufnahme erkennt man die hohe Aktivitätsanreicherung im Falle von **T2¹⁸F** in M21 im Vergleich zum analogen RGD-Monomer und -Dimer sowie die Spezifität der Akkumulation des *Tracers* im Tumorgewebe durch das Blockadeexperiment (ganz links).

In weiteren *in vivo*-Experimenten konnte die metabolische Stabilität von **M3¹⁸F** und deren Oximbindung nachgewiesen werden. Außerdem wurden mittels Radio-HPLC 60 min nach Injektion von **M3¹⁸F** und **T2¹⁸F** die Metabolisierung in Blut, Leber, Niere und Tumor analysiert (Abb. 5.18). Das Monomer (blau gepunktet) ergibt neben einem Peak bei ca. 16 min in allen drei Organen nur einen geringen Umsatz zu einer Verbindung, welche bei 11 min eliminiert wird. Im Gegensatz dazu entstehen bei **T2¹⁸F** weitere Metaboliten. Unter Berücksichtigung der Oximstabilität ist anzunehmen, dass ein proteolytischer Abbau der Verzweigungseinheit L-Lysin stattfindet. Aus diesem Grund sollte ihr Austausch gegen D-Lysin zu einer verbesserten metabolischen Stabilität der analogen tetrameren Verbindung **T3** führen.

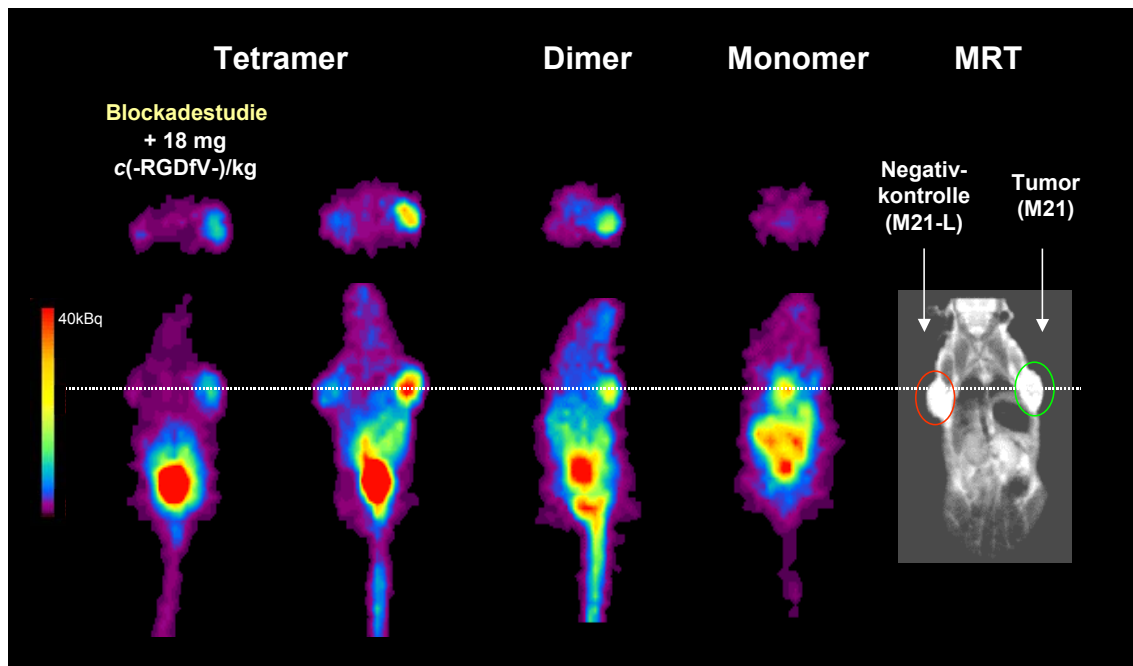


Abb. 5.17: PET-Aufnahmen von $M3^{18}F$, $D2^{18}F$ und $T2^{18}F$ 90 min p.i. in Mäusen. Das MRT (ganz rechts) zeigt die Melanome, von denen das rechte den $\alpha\beta3$ -Rezeptor stark exprimiert (M21), das linke jedoch nur schwach (M21-L).

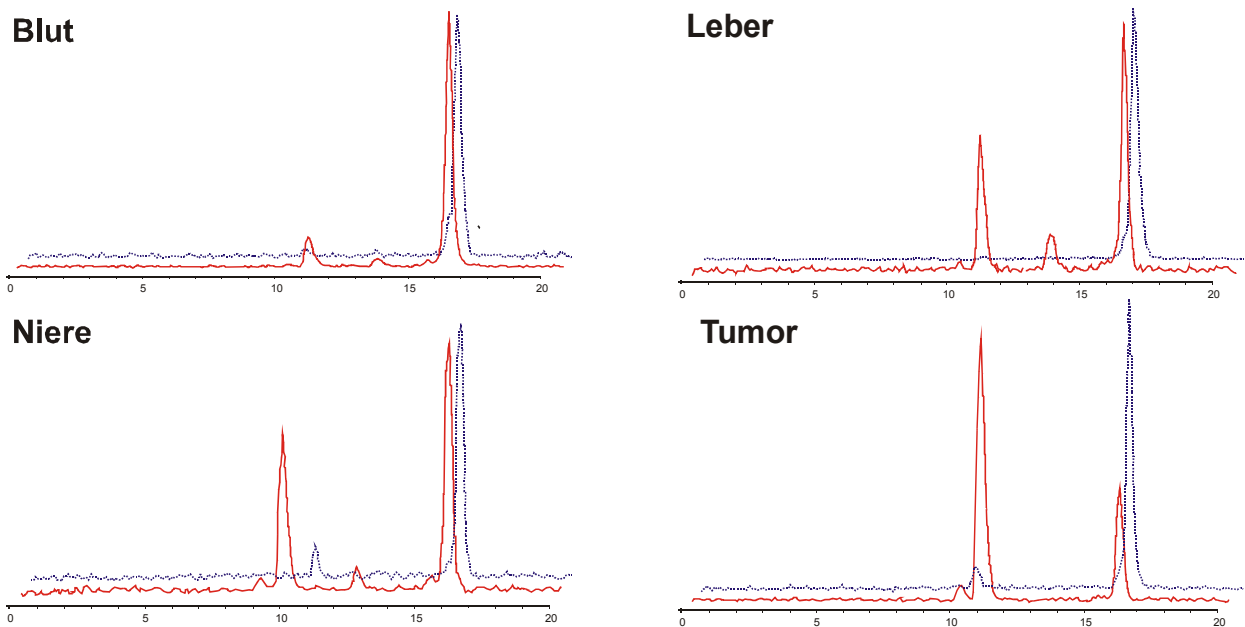


Abb. 5.18: Metabolitenanalyse von $M3^{18}F$ (blau gepunktet) und $T2^{18}F$ (rot) 60 min p.i. in Mäusen.

Weitere im Rahmen dieser Arbeit entstandene Verbindungen (**d**, **t2**) werden derzeit biologisch evaluiert. Hierdurch soll geklärt werden, ob die verbesserten Tumor/Organ-Verhältnisse der tetrameren Verbindung **T2**^{18F} auf einer entropischen Bindungsverstärkung (= Chelateffekt; Abb. 5.1a), einem kooperativen Effekt (Rezeptorclustering; Abb. 5.1b), einer erhöhten Konzentration von Bindungsepitopen in der Rezeptorumgebung (Abb. 5.1d), einer veränderten Endocytose des Tetramers^[306-308] oder auf einem durch das PEG-reiche Gerüst veränderten pharmakokinetischen Profil^[243, 309-314] beruhen. Die Herstellung von Multimeren mit längeren *Spacern* (**D3**, **T4**) ermöglicht die simultane Bindungsbildung zwischen Ligand und mehreren Rezeptoren durch längere Abstände der Bindungsepitope. Außerdem wurde die Möglichkeit einer weiteren Steigerung der *Tracerakkumulation* im Tumorgewebe durch Synthese oktamerer RGD-Peptide (**O1**, **O2**) und somit einer größeren Anzahl an Bindungsepitopen pro Ligand geschaffen.

In einer zusätzlichen *in vivo*-Studie wurden die RGD-Multimere bezüglich ihrer potentiellen Anwendbarkeit in SPECT evaluiert. Als Radionuklid wurde ¹²⁵I gewählt, da dieses Iodisotop eine Halbwertszeit von ca. 60 Tagen besitzt und somit leichter handhabbar ist. In ersten Biodistributions-Studien wurden **M3S** und **T2S** verwendet, um ein monovalentes mit einem tetravalenten RGD-Peptid bei gleicher *Spacereinheit* (jeweils eine Hexas-Aminosäure pro Verzweigungsarm) vergleichend betrachten zu können. Die Verbindungen wurden mit radioaktivem ¹²⁵I nach der IodoGen[®]-Methode^[190] markiert. Hierfür wurden die Verbindungen jeweils in 330 µL eines Phosphatpuffers (pH 7.4) gelöst und in mit 150 µg IodoGen[®] beschichtete Eppendorf-*Caps* überführt und 5 - 10 µL n.c.a. (*no-carrier-added*) [¹²⁵I]Natriumiodid (30 – 40 MBq) zugegeben. Mittels HPLC wurden die radioaktiv markierten Verbindungen **M3**^{125I} und **T2**^{125I} isoliert. Die biologischen Daten der Biodistributionsstudien sind im Anhang (Abb. 10.7 bis Abb. 10.10) aufgeführt, da diese bereits in der Dissertation von U. Hesel näher betrachtet^[279] wurden und mit den Daten der ¹⁸F-markierten Verbindungen eine vergleichbare Aussage liefern.

Die tetramere Verbindung **T2** zeigt bessere Biodistributionsdaten als das von *Bristol-Myers Squibb* beschriebene RGD-Dimer^[215, 216, 224, 225] (**18**, Abb. 5.19), welches die bislang einzige multivalente Verbindung darstellte. Darüber hinaus besitzt **T2** ein größeres Potential für das *Imaging* von $\alpha\beta3$ -positiven Tumoren als die bisher aussichtsreichste Substanz, das [^{18}F]Galacto-RGD^[205] (**19**, Abb. 5.19). **T2** bietet somit eine vielversprechende Möglichkeit der nicht-invasiven, kontrastreichen Bildgebung mittels SPECT (^{123}I) und vor allem PET (^{18}F). Da die Expression des $\alpha\beta3$ -Integrinrezeptors eine wichtige Rolle in der Bestimmung von Wachstumsgeschwindigkeit und Metastasenbildung von malignen Tumoren in experimentellen Tumormodellen sowie in Patientenstudien zukünftig spielen könnte,^[9, 207] bietet die nicht-invasive Darstellung der $\alpha\beta3$ -Integrinexpression mittels **T2** ^{18}F und PET einen einzigartigen Weg der Charakterisierung der biologischen Aggressivität eines malignen Tumors.

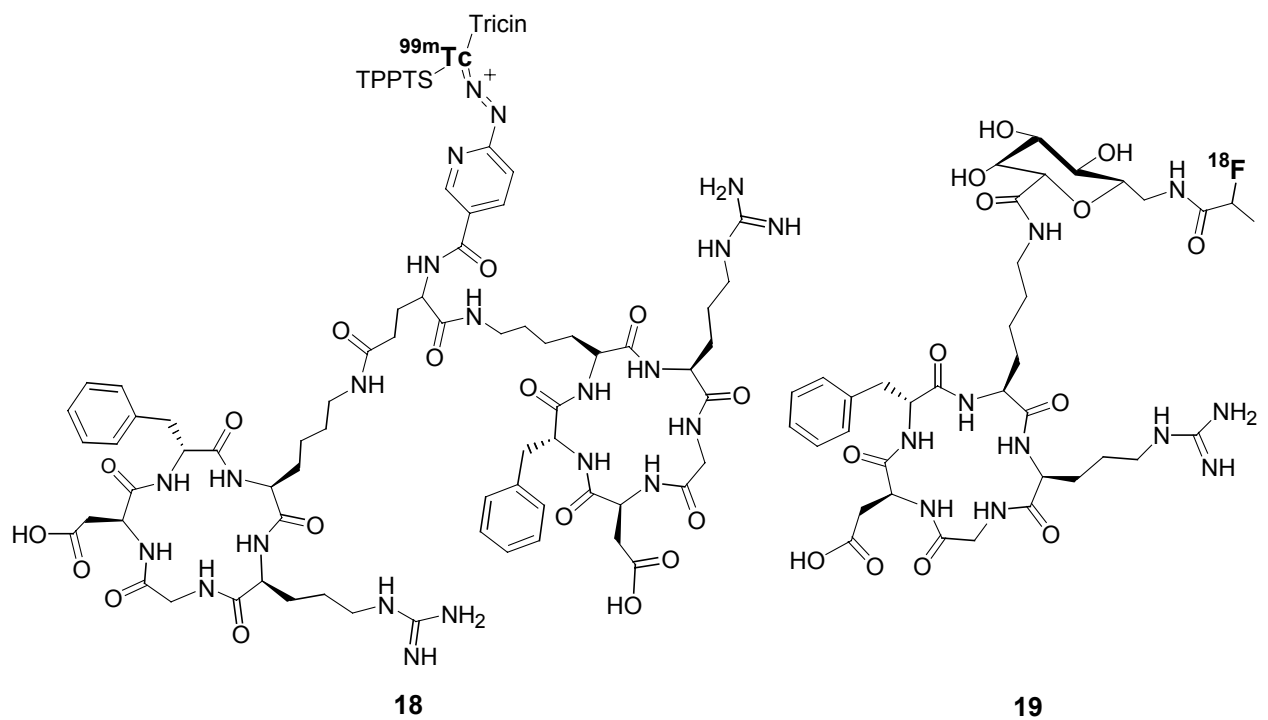


Abb. 5.19: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[c-(RGDfK-)]₂ **18** mit TPPTS: Trinatriumtriphenylphosphin-3,3',3''-trisulfonat; Tricin; N-Tris(hydroxymethyl)-methylglycin von *Bristol-Myers Squibb*^[215, 216, 224, 225] und 2-[^{18}F]Fluorpropionyl-SAA-c-(RGDfK-) **19** von *Haubner et al.*^[205].

6 RGD-MIMETIKA FÜR DIE TUMORDIAGNOSTIK

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den in Kapitel 5 beschriebenen multimeren peptidischen $\alpha\beta3$ -Integrinliganden auch nicht-peptidische $\alpha\beta3$ -Integrinliganden entwickelt, die eine Anwendung im Tumor-*Imaging* mittels PET finden können. RGD-Mimetika sind aufgrund ihrer auf ein Minimum reduzierten Struktur durch wenige Syntheseschritte, auch in Lösung, aus z.T. sehr einfachen Bausteinen zugänglich. Sie stellen, wirtschaftlich betrachtet, eine Alternative zu RGD-Peptiden dar.

Die Testung der Integrinaffinität der hergestellten Substanzen wurde von der Firma *Merck KGaA*, Darmstadt, im Labor von Dr. S. L. Goodman in isolierten Rezeptorassays durchgeführt. Die radioaktive Markierung und die Untersuchung der Verbindungen bezüglich ihrer Anwendbarkeit in PET erfolgte von Dr. R. Haubner in der Arbeitsgruppe Radiochemie/Radiopharmakologie (Dr. H.-J. Wester) der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik der TUM (Prof. M. Schwaiger).

6.1 Allgemeine Synthesestrategie

Ausgehend von der linearen Tripeptidsequenz RGD konnte C. Gibson in unserer Arbeitsgruppe die lineare Leitstruktur **20** identifizieren,^[315, 316] welche von G. Sulyok für die Anwendung in SPECT zugänglich gemacht wurde (Abb. 6.2).^[18, 217] Das [¹²³I]RGD-Mimetikum **21**¹²³I, in der Literatur als [¹²³I]GBHO-1 beschrieben, zeigt eine selektive Anreicherung in $\alpha\beta3$ -positivem Tumorgewebe (Kapitel 4.3). Jedoch wurde bisher die $\alpha\beta3$ -Integrinaffinität nicht in einem Bindungsassay mit isolierten Integrinrezeptoren evaluiert. Hierfür wurde im Rahmen dieser Arbeit das entsprechende nicht radioaktiv markierte Iod-RGD-Mimetikum (**21I**) synthetisiert.

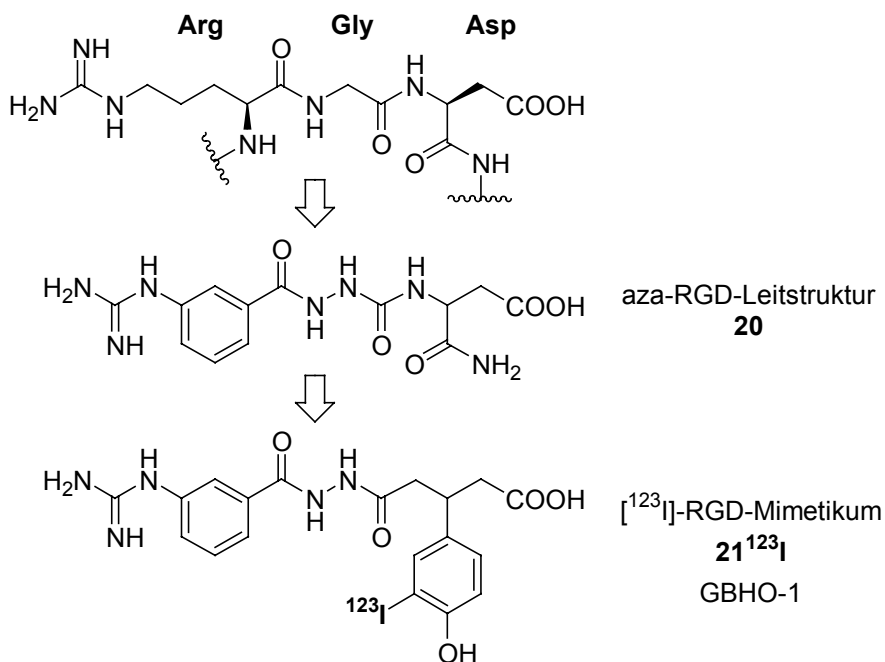


Abb. 6.1: Ausgehend von der linearen RGD-Sequenz wurde durch kombinatorische Festphasensynthese die Leitstruktur **20** identifiziert.^[315, 316] Substitution des C-terminalen Amids durch einen substituierten Phenylrest führte zur Verbesserung der Ligan­denaffinität und zu dem RGD-Mimetikum (**21¹²³I**) für den Einsatz in SPECT.^[18, 217]

Ergänzend zur Anwendung von **21¹²³I** in der nicht-invasiven Bildgebung mittels SPECT, wurde eine Möglichkeit der ¹⁸F-Markierung von RGD-Mimetika des Diacylhydrazintyps zum Einsatz in PET entwickelt. Die von Ogawa *et al.*^[203] beschriebene Methode der ¹⁸F-Markierung von *c*(-RGDf[NMe]V-) mittels elektrophiler aromatischer Substitution war nicht geeignet, da hierbei mono- und difluorierte Verbindungen entstehen würden. Die radioaktive Markierung sollte jedoch definiert und nur mit einem Radioisotop pro Verbindung erfolgen, weshalb der Vorteil einer ¹⁸F-markierten prosthetischen Gruppe ausgenutzt wurde.

Die minimierte Struktur bietet jedoch wenige Möglichkeiten eine zusätzliche Aminogruppe als Koordinationsstelle für die prosthetische ¹⁸F-Gruppe einzuführen, ohne dass dabei die $\alpha\beta$ 3-Integrin­affinität oder -selektivität beeinträchtigt wird. Bereits eine Methylierung des aza-Glycins führt zu einem Verlust der Integrin­affinität.^[315] Da terminale Base und Säure für die Rezeptorwechselwirkung ebenso essentiell sind wie deren Abstand voneinander (Kapitel 2.4), bieten sich nur die aromatischen Bausteine zur Funktionalisierung an. Die ¹⁸F-markierte prosthetische

Gruppe 4- ^{18}F Fluorbenzoesäure-*N*-succinimidester (^{18}F SFB) beinhaltet bereits einen aromatisches System und kann den Aromaten der *C*-terminalen Säure ersetzen. Somit musste lediglich eine Aminogruppe in β -Stellung der Carboxylatfunktion eingeführt werden (Abb. 6.2). Der Austausch des *Spacer*aromaten durch einen aminofunktionalisierten aliphatischen Baustein würde zu sehr flexiblen und damit nicht affinen $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrinliganden führen.

Auch die Funktionalisierung eines RGD-Mimetikums über eine Aminooxygruppierung für die Konjugation mit 4- ^{18}F Fluorbenzaldehyd analog der in Kapitel 5.6 beschriebenen Markierung von multimeren RGD-Peptiden ist aufgrund der schnellen und effizienten Markierungsmethode von großem Vorteil. Das resultierende Mimetikum **22** ist in Abb. 6.2 dargestellt.

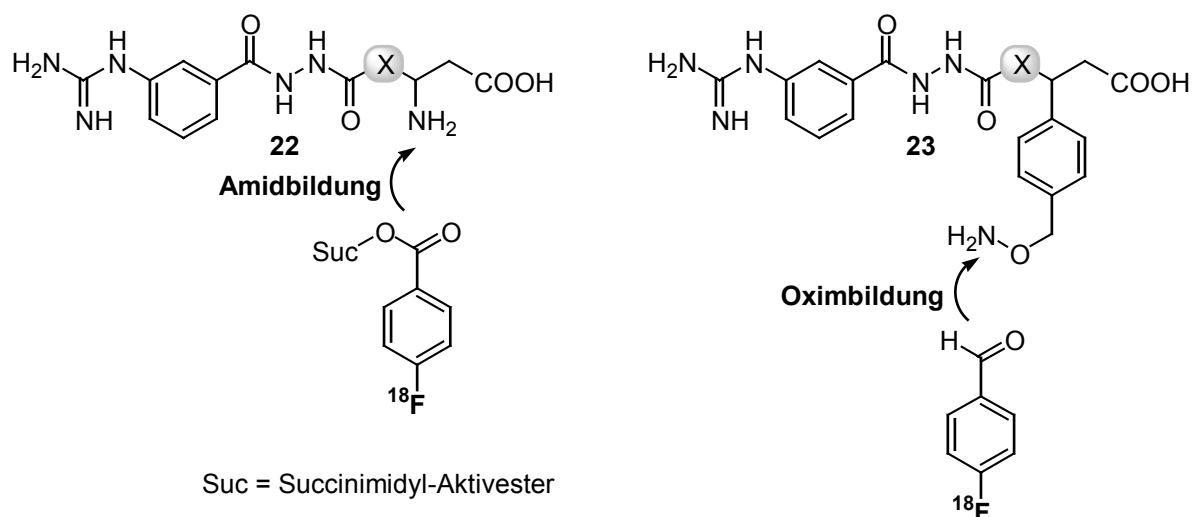


Abb. 6.2: Zwei verschiedene Möglichkeiten der ^{18}F -Markierung von RGD-Mimetika **22** ($X = \text{CH}_2$) und **23** ($X = \text{NH}$).

Eine Anbindung von Linkern an die aromatischen Bausteine unter Erhalt der Integrinaffinität wurde bereits beschrieben.^[317] Außerdem deuten von A. Meyer durchgeführte *Docking*studien am $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrin (Abb. 6.3),^[79, 318-320] darauf hin, dass das bei der Oximligation von **23** entstehende 4-Methyl-4'-fluorbenzaldehydoximderivat ebenfalls eine hohe Affinität zu dem $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrin besitzt. Bei den *Docking*-Studien wurde das analoge 4-Methylbenzaldehydoximderivat (ohne Fluor) verwendet. Der zusätzliche aromatische Ring am *C*-Terminus liegt nicht in der Bindungstasche, weshalb dieser und auch ein weiterer Fluor-Substituent in *p*-Position die $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrinaffinität nicht beeinflussen sollten. Die für die Bindung des Liganden an den

Rezeptor notwendigen Wechselwirkungen zwischen C-terminaler Carboxylatgruppe und MIDAS-Kalziumion, zwischen Guanidin-NH und dem Asp¹⁵⁰ der α -Untereinheit sowie dem π -Stacking zwischen dem aromatischen *Spacer* und der aromatischen Seitenkette des (α)-Tyr¹⁷⁸ konnten beobachtet werden.

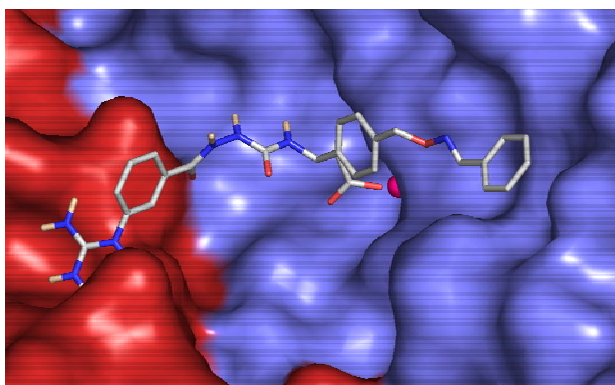
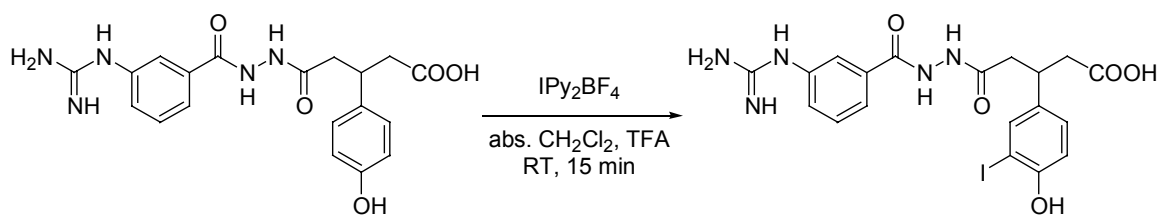


Abb. 6.3: Docking-Ergebnis des 4-Methylbenzaldehydoximderivates von **23** an die $\alpha\beta 3$ -Integrinbindungsregion.^[79, 318-320]

6.2 Synthese eines Iod-RGD-Mimetikums

Zur Überprüfung der Ligandenaffinität wurde die der Verbindung **21**¹²³I entsprechende nicht radioaktiv markierte Iodverbindung **21I** synthetisiert. Bei den meisten Iodierungsmethoden entstehen gewöhnlich Gemische aus unumgesetzten, mono- und diiodierten Substanzen.^[321-324] Als eleganteste Methode erschien die direkte elektrophile aromatische Iodierung der 4-Hydroxyverbindung in *ortho*-Stellung der phenolischen OH-Gruppe nach Barluenga *et al.* Hierbei dient kommerziell erhältliches Bis(pyridin)iodonium(I) Tetrafluoroborat (IPy₂BF₄) als ein bei Raumtemperatur selektiv monoiodierendes Reagenz.^[325-330] Das RGD-Mimetikum **21** konnte innerhalb von 15 min iodiert werden und ergab nach Isolierung die Iodverbindung **21I** (Schema 6.1) als kalte Referenzverbindung zu **21**¹²³I (Abb. 6.1).



Schema 6.1: Synthese des Iod-RGD-Mimetikums **21I**.

6.3 Synthese von RGD-Mimetika für PET

Die Synthese der zu markierenden Verbindungen sowie der jeweiligen nicht radioaktiv markierten Fluor-Verbindungen erfolgte an der Festphase. Sie wurden formal aus Säurebaustein **A**, aza-Glycinbaustein **B**, *Spacer*baustein **C** und Basenbaustein **D** (Abb. 6.4) nach der Fmoc-Strategie (Kapitel 5.2) am Harz aufgebaut. Die Variation der Gruppe **X** ergibt die beiden Säurebausteine **A**₁ (**X** = CH₂, Glutarsäure) und **A**₂ (**X** = NH, β-Aminosäure) entsprechend mit Hydrazin **B**₁ bzw. dem aza-Glycinbaustein **B**₂.

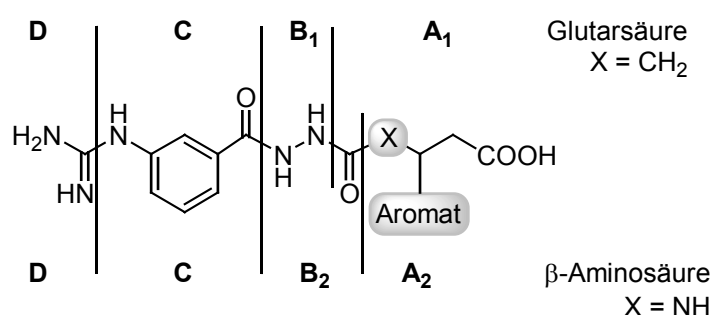


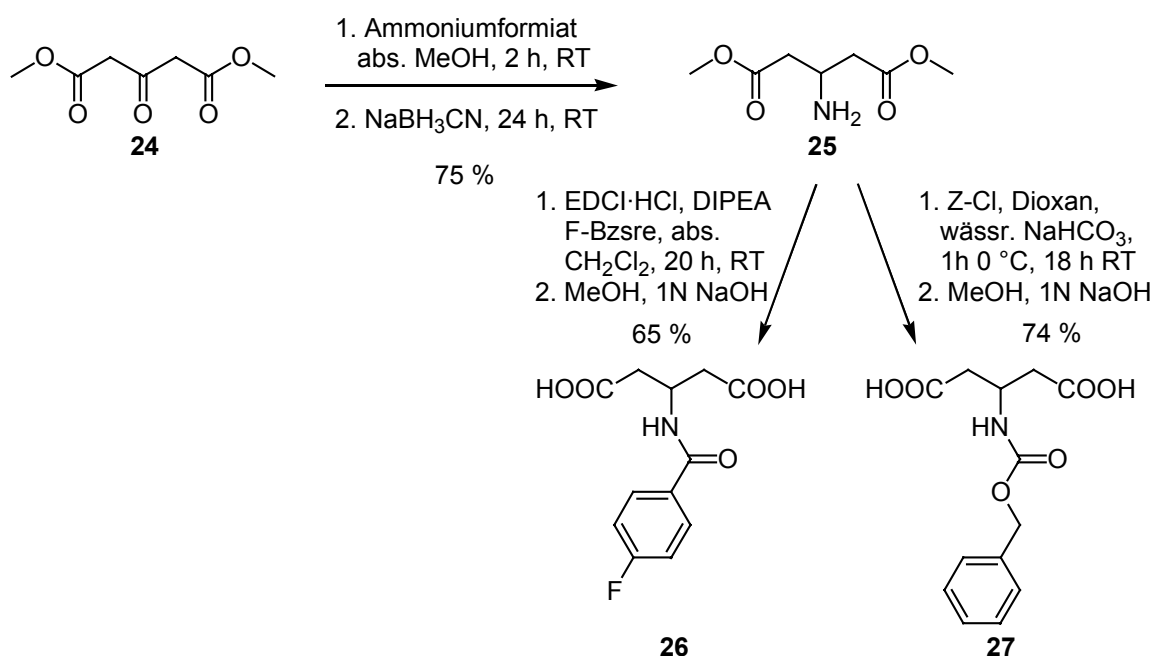
Abb. 6.4: Retrosynthetische Zerlegung der aza- ($X = NH$) und azacarba- ($X = CH_2$) RGD-Mimetika in Säurebaustein **A**, einen aza-Glycinbaustein **B**, einen *Spacer*baustein **C** und einen Basenbaustein **D**.

Die Synthesen des mit einer Aminogruppe bzw. mit einer Aminooxygruppe funktionalisierten RGD-Mimetikums sowie der entsprechenden nicht radioaktiven Fluorverbindungen als Referenz wird in den beiden folgenden Kapiteln beschrieben.

6.3.1 Synthese eines Amino-RGD-Mimetikums

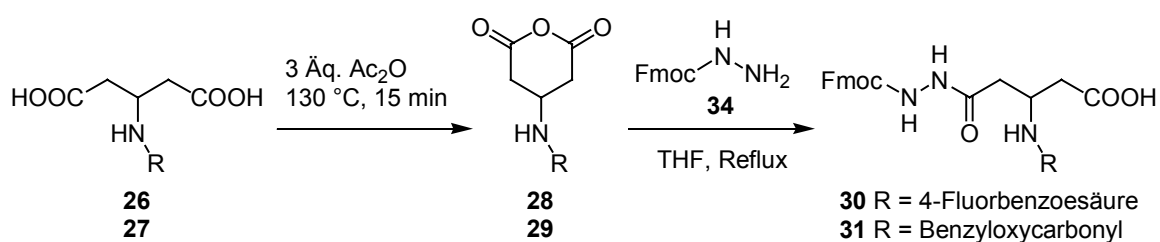
Das Amino-RGD-Mimetikum und die kalte Referenzverbindung wurden an der festen Phase am C-Terminus beginnend aufgebaut. Hierfür wurde zuerst der Säurebaustein **A**₁ hergestellt. Ausgehend von dem kommerziell erhältlichen 3-Oxoglutar säuredimethylester (**24**) konnte modifiziert nach Crossley *et al.* 3-Aminoglutarsäuredimethylester (**25**) in guter Ausbeute hergestellt werden (Schema 6.2).^[331] Eine vollständige Umsetzung des Edukts mit Ammoniumformiat zum Imin war wichtig, um eine Dimerisierung mit dem bei der anschließenden Reduktion entstandenen Amin zu vermeiden. Die resultierende Aminogruppe musste für den Einsatz in der

Festphasensynthese geschützt werden. Hierbei konnte die nicht radioaktiv markierte 4-Fluorbenzoesäure eingeführt werden, und der resultierende Säurebaustein **A₁** (**26**) in der Synthese der kalten Referenzverbindung eingesetzt werden. Für die Herstellung der radioaktiv markierbaren Verbindung musste in **25** eine säurestabile Schutzgruppe eingeführt werden, da für die Darstellung des Bausteins **A₁B₁** die Glutarsäure mittels Essigsäureanhydrid in das intramolekulare Anhydrid überführt werden musste (Schema 6.3). Als Schutzgruppe bietet sich die Benzyloxycarbonylgruppe (Z) an, welche hydrogenolytisch in Anwesenheit von Pd auf Aktivkohle als Katalysator abgespalten werden kann. Die Darstellung der Glutarsäurebausteine **26** und **27** (**A₁**) ist in Schema 6.2 gezeigt.



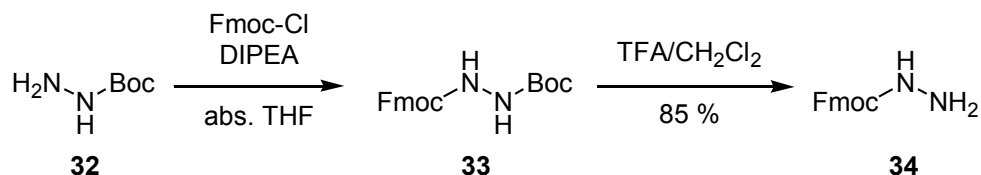
Schema 6.2: Synthese von 3-(4-Fluorbenzoylamino)-glutarsäure **26** und 3-Benzoyloxycarbonylamino glutarsäure **27** als Säurebausteine **A₁**; F-Bzsre = 4-Fluorbenzoesäure.

Der direkte Einbau von Glutarsäuren mit zwei freien Säuregruppen an der Festphase ist aufgrund von schlechten Ausbeuten durch Quervernetzung und den damit verbundenen Trennungsproblemen bei der Isolierung mittels HPLC nicht möglich.^[18] Deshalb wurden die Glutarsäuren vor dem Einsatz in SPPS mit Fmoc-Hydrazin (**34**) zu kombinierten Bausteinen **A₁B₁** umgesetzt (Schema 6.3).



Schema 6.3: Synthese der kombinierten Bausteine **30** und **31** (A_1B_1).

Das dabei verwendete Fmoc-Hydrazin **34** ließ sich sehr einfach durch Umschützen aus dem kommerziell verfügbaren Boc-Hydrazin herstellen (Schema 6.4).^[332] Im Gegensatz zur Umsetzung von Hydrazin mit Fmoc-Chlorid entstand bei dieser Vorgehensweise kein N,N' -Bis-Fmoc-Hydrazin, das mit zeit- und lösungsmittel-aufwändiger Flashchromatographie hätte abgetrennt werden müssen.



Schema 6.4: Synthese von Fmoc-Hydrazin (**34**) als Fmoc-geschützten aza-Glycinebaustein B_1 .

Die Bausteine **30** und **31** (A_1B_1) wurden an TCP-Harz immobilisiert. Anschließend wurde als Spacerbaustein C m -(N -Fmoc)-Aminobenzoesäure (**35**; Abb. 6.5) mittels HATU/Collidin an den vorangehenden entschützten Baustein gekuppelt.

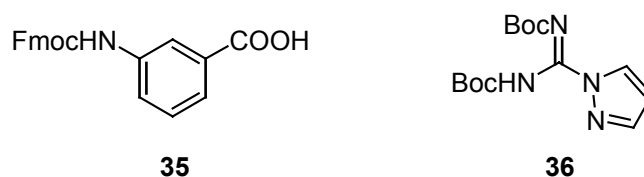


Abb. 6.5: Spacerbaustein m -(N -Fmoc)-Aminobenzoesäure **35** und Guanylierungsreagenz N,N' -Bis-Boc-1-guanylpiperazol **36**.

Die Base **D** wurde durch Guanylierung mit N,N' -Bis-Boc-1-guanylpiperazol^[333] (**36**; Abb. 6.5) eingeführt. Die Umsetzung am Harz erfolgte innerhalb von 20 h bei 50 °C mit einem 10-fachen Überschuss von **36** in trockenem Chloroform. Nicht umgesetztes Guanylierungsreagenz konnte durch Fällung aus Ethylacetat mit Hexan in ausreichend hoher Reinheit zurückgewonnen werden.

Die Abspaltung der Mimetika vom TCP-Harz erfolgte unter gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Boc-Schutzgruppen in 50 % TFA/DCM und TIPS-Zusatz und anschließender hydrogenolytischer Entfernung der Z-Schutzgruppe. Isolierung mittels HPLC ergab die nicht radioaktive fluorhaltige Referenzverbindung **22F** und die zu markierende Verbindung **22** (Abb. 6.6).

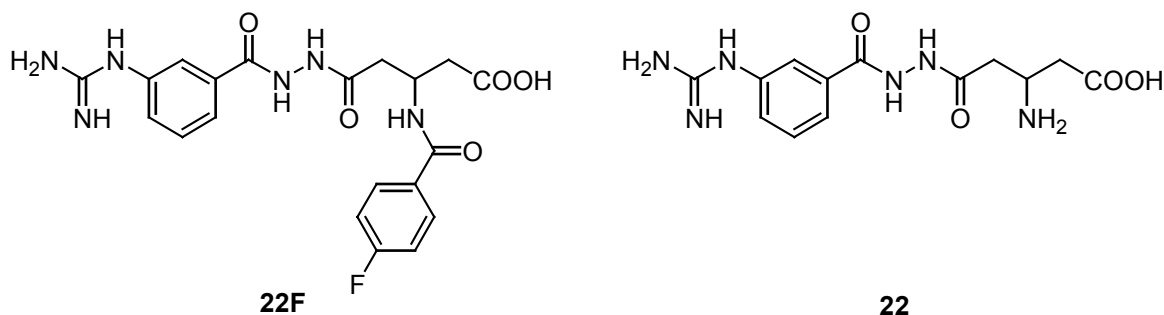
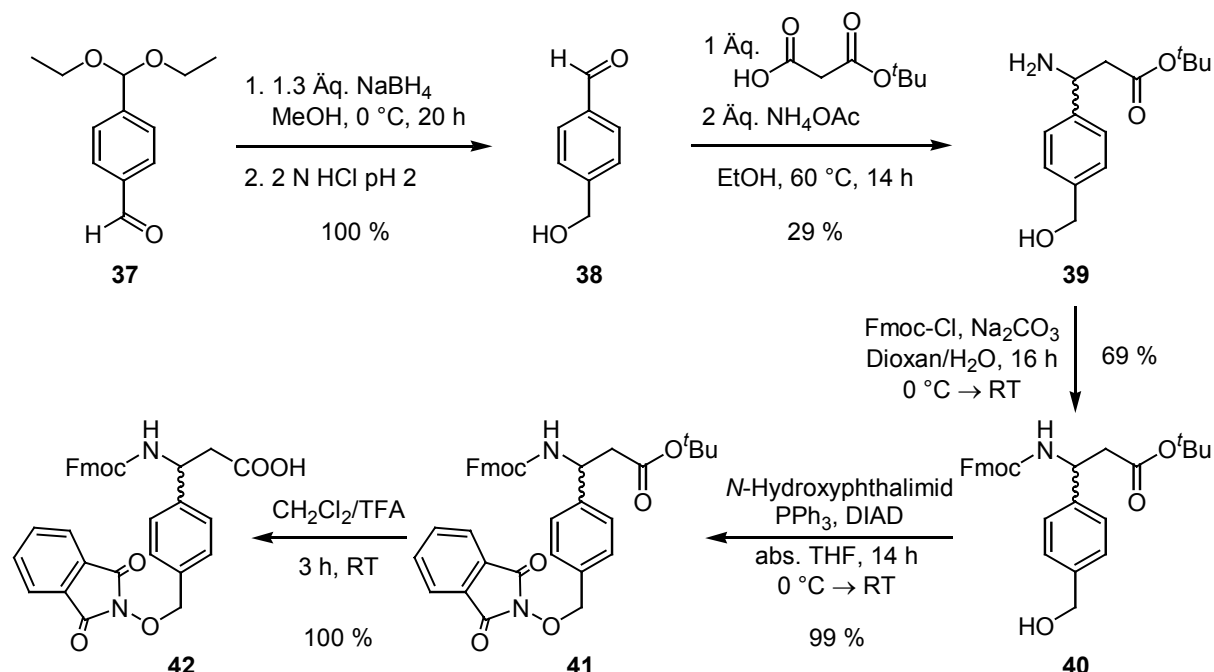


Abb. 6.6: Fluorhaltige Referenzverbindung **22F** und zur ^{18}F -Markierung mittels $[\text{}^{18}\text{F}]\text{SFB}$ befähigte Verbindung **22**.

6.3.2 Synthese eines Aminooxy-RGD-Mimetikums

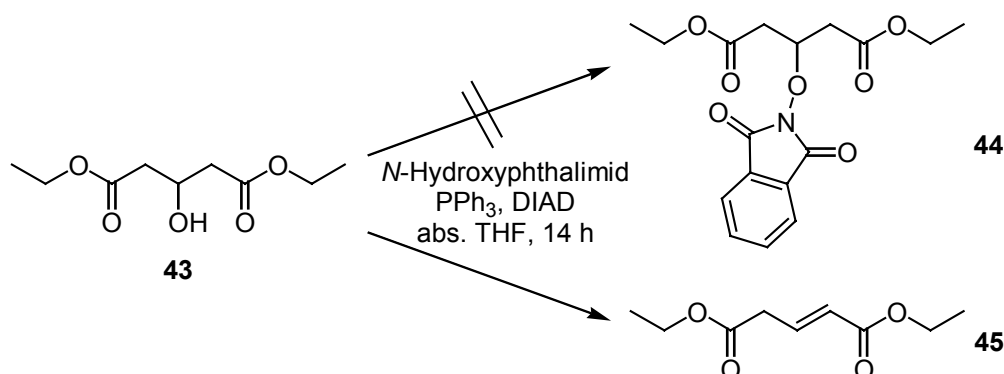
Die Funktionalisierung eines RGD-Mimetikums mit einer Aminooxygruppe für die Konjugation mit 4- $[\text{}^{18}\text{F}]$ Fluorbenzaldehyd analog der in Kapitel 5.6 beschriebenen Markierung von multimeren RGD-Peptiden ist aufgrund der schnellen und effizienten Markierungsmethode von großem Vorteil. Das Aminooxy-RGD-Mimetikums konnte an der Festphase ausgehend von dem Säurebaustein **A₂** durchgeführt werden. Die Synthese dieses Bausteines ging von dem kommerziell erhältlichen mono-diethylacetalgeschützten Terephthaldialdehyd **37** aus. Dieser konnte in sehr guten Ausbeuten durch Reduktion mit Natriumborhydrid^[334] zu dem Hydroxymethylbenzaldehyd **38** umgesetzt werden. Das Acetal wurde bei der sauren Aufarbeitung gespalten und der Aldehyd freigesetzt. Dieser wurde mit Malonsäure-mono-*tert*-butylester und Ammoniumacetat in Ethanol zu der racemischen β -Aminosäure **39** umgesetzt. Nach dem Einführen der Fmoc-Schutzgruppe wurde in einer Mitsunobu-Reaktion die Hydroxygruppe mit *N*-Hydroxyphthalimid maskiert, woraus durch Hydrazinolyse die Aminooxygruppe generiert werden kann. Schließlich wurde der *tert*-Butylester **41** sauer gespalten und man erhielt die racemische 3-(*N*-Fmoc)-Amino-

3-(4-phthalimidoxymethylphenyl)-propionsäure (**42**), welche als Säurebaustein **A₂** in der Festphasensynthese eingesetzt wurde.



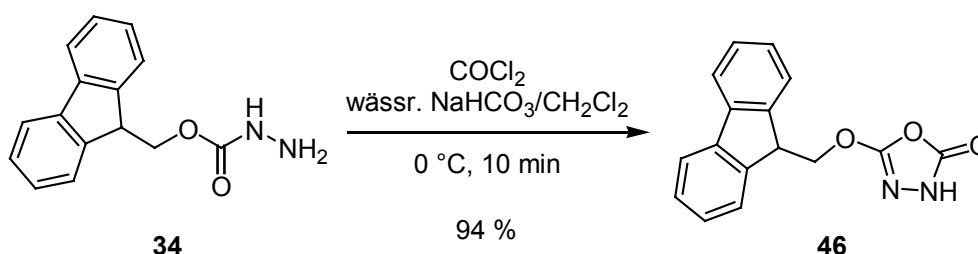
Schema 6.5: Synthese von *N*-Fmoc-geschützter 3-Amino-3-(4-phthalimidoxymethylphenyl)-propionsäure **42**.

Die Synthese einer zum Amino-RGD-Mimetikum **22** analogen Aminoxyverbindung gelingt nicht. Untersuchungen zeigten, dass bei der Reaktion von 3-Hydroxyglutarsäurediethylester (**43**) mit *N*-Hydroxyphthalimid unter Mitsunobu-Bedingungen nicht der benötigte Ester **44** (Vorläufer von Säurebaustein **A₂**), sondern die ungesättigte Verbindung **45** entsteht (Schema 6.6).^[335]



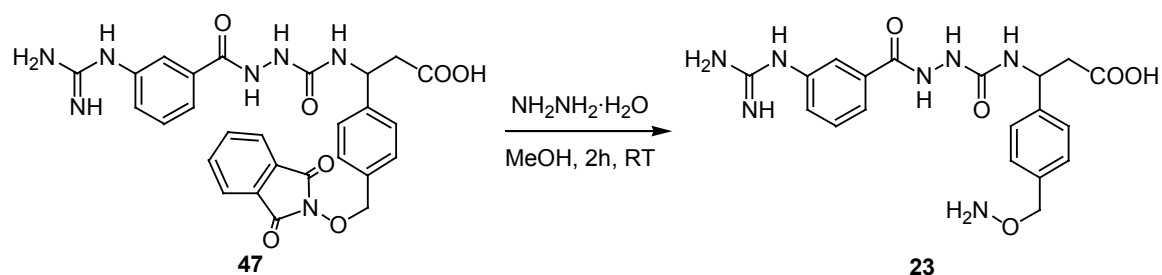
Schema 6.6: Reaktion von 3-Hydroxyglutarsäurediethylester **43** unter Mitsunobu-Bedingungen.

Die Umsetzung der Aminosäure **42** (**A₂**) mit dem aza-Glycinbaustein **B₂** erfolgte am Harz unter Verwendung des hoch reaktiven 5-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)-3*H*-[1,3,4]oxadiazol-2-on (**46**), das sich aus Fmoc-Hydrazin (**34**) und Phosgen in guten Ausbeuten herstellen lässt (Schema 6.7).^[336] Dazu wurde **34** in einer 1:1-Mischung aus CH₂Cl₂ und wässriger NaHCO₃-Lösung suspendiert und anschließend bei 0 °C mit einem dreifachen Überschuss an Phosgen (1.9 M in Toluol) versetzt. Das zunächst entstandene Hydrazincarbonylchlorid reagiert in einer intramolekularen Zyklisierung sofort zum 5-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)-3*H*-[1,3,4]oxadiazol-2-on^[337] (**45**) und wurde nach der Isolierung ohne weitere Aktivierung an die festphasengebundene β-Aminosäure mit freiem *N*-Terminus gekuppelt.



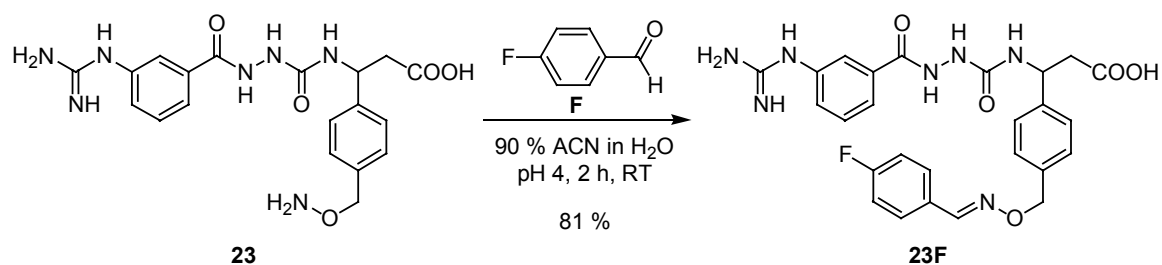
Schema 6.7: *Synthese des aktivierten aza-Glycinbausteins B₂ 5-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)-3*H*-[1,3,4]-oxadiazol-2-on (**46**).*

Anschließende Kupplung mit *m*-(*N*-Fmoc)-Aminobenzoesäure (**35**, Abb. 6.5), Guanylierung und Abspaltung vom Harz analog der Synthese des Amino-RGD-Mimetikums (Kapitel 6.3.1) ergab Verbindung **47** (Schema 6.8) in einer Rohausbeute von 84 %. Die folgende Abspaltung der Phthaloylgruppe mit Hydrazinhydrat in Methanol und HPLC-Reinigung führte zu dem RGD-Mimetikum **23** in einer Gesamtausbeute von 30 % (Schema 6.8). Sobald die Aminoxygruppe entschützt ist, wird die Verwendung von sehr reinen Lösemitteln (HPLC-Qualität) nötig. Wie bereits in Kapitel 5.5 beschrieben, ist die Aminoxygruppe bzgl. Aldehyden sehr reaktiv und reagiert z.B. bereits mit geringen Spuren Formaldehyd, welche in herkömmlichem Methanol enthalten sind.



Schema 6.8: *Synthese des Aminoxy-RGD-Mimetikums 23.*

Die nicht radioaktiv markierte fluorhaltige Referenzverbindung **23F** wurde durch chemoselektive Oximligation analog der in Kapitel 5.5 beschriebenen Methode hergestellt (Schema 6.9). Auch hier wurde die Verbindung nach mehrmaligem Waschen mit Diethylether in sehr hoher Reinheit (> 99 %) erhalten.



Schema 6.9: *Synthese der nicht radioaktiv markierten Referenzverbindung 23F aus dem Aminoxy-RGD-Mimetikum 23.*

6.4 Biologische Evaluation der RGD-Mimetika für PET

Das nicht konjugierte Aminoxy-RGD-Mimetikum **23** sowie die nicht radioaktiv markierten Referenzverbindungen **21I**, **22F** und **23F** wurden auf ihre Integrinaffinität und -selektivität hin untersucht (Tab. 6.1).

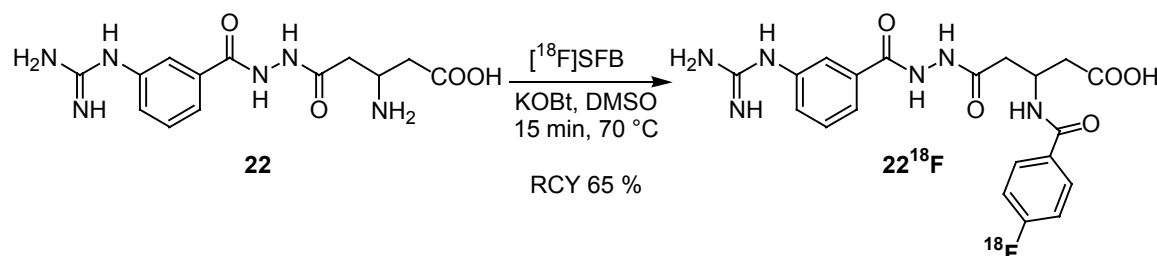
Tab. 6.1: *Inhibierungsverhalten der RGD-Mimetika im isolierten Rezeptorassay. Der IC_{50} -Wert wurde ab einer Inhibierung von 50 % bei einer Peptidkonzentration von 100 nM austitriert bzw. in Peptidkonzentration und Prozent der Inhibierung angegeben.*

Verb.	Integrin, IC_{50} [nM]			
	$\alpha v \beta 3$	$\alpha v \beta 5$	$\alpha v \beta 6$	$\alpha II b \beta 3$
21I	0.75	2900	9.1	10^4 , 77 %
22F	8.2	10^4 , 35 %	50	10^4 , 94 %
23	5.5	10^3 , 50 %	3.2	10^4 , 43 %
23F	2.1	10^3 , 73 %	0.14	10^4 , 71 %

Die $\alpha v \beta 3$ -Integrinaffinität von **21I** liegt wie erwartet im nanomolaren Bereich, was die von Haubner *et al.* beschriebene bildliche Darstellung von $\alpha v \beta 3$ -positiven Tumorgeweben mittels **21**¹²³I unterstreicht (Kapitel 4.3).^[18, 217] Auch die Affinität der Fluor-RGD-Mimetika ist sehr hoch, weshalb das radioaktive Analogon von **22F** auf ihre Anwendbarkeit im Imaging von $\alpha v \beta 3$ -exprimierenden Tumoren weiter untersucht wurde. Aufgrund der hoch affinen Verbindung **23F** wurden RGD-Mimetika für den Einsatz in der sehr schnellen und effizienten Strategie zur ¹⁸F-Markierung mittels Oximligation von **23** und *p*-[¹⁸F]Fluorbenzaldehyd zugänglich gemacht.

Die Radiomarkierung sowie die *in vivo*-Studien wurden von Dr. R. Haubner in der Nuklearmedizin durchgeführt. Die prosthetische Gruppe [¹⁸F]SFB wurde über eine nukleophile aromatische Substitution von „Trimethylamin“ durch ¹⁸F⁻ in 4-*N,N,N*-Trimethylammoniumbenzoesäureethylester Triflat, alkalischer Hydrolyse und Aktivierung mit *O*-(*N*-Succinimidyl)-tetramethyluroniumtetrafluoroborat^[201] in 35 min und einer radiochemischen Ausbeute von 55 ± 10 % hergestellt. Die Umsetzung mit **22**

erfolgte in DMSO unter Zusatz von KOBt bei 70 °C innerhalb von 15 min. Die radiochemische Ausbeute nach der Isolierung mittels HPLC betrug ca. 65 %.^[206] Es resultierte ^{22}F , wobei dieses analog seinem ^{123}I -markierten Vorläufer [^{123}I]GBHO-1 auch als [^{18}F]GBHO-2 bezeichnet wird.



Schema 6.10: Synthese des radioaktiv markierten RGD-Mimetikums ^{22}F ($[\text{F}^{18}\text{GBHO-2}]$).

Für die Untersuchung der Biodistribution von ^{22}F in Mäusen wurden wieder tumortragende Nacktmäuse (M21 und M21-L Melanome) verwendet. Während die Zelllinie M21 den $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrinrezeptor stark exprimiert,^[190, 305] dient M21-L aufgrund ihrer schwachen $\alpha\text{v}\beta 3$ -Expression als Negativkontrolle.^[305] Die stark $\alpha\text{v}\beta 3$ -exprimierende Zelllinie M21 wird im Folgenden als Tumor(gewebe) bezeichnet. Die Verabreichung von 0.4 MBq ^{22}F erfolgte intravenös in die Schwanzvene der Maus in Gruppen mit jeweils vier Mäusen. Die Tiere wurden 10, 60 bzw. 120 min nach der Injektion (*post injection, p.i.*) getötet, sezirt und der **prozentuale** Anteil der injizierten Dosis (Radioaktivität) normiert auf **ein Gramm** des Organs (% ID/g) bestimmt. Die Tumor/Organ-Verhältnisse wurden aus dem Quotienten der Aktivitätsanreicherung im M21 Melanom und der Radioaktivitätskonzentration in den Organen berechnet. Die Spezifität der Akkumulation der Radioaktivität im Tumorgewebe wurde in Blockadestudien 60 min *p.i.* durch die Verabreichung von 18 mg *c*(-RGDfV-)/kg Maus 10 min vor der *Tracergabe* gezeigt.

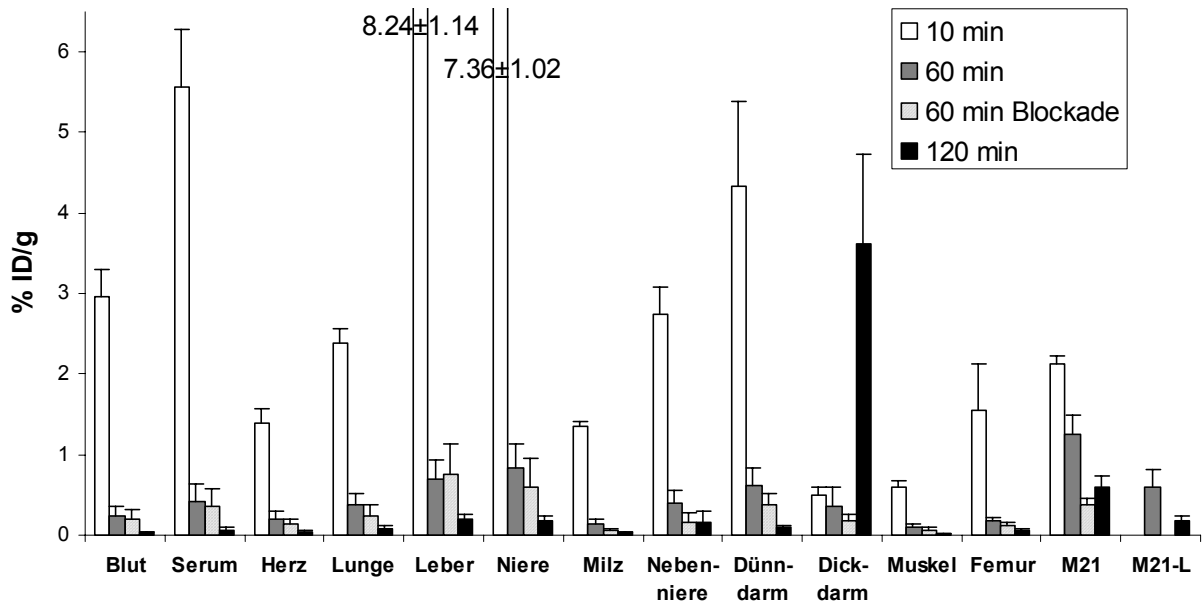


Abb. 6.7: Biodistribution von ^{22}F 10, 60 und 120 min *p.i.* und Blockadeexperiment 60 min *p.i.* Die Daten für M21-L wurden nur 60 und 120 min *p.i.* bestimmt.

In Abb. 6.7 sind die Biodistributionsdaten 10, 60 und 120 min nach der Injektion sowie die Ergebnisse des Blockadeexperimentes 60 min *p.i.* dargestellt. Die Anreicherung von ^{22}F beträgt im Tumor 120 min *p.i.* 0.61 ± 0.13 % ID/g. Es erfolgt eine rasche Eliminierung aus Blut (0.03 ± 0.01 % ID/g), Muskel (0.02 ± 0.01 % ID/g) und anderen Organen (Niere 0.18 ± 0.06 % ID/g, Leber 0.20 ± 0.05 % ID/g) während die Aufnahme im Darm mit 3.61 ± 1.12 % ID/g relativ hoch ist. Dennoch kommt es 120 min *p.i.* zu sehr guten Tumor/Organ-Verhältnissen (Tumor/Blut 18.2, Tumor/Muskel 35.6; Abb. 6.8). Blockadeexperimente, bei denen 18 mg *c*(-RGDfV-)/kg Maus 10 min vor Injektion des Tracers intravenös verabreicht wurden, zeigen die Spezifität der Anreicherung des radioaktiv markierten Mimetikums ^{22}F im Tumorgewebe durch Reduktion der Aktivitätskonzentration im M21 Melanom 60 min *p.i.* auf 30 %.

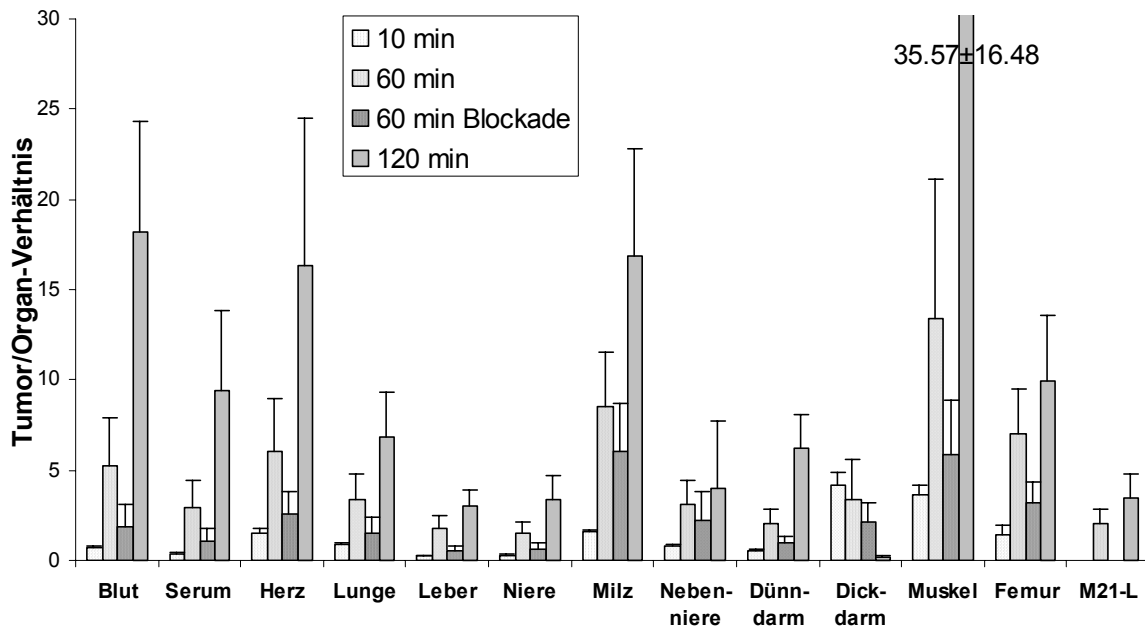


Abb. 6.8: Tumor/Organ-Verhältnisse von ^{22}F 10, 60, 60 Blockade und 120 min p.i.

In Abb. 6.9 sind PET-Aufnahmen von Mäusen, die auf der rechten Seite ein M21 Melanom ($\alpha\text{v}\beta 3$ -positiv) und auf der linken Seite ein M21-L Melanom (Negativkontrolle) tragen, dargestellt. Die rechte Maus zeigt aufgrund der guten Tumor/Hintergrund-Verhältnisse ein kontrastreiches Bild des $\alpha\text{v}\beta 3$ -exprimierenden Tumorgewebes (rechts). Mit der linken Maus wurde eine Blockadestudie durchgeführt. Aufgrund der viel geringeren Akkumulation von ^{22}F im Tumor nach Sättigung der Rezeptoren durch $c(\text{-RGDfV-})$ wird die Spezifität der Anreicherung visualisiert. Die nicht-invasive quantitative Bestimmung der $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrinexpression durch PET wurde somit durch das Design und die Synthese des radioaktiv markierbaren RGD-Mimetikums **22** ermöglicht.

Der Kontrast in den PET-Aufnahmen der tetrameren Verbindung **T2¹⁸F** (Kapitel 5.6) in Mäusen ist verglichen mit den in Abb. 6.9 gezeigten PET-Aufnahmen des Mimetikums **22¹⁸F** etwas besser, jedoch ist die Herstellung des Mimetikums **22** für die Radiomarkierung viel einfacher und schneller. Durch die Synthese des aminoxyfunktionalisierten RGD-Mimetikums **23** kann zusätzlich noch die vorteilhafte Methode der ^{18}F -Markierung durch Oximligation ausgenutzt werden.

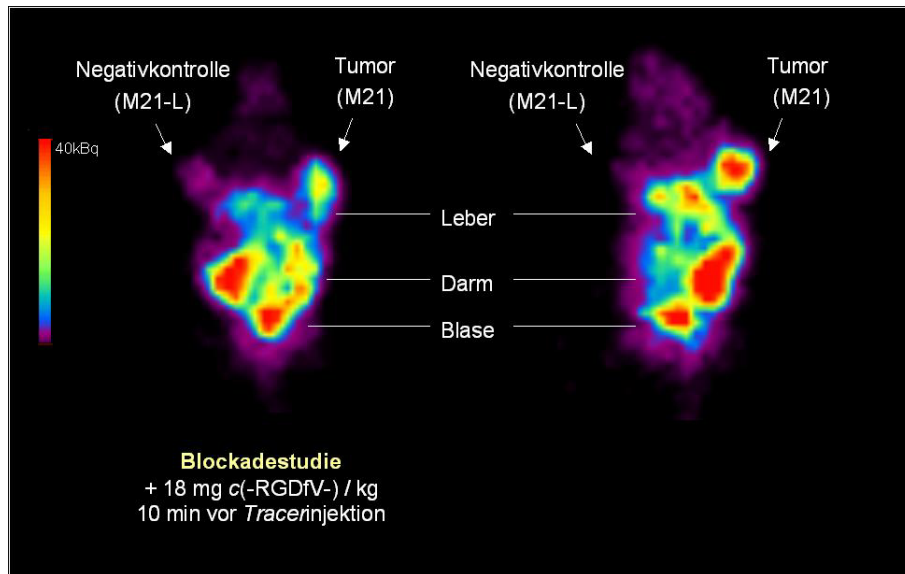


Abb. 6.9: PET-Aufnahmen von ^{22}F 90 min p.i. in Mäusen.

Darüber hinaus wurden durch die Aminoxygruppe von **23** multivalente RGD-Mimetika zugänglich gemacht. Durch Anknüpfung an aldehydfunktionalisierte multivalente Strukturen könnten multimere RGD-Mimetika generiert werden.

7 RGD-MIMETIKA FÜR DIE TUMORTHERAPIE

Neben den in Kapitel 6 beschriebenen nicht-peptidischen, radioaktiv markierbaren RGD-Mimetika wurden im Rahmen dieser Arbeit auch nicht-peptidische RGD-Mimetika für den Einsatz in der Tumorthherapie synthetisiert. Durch Strukturvariationen sollen die orale Bioverfügbarkeit beeinflusst und eine hohe $\alpha\beta3$ -Integrinaffinität und -selektivität erhalten werden.

Die Integrinaffinität und -selektivität der hergestellten Verbindungen wurde im Labor von Dr. S. L. Goodman bei der Firma *Merck KGaA*, Darmstadt bestimmt. Untersuchungen zur Pharmakokinetik erfolgten bei der Firma *Merck KGaA* in Grafing und die Reduktionsstudie des *Prodrugs* am Pharmazeutischen Institut der Universität Kiel unter der Leitung von Prof. B. Clement.

7.1 Allgemeine Synthesestrategie

In den letzten Jahren wurde in der Literatur eine enorme Zahl nicht-peptidischer $\alpha\beta3$ -Integrinliganden mit hoher Rezeptoraffinität und meist biselektivem Charakter ($\alpha\beta3/\alpha\beta5$ bzw. $\alpha\beta3/\alpha\beta6$) beschrieben.^[10, 17, 19-23, 316, 338, 339] Als essentielle pharmakophore Gruppen wurden eine C-terminale Säurefunktion und eine N-terminale basische Gruppe identifiziert (siehe Kapitel 2.4), welche durch eine Vielzahl, meist zyklischer Grundgerüste (*Scaffolds*) verknüpft wurden: Harnstoffe,^[340] Benzodiazepine,^[133, 276, 341-343] Benzocycloheptene,^[344] Piperazine,^[340] Purine,^[345] Aryl-ether,^[346-348] Isoxazoline,^[349, 350] Indazole,^[351, 352] Hydantoine,^[353] Thiophene,^[354, 355] Biphenyle,^[356, 357] versteifte Glycylamide,^[358] sowie eine große Zahl anderer, in der Patentliteratur beschriebener^[22] *Scaffolds*. Basierend auf der in Kapitel 6.1 beschriebenen Leitstruktur **20** wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Bibliothek nicht-peptischer $\alpha\beta3$ -Integrinliganden synthetisiert, die neben dem Einsatz für die Tumordiagnostik (Kapitel 6.1) auch in Hinblick auf Affinität und oraler Bioverfügbarkeit verbessert wurde.^[17, 18, 99] Einen großen Effekt brachte die Erhöhung der Lipophilie am C-Terminus infolge des Einbaus aromatischer β -Aminosäuren und bioisosterer Glutarsäuren als Asp-Mimetika. Außerdem wurden Basen- und *Spacer*bausteine als

Argininmimetika variiert. Dies führte zu dem verbesserten Liganden **48** (Abb. 7.1). Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Basenbausteine als Guanidinmimetika eingebaut, um ihren Einfluss auf die Bioverfügbarkeit zu untersuchen. Außerdem sollte ein isosterer Ersatz der mittleren Carbonylgruppe durch ein Sulfon zu einer höheren proteolytischen Stabilität führen.^[359] Eine weitere interessante Modifikation ist die C-terminale Versteifung des Rückgrates (*Backbones*) durch den Einbau zyklischer Verbindungen. Da der Einbau der zyklischen Carbonsäure Nipecotinsäure zu einem Aktivitätsverlust führte,^[18] wurde vermutet, dass dies auf den fehlenden aromatischen Rest und die eingeschränkte Drehbarkeit der Säuregruppe zurückzuführen ist. Benzodiazepine^[360] und andere Verbindungen^[342, 344], welche einen aromatischen Rest und eine zusätzliche Methyleneinheit zwischen dem sieben-gliedrigen Ring und der Carboxygruppe aufweisen, stellen potente $\alpha\beta$ 3-Integrinliganden dar. Die in Abb. 7.1 dargestellten Modifikationen wurden deshalb als geeignet erachtet.

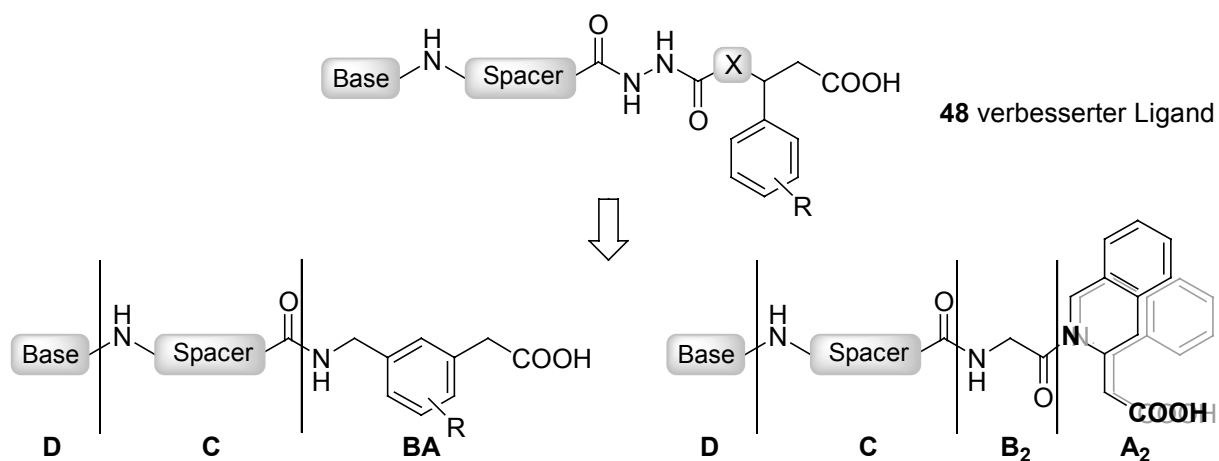


Abb. 7.1: Design von $\alpha\beta$ 3-Integrinliganden. Im Rahmen dieser Arbeit soll der optimierte Ligand **48** durch Einbau zyklischer Bausteine C-terminal versteift werden. Die retrosynthetische Zerlegung erfolgte analog Kapitel 6.3.

Ein anderer Ansatz zur Verbesserung der Resorptionseigenschaften (gesamte aus dem Magen/Darmtrakt aufgenommene Wirkstoffmenge), sowie der oralen Bioverfügbarkeit (Wirkstoffanteil, der im Kreislauf nach oraler Gabe zur Verfügung steht) ist die Verwendung von *Prodrugs* (Kapitel 3.2). Clement *et al.* beschrieben Amidoxime als *Prodrugs* von Amidinen.^[361-363] Ximelagatran, ein Thrombininhibitor, wird dieses Jahr als erste Verbindung mit diesem *Prodrug*prinzip auf den Markt

kommen.^[362, 364] Es stellt ein Doppel*prodrug* in Form eines Amidoxims und eines Esters dar. Dieses *Prodrug*konzept soll auf Guanidine übertragen und am Beispiel des hochaffinen aza-RGD-Mimetikums **49OH** untersucht werden (Abb. 7.2).

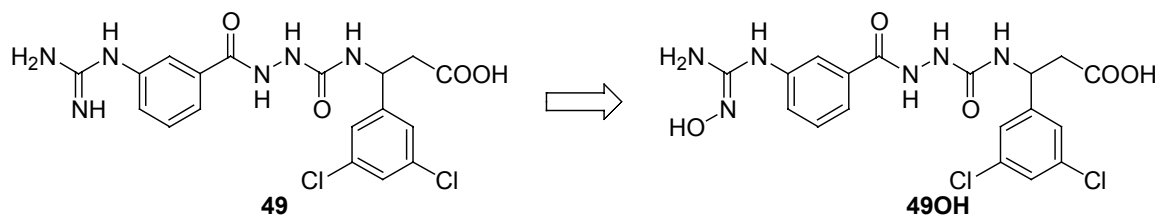


Abb. 7.2: Aza-RGD-Mimetikum **49** und Hydroxyguanidin-*Prodrug* **49OH**.

Es erfolgte auch hier die retrosynthetische Zerlegung der RGD-Mimetika wie in Kapitel 6.3 beschrieben.

Die Synthese der Verbindungen wurde, soweit nicht anders beschrieben, an fester Phase nach Fmoc-Strategie durchgeführt (Kapitel 5.2). In Abb. 7.3 sind die eingesetzten und in anderen Arbeiten bereits beschriebenen Bausteine dargestellt.^[17, 18, 315, 316, 336] Die RGD-Mimetika wurden großteils analog der Synthese der radiomarkierbaren nicht-peptidischen $\alpha\beta3$ -Integrinliganden (Kapitel 6.3) aufgebaut. Die Synthese der aza-RGD-Mimetika erfolgte durch Einbau der hochaffinen Fmoc- β -Aminosäuren **50**, **51** und **52** (**A₂**) und anschließender Umsetzung mit dem aktivierten 5-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)-3*H*-[1,3,4]oxadiazol-2-on (**45**, **B₂**). Unter Verwendung der kombinierten Bausteine **53** und **54** (**A₁B₁**) wurden die entsprechenden azacarba-RGD-Mimetika generiert. Neben der 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-phenylpropionsäure wurden die chlosubstituierten Säurebausteine gewählt, da diese in den Arbeiten von G. Sulyok die aktivsten $\alpha\beta3$ (/ $\alpha\beta6$)-Integrinliganden darstellen.^[17, 18] Zur Art und Länge des *Spacer*bausteins wurden für ähnliche Verbindungen bereits zahlreiche Untersuchungen durchgeführt,^[315, 365, 366] da sich durch dessen Länge die Selektivität zu den Integrinrezeptoren $\alpha\beta3$ und $\alpha\text{IIb}\beta3$ einstellen lässt.^[25, 272, 334, 367] Es zeigte sich, dass nur zwei Arten von Kombinationen des *Spacer*- und des Basenbausteins zu affinen Verbindungen führen. Einerseits ist es möglich den aromatischen *Spacer*-baustein **C** *m*-(*N*-Fmoc)-Aminobenzoesäure (**35**) mit Guanidin als Base **D** durch Reaktion mit *N,N'*-Bis-Boc-1-guanylpyrazol (**36**) einzusetzen. Andererseits besteht die Möglichkeit des Einbaus des kombinierten *Spacer*-Basenbausteins 5-[*N*-(4-

Methylpyridin-2-yl)-amino]-pentansäure (**55**), welcher in RGD-Mimetika zu einer Verbesserung der pharmakokinetischen Daten führte.^[17-19] Die Verknüpfung des aromatischen *Spacers* mit dem Basenbaustein Aminopyridin führte zu einem deutlichen Aktivitätsverlust um ca. zwei Zehnerpotenzen. Deshalb wurden bei den folgenden Modifikationen die aromatischen Basen nur in Kombination mit einem aliphatischen *Spacer* verwendet.

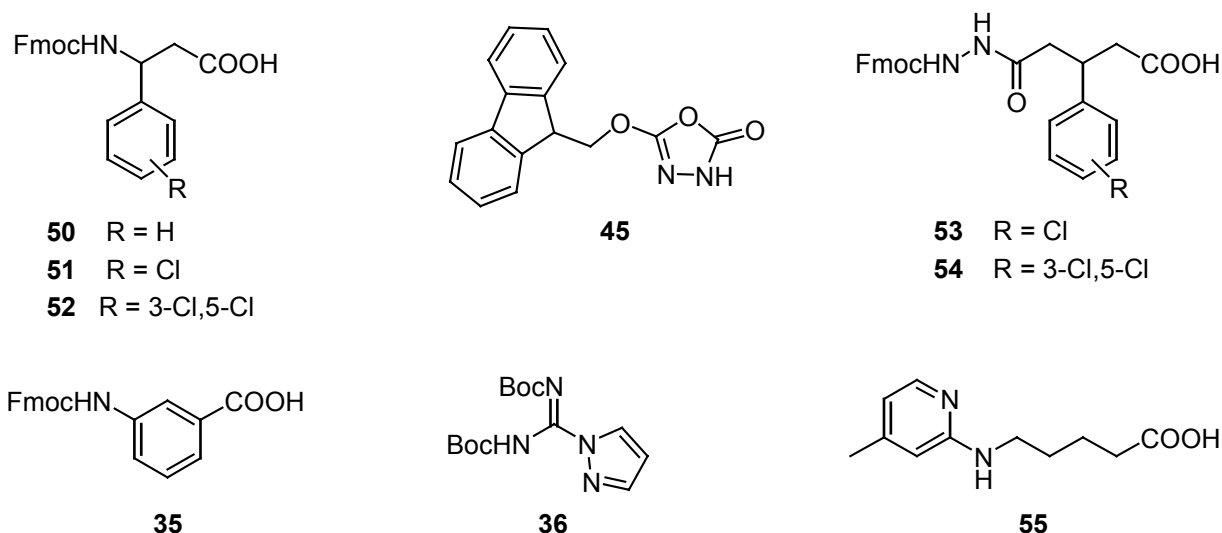


Abb. 7.3: β -Aminosäurebausteine **50**, **51** und **52** (A_2), hoch reaktiver aza-Glycinbaustein **45** (B_2), kombinierte Glutarsäure-aza-Glycinbausteine **53** und **54** (A_1B_1), aromatischer Spacerbaustein **35** (C), Guanylierungsreagenz **36** (D') und kombinierter Spacer-Basenbaustein **55** (CD).

7.2 Variation des Basenbausteins

Der Basenbaustein **D** in Abb. 7.1 repräsentiert den Guanylrest des Arginins der RGD-Sequenz. Während für die Bindung an das α IIb β 3-Integrin stark basische Gruppen, wie Amin, Amidin oder Guanidin ($pK_a > 10$) benötigt werden,^[368] toleriert der α v β 3-Integrinrezeptor neben einem Guanidin auch Guanidinmimetika mit geringerer Basizität ($pK_a > 4$)^[338, 350]. Im Fall des α v β 3-Integrins bindet das Guanidin über *side-on* Bindung an den Rezeptor^[57] (Abb. 7.4). Hingegen nimmt man für den α IIb β 3-Integrinrezeptor eine *end-on* Bindung des Guanidins an.^[10, 350, 353] Bei den RGD-Mimetika des Diacylhydrazintyps wurde festgestellt, dass auch die endständige NH_2 -Gruppe an der Bindung beteiligt ist.^[18]

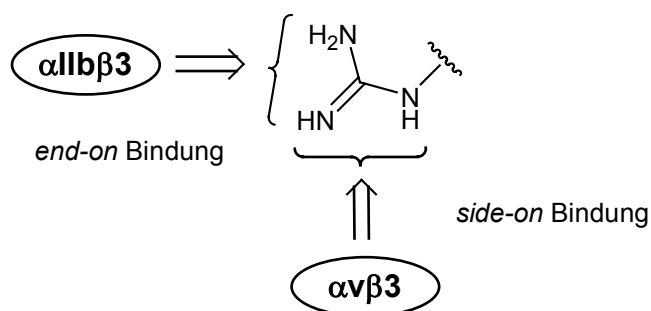


Abb. 7.4: Angenommener Bindungsmodus der basischen Guanidineinheit eines Liganden an die Integrine $\alpha v \beta 3$ (side-on Bindung) und $\alpha IIb \beta 3$ (end-on Bindung).

In Tab. 7.1 sind die pK_a -Werte einiger Guanidinmimetika dargestellt. Durch den Einbau zyklischer Guanidinmimetika kann außerdem die Lipophilie der RGD-Verbindungen gesteigert werden. Dies könnte die orale Bioverfügbarkeit positiv beeinflussen.^[22, 369]

Tab. 7.1: Basizität verschiedener Guanidinmimetika und bisher bevorzugter Integrinrezeptor bei Einbau in Mimetika.

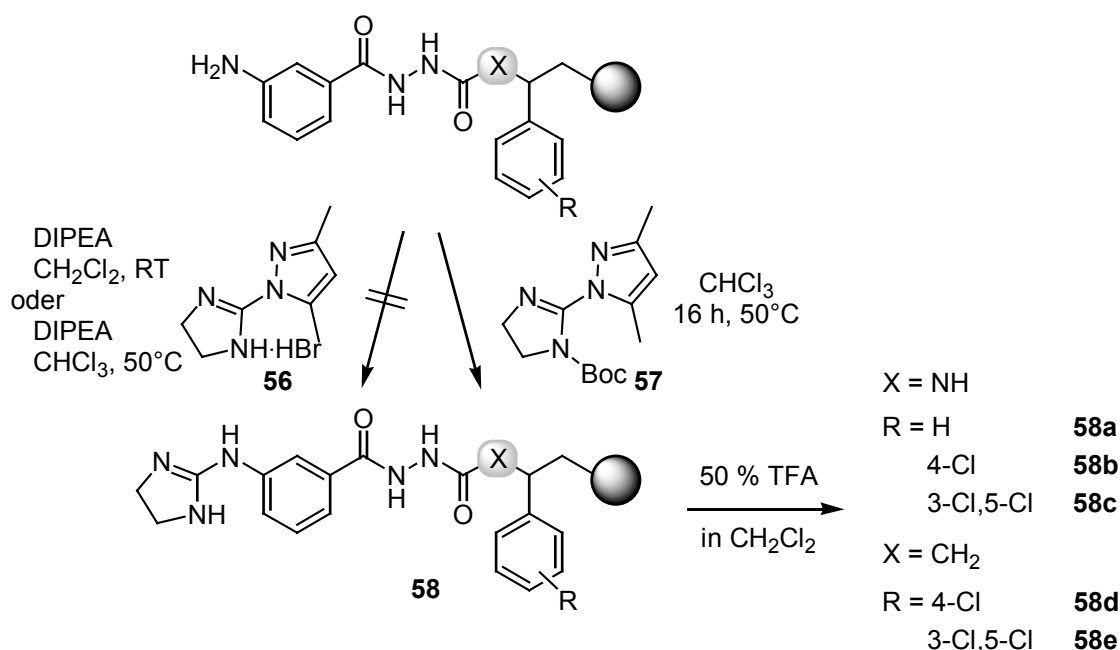
Base	Struktur	pK_a -Wert	Integrinrezeptor	Referenz
Guanidin		13.6	$\alpha IIb \beta 3$ und $\alpha v \beta 3$	[370]
Aminoimidazol		8.6	$\alpha v \beta 3$	[350]
Aminodihydroimidazol Aminotetrahydropyrimidin		9 – 12	$\alpha v \beta 3$	[340]
Benzamidin		11.6	—	[370]
Aminodihydropyrrol Aminotetrahydropyridin		9.6	$\alpha v \beta 3$	[370]
Aminopyridazin		5.2	$\alpha IIb \beta 3$	[369]
Aminopyridin		6.9	$\alpha v \beta 3$	[370]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Basen Aminodihydroimidazol, Amino-tetrahydropyrimidin, Benzamidin, Aminodihydropyrrol, Aminotetrahydropyridin, Aminochlorpyridazin, Aminopyridazin und Aminochinazolin eingesetzt. Synthesen und Ergebnisse der biologischen Evaluation werden in den nächsten Kapiteln präsentiert.

7.2.1 Basenbaustein Aminodihydroimidazol

Durch die Verbrückung der Guandinstickstoffatome in Aminodihydroimidazol über eine Ethyleneinheit kann die Basizität gesenkt und die Lipophilie um etwa 0.5 Einheiten erhöht werden. Des weiteren beschreiben Peyman *et al.* eine Steigerung der $\alpha v\beta 3$ -Integrinaffinität und Selektivität gegenüber $\alpha IIb\beta 3$ -Integrin durch den Einsatz zyklischer Guanidine.^[345, 353] Die Selektivitätserhöhung sollte auf die Behinderung der *end-on* Bindung des $\alpha IIb\beta 3$ -Integrinrezeptors zurückzuführen sein. Der Einsatz der Base Aminodihydroimidazol in Kombination mit dem aliphatischen *Spacer*baustein führte in den Arbeiten von G. Sulyok nur zu mäßigen $\alpha v\beta 3$ -Integrinaffinitäten (≥ 100 nM).^[18] Hier wurde nach Corbett *et al.*^[340] das käufliche 2-(3,5-Dimethylpyrazolyl)-4,5-dihydroimidazol (**56**, Schema 7.1) in Reaktion mit einem Alkylamin verwendet, wobei das Dimethylpyrazol als Abgangsgruppe, ähnlich dem für die Guanylierung verwendeten *N,N'*-Bis-Boc-guanylpyrazol (**36**) fungierte. Die Ausbeuten der Rohprodukte betragen trotz einer Reaktionsoptimierung nur 35 - 40 %.

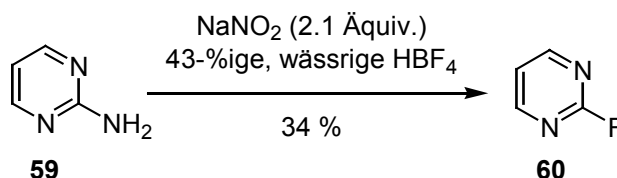
Die Dihydroimidazolierung des aromatischen *Spacer*bausteins am Harz gelang nach dem Einführen der *tert*-Butyloxycarbonylschutzgruppe (Boc) an der sekundären Aminogruppe von 2-(3,5-Dimethylpyrazolyl)-4,5-dihydroimidazol (**56**). Die Anbindung von **57** an ein festphasengebundenes Anilin erfolgte in $CHCl_3$ bei 50 °C innerhalb von 20 Stunden. Abspaltung und Isolierung führte in Ausbeuten von 21 - 49 % zu den Verbindungen **58a-e**. Bei der direkten Umsetzung des ungeschützten **56** mit dem aromatischen *Spacer*baustein konnte bei Raumtemperatur in CH_2Cl_2 keine und nach Temperaturerhöhung und Verlängerung der Reaktionszeit auf 16 h bei 50 °C in $CHCl_3$ nur in Spuren eine Reaktion beobachtet werden (Schema 7.1). Hierbei entstanden neben dem unumgesetzten Amin aufgrund unvollständiger Kupplung, zwei weitere Nebenprodukte, die nicht identifiziert werden konnten.



Schema 7.1: Einführung von Dihydroimidazol an der festen Phase.

7.2.2 Basenbaustein Aminotetrahydropyrimidin

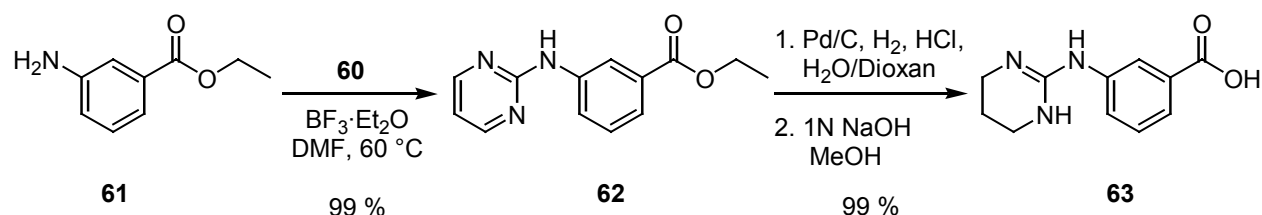
Gopalsamy *et al.* beschreiben Aminotetrahydropyrimidin als mit Aminodihydroimidazol vergleichbares bzw. etwas potenteres zyklisiertes Guanidinmimetikum in $\alpha\beta$ 3-Integrinliganden.^[371] Die Base wurde als kombinierter *Spacer*-Basenbaustein **63** hergestellt, da ein entsprechendes Dimethylpyrazolderivat nicht kommerziell erhältlich ist. **63** kann ausgehend von 2-Aminopyrimidin (**59**) aufgebaut werden. Hierzu wurde der elektronenarme Aromat Fluorpyrimidin (**60**) synthetisiert,^[372] da die nukleophile aromatische Substitution von Pyrimidinen nur bei elektronenarmen Fluoraromaten unter milden Bedingungen möglich ist. **60** wurde durch eine Balz-Schiemann-Reaktion, Diazotierung von **59** in HBF₄, hergestellt (Schema 7.2).



Schema 7.2: Synthese von 2-Fluorpyrimidin (**60**).

In Schema 7.3 ist die weitere Umsetzung von **60** mit dem *Spacervorläufer* 3-Aminobenzoesäureethylester (**61**), anschließende Hydrierung und alkalische

Esterspaltung dargestellt, wodurch Tetrahydropyrimidin-6-yl-aminobenzoesäure (**63**) mit einer Ausbeute von 98 % entstand.



Schema 7.3: *Synthese des kombinierten Spacer-Basenbausteins 63.*

Die Umsetzung an fester Phase mit dem entsprechenden aza-Glycinderivat mittels HATU und Collidin, Harzabspaltung und HPLC-Reinigung ergab die Verbindungen **64a-e** in Ausbeuten von 26 - 62 % (Abb. 7.1).

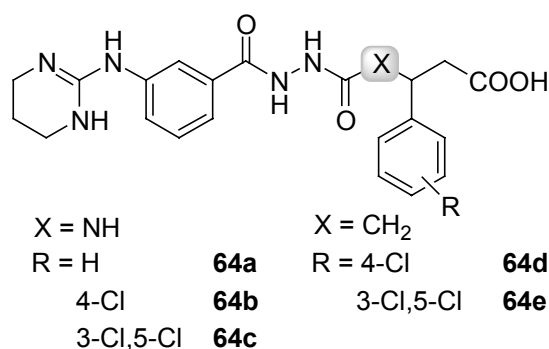
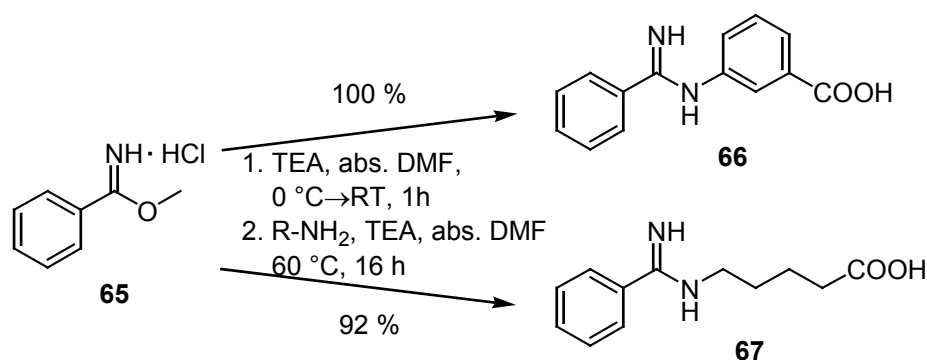


Abb. 7.5: *RGD-Mimetika mit Aminotetrahydropyrimidin als Guanidinmimetikum.*

7.2.3 Basenbaustein Benzamidin

Geht man von der *side-on* Bindung des Guanidins an den $\alpha\beta3$ -Integrinrezeptor aus (Abb. 7.1), sollte ein Austausch der endständigen Aminogruppe durch eine Methylgruppe oder einen Phenylring toleriert werden. Die Verwendung von Methylamidin als Guanidinmimetikum führte zu azacarba-RGD-Mimetika, die verglichen mit den Guanidinanaloga eine um ein bis zwei Zehnerpotenzen geringere Affinität gegenüber den $\alpha\beta3$ - und $\alpha\beta6$ -Integrinrezeptoren aufwiesen.^[18] Der Einbau von Benzamidin als Guanidinmimetikum könnte aufgrund des aromatischen Restes eine T-förmige aromatische Wechselwirkung des Liganden mit dem Phenylring von α -Tyr¹⁷⁸ des $\alpha\beta3$ -Integrinrezeptors bewirken und somit wieder eine Erhöhung der Integrinaffinität erzielen.^[136]

Für die Synthese der benzamidinhaltigen RGD-Mimetika wurden die kombinierten *Spacer*-Basenbausteine **66** und **67** aus Benzimid Säuremethylester Hydrochlorid (**65**) und 3-Aminobenzoessäure bzw. 5-Aminopentansäure hergestellt (Schema 7.4). Zuerst wurde unter Schutzgas in trockenem DMF durch Zugabe von Triethylamin nach Shilcrat *et al.*^[373] der freie Benzimid Säuremethylester erzeugt, welcher anschließend bei 60 °C mit dem *Spacer* (R-NH₂) umgesetzt wurde. Alternativ wären die Reaktionen unter Verwendung eines beheizbaren Schüttlers direkt am Harz durchführbar.



Schema 7.4: Synthese der Benzamidine **66** und **67** nach Shilcrat *et al.*^[373]

Die Umsetzung von **66** und **67** mit am Harz immobilisiertem *N*-Hydrazino-3-amino-3-phenylpropionsäure unter Zusatz von HATU und Collidin ergab nach Abspalten vom Harz und Isolierung mittels HPLC die Verbindungen **68a** und **68b** mit 54 % bzw. 23 % Ausbeute.

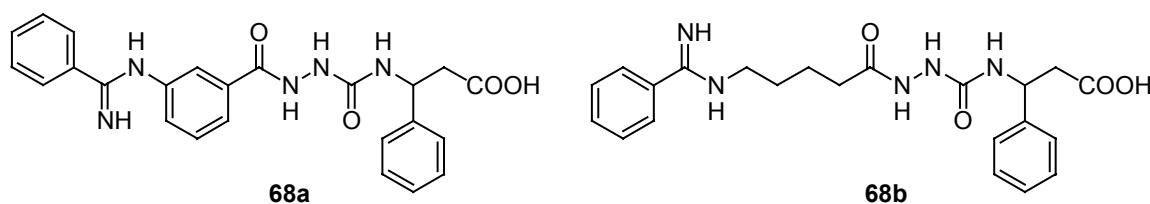


Abb. 7.6: Verbindungen **68a** und **68b**.

Bei Untersuchungen zur Synthese der benzamidinhaltigen RGD-Mimetika unter Einsatz des Thioimidates **70** analog der Herstellung der Methylamidinderivate mit aliphatischen *Spacer*bausteinen konnte weder eine Reaktion von **70** mit einem aliphatischen Amin noch mit einem Anilinderivat an der Festphase beobachtet werden.

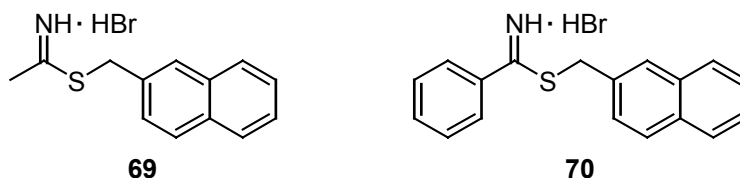
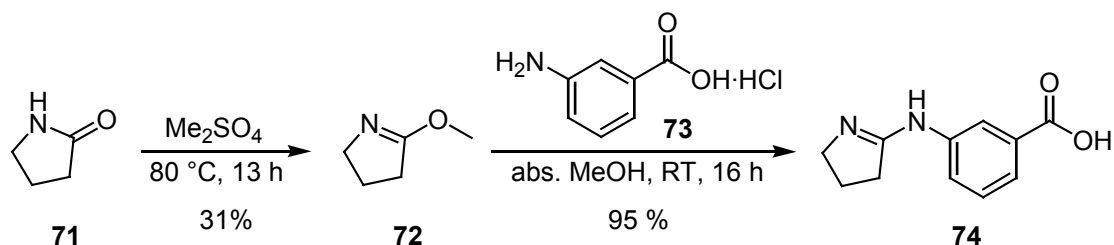


Abb. 7.7: Reagenzien **69** und **70** zur Herstellung von Methylamidinen bzw. Benzamidinen.^[374]

7.2.4 Basenbaustein Aminodihydropyrrol

Neben Benzamidin soll im Rahmen dieser Arbeit auch der Einfluss von Aminodihydropyrrol auf die Integrinaffinität, -selektivität und die orale Bioverfügbarkeit der aza-RGD-Mimetika untersucht werden. Die Base stellt ein zyklisches Guanidinmimetikum mit geringerer Basizität und höherer Lipophilie als Aminodihydroimidazol dar, und wird in der Patentliteratur als potenter $\alpha\beta 3$ -Integrinligand beschrieben.^[375] Auch dieser Baustein wurde als kombinierter *Spacer*-Basenbaustein integriert.

Nach einer literaturbekannten Methode konnte 2-Methoxydihydropyrrol (**72**) hergestellt^[376] und zu 3-[(3,4-Dihydro-2*H*-pyrrol-5-yl)-amino]-benzoesäure (**74**) umgesetzt werden^[375] (Schema 7.5).



Schema 7.5: Synthese des kombinierten *Spacer*-Basenbausteins **74**.^[375, 376]

Die Umsetzung an fester Phase mit dem entsprechenden Hydrazino-Derivat mittels HATU und Collidin, Harzabspaltung und Isolierung ergab die Verbindungen **75a-e** in Ausbeuten von 14 - 32 % (Abb. 7.8).

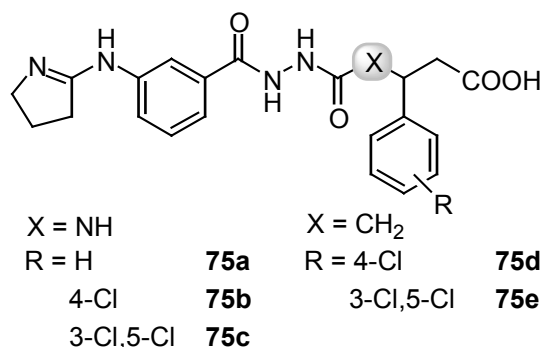
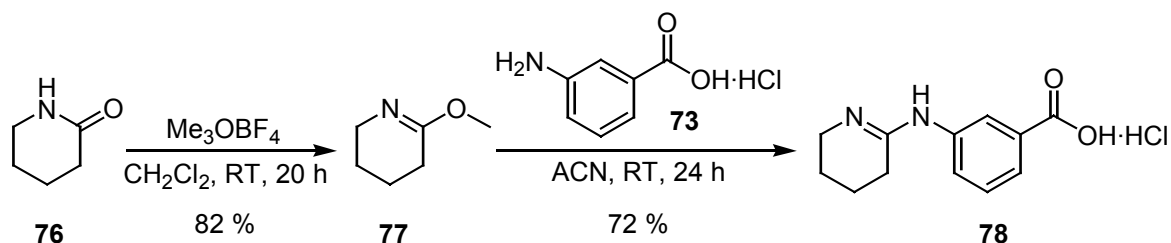


Abb. 7.8: RGD-Mimetika *x* mit Aminodihydropyrrrol als Guanidinmimetikum.

7.2.5 Basenbaustein Aminotetrahydropyridin

Aminotetrahydropyridin sollte, verglichen mit der analogen Base Aminodihydropyrrrol, integriert in ein RGD-Mimetikum einen $\alpha\beta 3$ -Integrinligand mit gesteigerter Affinität und Selektivität gegenüber dem $\alpha\beta 3$ -Integrinrezeptor darstellen. Die Synthese des Imidatbausteines **78** erfolgte entsprechend über den Lactimether **77**^[376] und Umsetzung mit 3-Aminobenzoesäurehydrochlorid (**73**),^[375] wobei das Hydrochlorid **78** entsteht.



Schema 7.6: Synthese des kombinierten Spacer-Basenbausteins **78**.^[375, 376]

Da bei der Kupplung des Basenbausteins mit dem harzgebundenen aza-Glycinbaustein mittels HATU/Collidin die Base mit 30 Äquivalenten bezogen auf die Harzbelegung bereits im Überschuss zugegeben wurde, war keine weitere Basenzugabe nötig, obwohl **78** als Hydrochlorid vorlag. Durch anschließende Abspaltung vom Harz und HPLC-Reinigung wurden die Verbindungen **79a-e** (Abb. 7.9) in Ausbeuten von 21-49 % hergestellt.

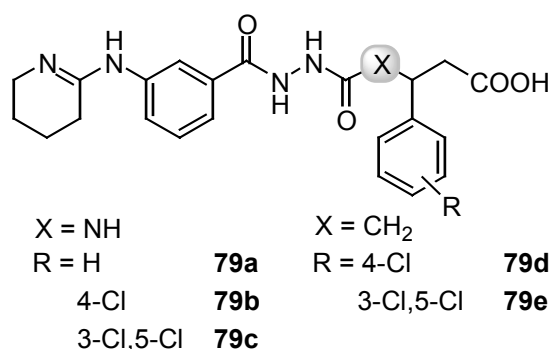
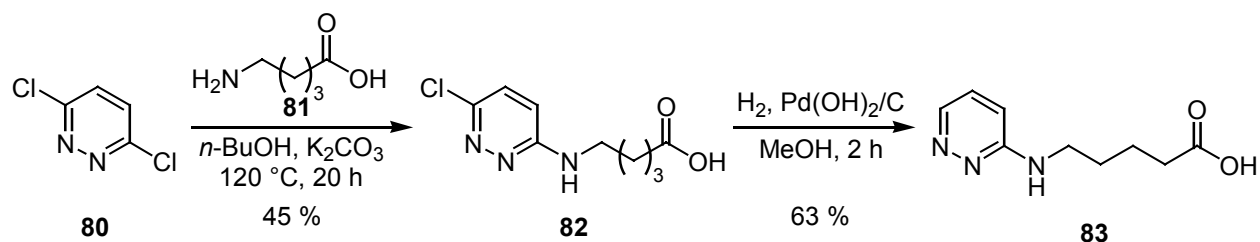


Abb. 7.9: RGD-Mimetika *x* mit Aminotetrahydropyridin als Guanidinmimetikum.

7.2.6 Basenbausteine Aminochlorpyridazin und Aminopyridazin

Der Austausch eines Guanidins durch stickstoffhaltige Heterozyklen, wie Aminopyrimidin, Aminopyridazin oder Aminopyridin wurde von Misra *et al.* am Beispiel von Thrombinantagonisten beschrieben.^[369] Wie bereits erwähnt konnte durch den Einsatz des aromatischen, weniger basischen Aminopyridins als Base eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit erreicht werden.^[18] Daraufhin wurde auch Pyridazin als Guanidinmimetikum eingesetzt. Die Umsetzung mit Aminen gelingt nur mit elektronenarmen Halogenpyridazinen bei Temperaturen von 100 °C.^[369] Aus diesem Grund erschien die direkte Reaktion dieses Basenbausteins mit einem Amin an fester Phase schwer umsetzbar. Der Basenbaustein wurde deshalb zunächst in Lösung mit einem aliphatischen *Spacerbaustein C* zu dem kombinierten Baustein **CD** umgesetzt. Schema 7.7 zeigt die Reaktion von 3,6-Dichlorpyridazin (**80**) mit 5-Aminopentansäure (**81**). Die Aminopentansäure wird in 1,2-fachem Überschuss eingesetzt und die Reaktionsmischung für 20 h bei einer Temperatur von 120 °C gerührt. Trotz des Überschusses und einer Verlängerung der Reaktionszeit konnte keine vollständige Umsetzung von **80** zu **82** erreicht werden. Die Ausbeute betrug 45 %. Durch anschließende Reduktion mit Wasserstoff in Gegenwart von 20 % Pd(OH)₂ auf Aktivkohle als Katalysator konnte der Baustein **83** in einer Ausbeute von 63 % hergestellt werden (Schema 7.7).



Schema 7.7: Synthese der kombinierten Spacer-Basenbausteine **82** und **83** modifiziert nach Misra *et al.*^[369]

Die azacarba-RGD-Mimetika **84** und **85** wurden durch Umsetzung von **82** bzw. **83** mit 5-Hydrazino-5-oxo-3-(3,5-dichlorphenyl)-pentansäure unter Zusatz von HATU und Collidin an fester Phase, Abspaltung und HPLC-Reinigung in 56 % bzw. 19 % Ausbeute erhalten.

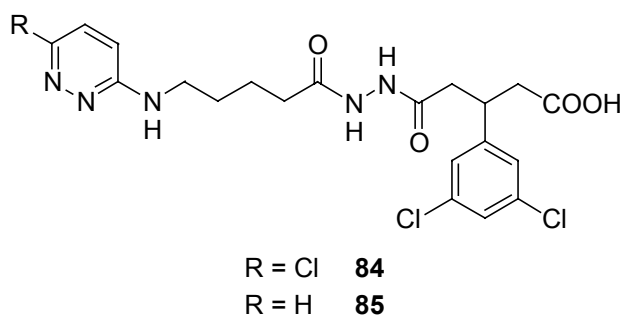
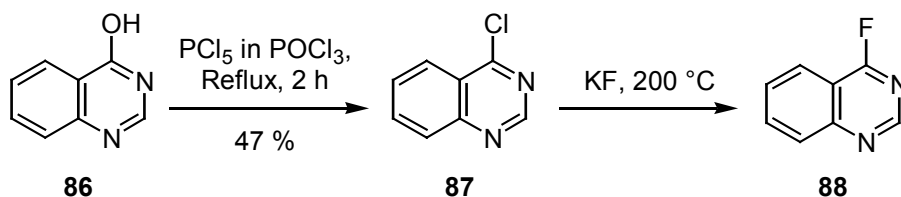


Abb. 7.10: Azacarba-RGD-Mimetika **84** und **85** mit Aminochlorpyridazin bzw. Aminopyridazin als Guanidinmimetikum.

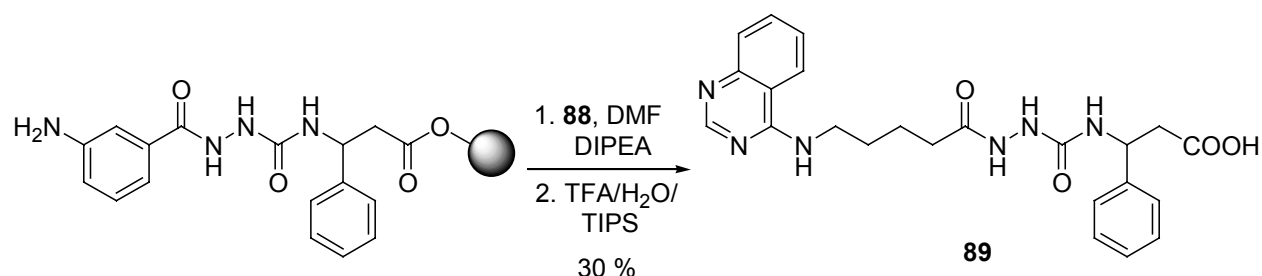
7.2.7 Basenbaustein Aminochinazolin

Zur weiteren Steigerung der Lipophilie der RGD-Mimetika wurde ein noch ausgedehnteres aromatisches System verglichen mit Benzamidin als Guanidinmimetikum eingeführt. Analog der Synthese von 2-Fluorpyrimidin sollte 2- bzw. 4-Fluorchinazolin synthetisiert werden. D. Gottschling konnte zeigen, dass nur die Synthese von 4-Fluorchinazolin, nicht aber von 2-Fluorchinazolin möglich ist.^[332] Ausgehend von dem käuflichen 4-Hydroxychinazolin (**86**) ließ sich nach Schönowsky *et al.*^[377] das entsprechende Chlorderivat **87** herstellen. Dieses wurde durch Erhitzen mit trockenem KF in einer Argonatmosphäre bei 200 °C zu 4-Fluorchinazolin (**88**) umgesetzt (Schema 7.8).^[378]



Schema 7.8: Synthese von 4-Fluorchinazolin (**88**).^[332]

Der Fluoraromat konnte an der festen Phase (WANG-Harz) gemäß einer in unserem Arbeitskreis entwickelten Synthesevorschrift^[379] durchgeführt werden und ergab nach Abspaltung und HPLC-Reinigung das aza-RGD-Mimetikum **89** in 30 % Ausbeute (Schema 7.9).



Schema 7.9: Synthese von Verbindung **89**.

7.2.8 Affinitäts-Studien an isolierten Integrinrezeptoren

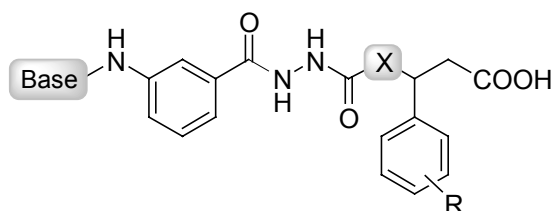
Die verwendeten α_v -Integrine wurden aus Plazenta und das $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin aus Blutplättchen menschlichen Ursprungs isoliert bzw. als lösliche Integrinrezeptoren gentechnisch mittels eines Baculovirus Systems ($\alpha_v\beta_3$) hergestellt.^[17] Die natürlichen Liganden Vitronectin ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$), Fibronectin ($\alpha_v\beta_6$) und Fibrinogen ($\alpha_{IIb}\beta_3$) wurden aus humanem Plasma isoliert. Die immobilisierten Integrine wurden in einem Verdrängungsexperiment mit dem löslichen biotinylierten Liganden und der Testsubstanz inkubiert. Messungen bei verschiedenen Konzentrationen ergaben nach enzymatischer Anfärbung des biotinylierten Liganden photometrisch die Inhibierungskonstante (IC_{50}). Der IC_{50} -Wert wurde erst ab einer Inhibierung von 50 % bei einer Peptidkonzentration von 100 nM durch Titration exakt bestimmt, und ansonsten in Prozent der Inhibierung bei entsprechender Peptidkonzentration angegeben. IC_{50} ist die Konzentration an Testsubstanz, die benötigt wird, um 50 % der maximalen

Rezeptorinhibierung zu erreichen. Definitionsgemäß ist eine Verbindung ein um so besserer Ligand des entsprechenden Rezeptors, je kleiner die IC_{50} -Konstante ist.

Die Ergebnisse der biologischen Untersuchungen der RGD-Mimetika mit den verschiedenen Basenbausteinen sind in Tab. 7.2 zusammengefasst. Der in den Tabellen angegebene $\log P$ -Wert ist ein Maß für die Lipophilie der Verbindung (Kapitel 3.1) und dient als Anhaltspunkt zum Abschätzen der oralen Bioverfügbarkeit und der Resorptionseigenschaften.

Die beiden Gruppen aza- und azacarba-Mimetika sind jeweils nach dem Substituenten des Säurebausteins geordnet, um den Einfluss des Basenbausteines direkt ablesen zu können. Die $\alpha v\beta 3$ - und $\alpha v\beta 6$ -Affinitäten der Verbindungen liegen im nanomolaren bzw. subnanomolaren Bereich, während, wie erwartet, kaum Affinität zum $\alpha IIb\beta 3$ -Integrinrezeptor beobachtet wird. Die hohe Selektivität gegenüber dem $\alpha IIb\beta 3$ -Integrin liegt mindestens bei vier Zehnerpotenzen. Lediglich die aza-Verbindungen **58a**, **64b**, **58c** und **64c** mit den verbrückten Guanidinmimetika **Aminodihydroimidazol** und **Aminotetrahydropyrimidin** zeigen nennenswerte $\alpha v\beta 5$ -Integrinaffinitäten ($IC_{50} = 10 - 15$ nM), während die anderen Mimetika (sub-)mikromolare Werte aufweisen. Diese RGD-Mimetika mit zyklischen Guanidinbasen besitzen eine um ca. eine Größenordnung höhere Affinität gegenüber dem $\alpha v\beta 3$ -Integrin, verglichen mit den Mimetika, welche die Imidate **Aminodihydropyrrol** und **Aminotetrahydropyridin** als Basen enthalten. Das Ergebnis aus *Dockingstudien*,^[136] dass die endständige NH_2 -Gruppe der RGD-Mimetika des Diacylhydrazintyps bei der Bindung an den $\alpha v\beta 3$ -Integrinrezeptor beteiligt ist, wird hierdurch bestätigt. Ein Vergleich der beiden Substitutionsmuster am Phenylring des Säurebausteins zeigt eine schwache Tendenz der aza-Imidate mit 3,5-dichlorsubstituiertem Säurebaustein (**75c**, **79c**) zu größerer $\alpha v\beta 6$ -Selektivität, die azacarba-Analoga mit 4-chlorsubstituiertem Asp-Mimetikum (**75d**, **79d**) hingegen eine leichte Tendenz zu größerer $\alpha v\beta 3$ -Integrinaffinität. Bei den Verbindungen mit verbrückten Guanidinbasen (**58b-e** und **64b-e**) ist kein Unterschied durch verschiedene Substitution des Säurebausteines erkennbar. Die azacarba-Mimetika stellen somit sehr potente biselektive $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 6$ -Integrinliganden dar, weshalb sie trotz ihres niedrigen $\log P$ -Wertes (< 5)^[158] auf ihre orale Bioverfügbarkeit hin untersucht wurden (Kapitel 7.2.9).

Tab. 7.2: Übersicht der Affinität und Selektivität der RGD-Mimetika gegenüber den Integrinen $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha\beta6$ und $\alpha\text{IIb}\beta3$.



Verb.	R	X	Base ^a	logP	Integrin, IC ₅₀ [nM]			
					$\alpha\beta3$	$\alpha\beta5$	$\alpha\beta6$	$\alpha\text{IIb}\beta3$
[17]	GRGDSPK ^b	–	–	-8.03	1000	–	–	>10 ⁴
[17]	ϵ (-RGDfV-) ^b	–	–	-2.53	2	–	–	850
[18]	4-Cl	NH	Gua	1.26	0.1	100	6.0	5500
[18]	4-Cl	CH ₂	Gua	1.68	1.8	>1000	33	>1000
58a	H	NH	Dhim	1.21	0.5	20	1.0	10 ⁴ (55 %)
64a	H	NH	Thpym	1.32	5.3	10 ³ (77 %)	3.2	10 ⁴ (17 %)
75a	H	NH	Dhpyr	1.39	48	10 ⁴ (60 %)	70	10 ⁴ (29 %)
79a	H	NH	Thpy	1.81	40	10 ⁴ (90 %)	32	10 ⁴ (4 %)
58b	4-Cl	NH	Dhim	1.77	0.7	10 ² (76 %)	0.6	10 ⁴ (45 %)
64b	4-Cl	NH	Thpym	1.88	0.4	15	0.6	10 ⁴ (24 %)
75b	4-Cl	NH	Dhpyr	1.95	5.5	10 ³ (16 %)	3.0	10 ⁴ (37 %)
79b	4-Cl	NH	Thpy	2.37	13	10 ³ (14 %)	7.9	10 ⁴ (35 %)
58c	3-Cl,5-Cl	NH	Dhim	2.33	0.7	15	0.3	10 ⁴ (53 %)
64c	3-Cl,5-Cl	NH	Thpym	2.44	0.6	10	0.2	10 ⁴ (34 %)
75c	3-Cl,5-Cl	NH	Dhpyr	2.51	7.3	10 ³ (87 %)	1.1	10 ⁴ (37 %)
79c	3-Cl,5-Cl	NH	Thpy	2.93	22	590	5.1	10 ⁴ (16 %)
58d	4-Cl	CH ₂	Dhim	2.20	0.4	10 ³ (77 %)	1.0	10 ⁴ (29 %)
64d	4-Cl	CH ₂	Thpym	2.30	0.2	190	1.1	10 ⁴ (25 %)
75d	4-Cl	CH ₂	Dhpyr	2.38	8.9	10 ³ (38 %)	31	10 ⁴ (27 %)
79d	4-Cl	CH ₂	Thpy	2.79	4.9	10 ⁴ (85 %)	21	10 ⁴ (18 %)
58e	3-Cl,5-Cl	CH ₂	Dhim	2.75	0.4	200	0.7	10 ⁴ (47 %)
64e	3-Cl,5-Cl	CH ₂	Thpym	2.86	0.2	180	0.5	10 ⁴ (38 %)
75e	3-Cl,5-Cl	CH ₂	Dhpyr	2.94	4.3	10 ³ (54 %)	1.9	10 ⁴ (25 %)
79e	3-Cl,5-Cl	CH ₂	Thpy	3.35	4.2	10 ³ (47 %)	7.4	10 ⁴ (14 %)

^a Gua = Guanidin, Dhpyr = Aminodihydropyrrol, Thpy = Aminotetrahydropyridin, Dhim = Aminodihydroimidazol, Thpym = Aminotetrahydropyrimidin; ^b die Peptide GRGDSPK und ϵ (-RGDfV-) wurden als Referenzen in den Rezeptor-Bindungsassays verwendet.

Die Basenvariation unter Verwendung von Benzamidin (**68a, b**), Aminochlorpyridazin (**84**), Aminopyridazin (**85**) bzw. Aminochinazolin (**89**) als Guanidinmimetika führte zu Verbindungen ohne α v-Integrinaffinität im nanomolaren Bereich (Tab. 10.2).

7.2.9 Untersuchungen zur Pharmakokinetik

Erste Hinweise auf die pharmakokinetischen Eigenschaften eines Wirkstoffs erhält man durch die Berechnung der $\log P$ -Werte und durch *in vitro*-Untersuchungen, wie Permeabilitätstests mit Caco-2-Zellen. Um weiterführende Aussagen über die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus machen zu können, muss die zu charakterisierende Substanz auch im lebenden Organismus untersucht werden. Diese *in vivo*-Untersuchungen des pharmakokinetischen Wirkstoffprofils werden zunächst an Ratten durchgeführt, später auch an anderen Tieren, wie Hunden oder Affen. Hierbei untersucht man, wie schnell eine Substanz nach intravenöser oder oraler Applikation wieder ausgeschieden bzw. wie schnell der Wirkstoff im Körper abgebaut wird. Diese Eigenschaften lassen sich durch folgende verschiedene Parameter angeben:

- Halbwertszeit $t_{1/2}$: Zeitspanne, in der sich die Wirkstoffkonzentration im Blut halbiert,
- Clearance CL: Plasmavolumen, das pro Zeiteinheit formal vom Wirkstoff befreit wird,
- AUC (*area under curve*): Fläche unter der Plasmaspiegelkurve (Abb. 7.11); bei vollständiger Aufnahme des Wirkstoffes unabhängig von der Applikationsart,
- orale Bioverfügbarkeit BV: Wirkstoffmenge, die dem Kreislauf nach oraler Gabe zur Verfügung steht. Sie berechnet sich aus dem Verhältnis der AUC-Werte nach oraler und intravenöser Applikation des Wirkstoffes.

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

Diese Pharmakokinetikuntersuchungen wurden an Ratten durchgeführt. Hierfür wurde die zu untersuchenden Verbindungen (**58e**, **64e**, **75e**, **79e**) den Ratten einzeln oder als Mischung mit anderen Verbindungen in geringen Konzentrationen injiziert (0.2 mg/kg Körpergewicht) oder oral verabreicht (0.5 mg/kg Körpergewicht). Die Bestimmung der Wirkstoffkonzentration im Blut wurde mittels gekoppelter LC-MS-Analyse durchgeführt, wobei innerhalb eines Tages sieben Messwerte nach 0.1, 0.5, 1, 2, 4 und 6 Stunden aufgenommen wurden. Durch graphische Darstellung der gemittelten Werte von drei Ratten erhält man die in Abb. 7.11 dargestellten Plasmaspiegelkurven.

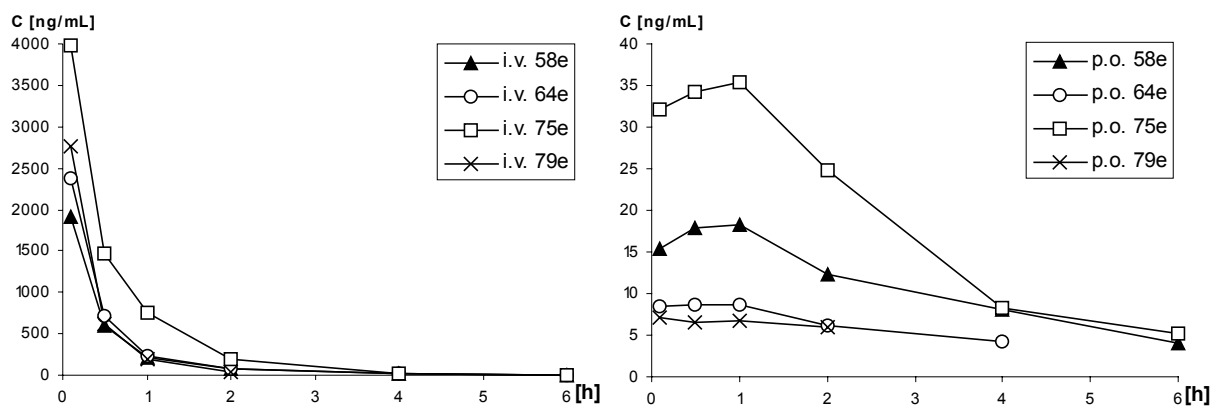
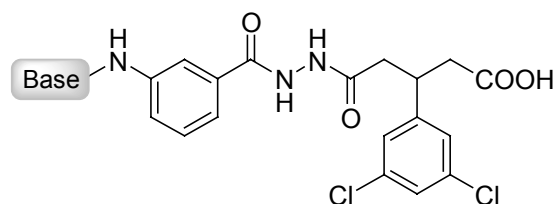


Abb. 7.11: Plasmaspiegelkurven nach intravenöser (i.v., 0.2 mg/kg) und peroraler (p.o., 0.5 mg/kg) Applikation in Ratten ($N = 3$).

Die Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen sind in Tab. 7.3 dargestellt. Anhand der AUC-Werte, die sich aus der graphischen Darstellung der Wirkstoffkonzentrationen ergeben, werden die Halbwertszeit $t_{1/2}$, die Clearance CL sowie die orale Bioverfügbarkeit BV berechnet.

Tab. 7.3: *Pharmakokinetische Parameter^a ausgesuchter RGD-Mimetika.*



Verb.	Base ^b	AUC _{i.v.} [h·ng/mL]	AUC _{p.o.} [h·ng/mL]	t _{1/2} ^c [h]	CL ^c [L/h/kg]	BV [%]
58e	Dhim	1920	61.5	0.74	0.93	5
64e	Thpym	1260	24.8	0.65	0.80	<5
75e	Dhpyr	2560	103	0.64	0.03	5
79e	Thpy	1180	12.2	0.30	0.39	<5

^a Mittelwert von je drei Versuchstieren; ^b Dhim = Aminodihydroimidazol, Thpym = Aminotetrahydropyrimidin, Dhpyr = Aminodihydropyrrol, Thpy = Aminotetrahydropyridin; ^c diese Parameter beziehen sich auf intravenöse Applikation.

Die Halbwertszeiten der Verbindungen sind mit Werten zwischen einer halben und einer Stunde relativ gering, d. h. die Substanzen werden sehr schnell wieder aus dem Körper ausgeschieden. Dies korrespondiert mit einer entsprechend hohen *Clearance* (0.03-0.93 L/h/kg) und der geringen oralen Bioverfügbarkeit mit Werten von $\leq 5\%$. Ein Wirkstoff besitzt erst ab einer oralen Bioverfügbarkeit von $> 20\%$ in Ratten ein Potential zur oralen Applikation beim Menschen.^[158]

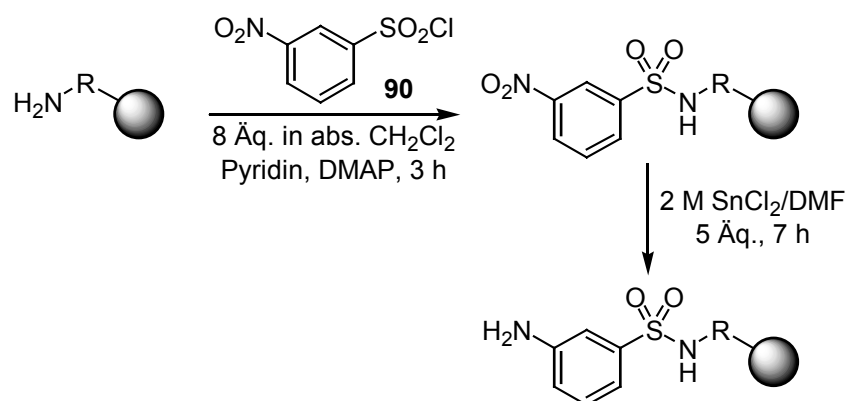
7.3 Erhöhung der Rigidität des Backbones

Es wurde untersucht, ob eine Erhöhung der Interginaffinität und –selektivität als Folge einer Versteifung des Rückgrates erzielt werden kann. Zyklische Bausteine besitzen nicht nur eine strukturinduzierende Wirkung, sondern auch einen Einfluss auf die Lipophilie des Liganden. In den folgenden Kapiteln werden die Synthesen eines Sulfonamids und von Verbindungen mit zyklischen Asp-Mimetika beschrieben.

7.3.1 Substitution einer Amid- durch eine Sulfonamidbindung

Die im Vergleich zur normalen Peptidbindung stärkere Polarisierung der entsprechenden Bindung im Sulfonamid begünstigt die Bildung von Wasserstoffbrücken.

Die Erhöhung der Acidität des Stickstoffprotons ($\text{RSO}_2\text{-NHR}'$, $\text{pK}_a = 10 - 11$) kann zu einer verbesserten Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung beitragen. Ebenso wie die aza-Gruppe^[337, 380] besitzt die Sulfonamidbindung^[381] eine strukturinduzierende Wirkung, wodurch auch eine höhere Rezeptorselektivität erreicht werden könnte. Die postulierte Affinitätserhöhung^[382, 383] durch den Einsatz der aza-Gruppe in RGD-Mimetika, konnte nicht bestätigt werden.^[315] Deshalb wurden in RGD-Mimetika mit Sulfonamidbindung neben aza-Glycin auch das natürliche Glycin integriert. Hierdurch konnte ausgeschlossen werden, dass die beiden strukturinduzierenden Einheiten sich evtl. gegenseitig negativ beeinflussen. Sulfonamide können durch Behandlung von Aminen mit Sulfonsäurechloriden und einer Hilfsbase gebildet werden.



Schema 7.10: Festphasensynthese von Sulfonamidderivaten.

Die Festphasensynthese der Sulfonamidverbindungen wurde am Wang-Harz nach Belegung mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-phenylpropionsäure durchgeführt. Als Baustein **C** wurde das käuflich erhältliche 3-Nitrobenzylsulfonsäurechlorid **90** verwendet, welches an der Festphase zum Amin reduziert^[367] (Schema 7.10) und anschließend guanyliert wurde. Es resultieren die Verbindungen **91a** und **91b**, deren Ausbeute nach Isolierung mittels HPLC 14 % bzw. 40 % betragen.

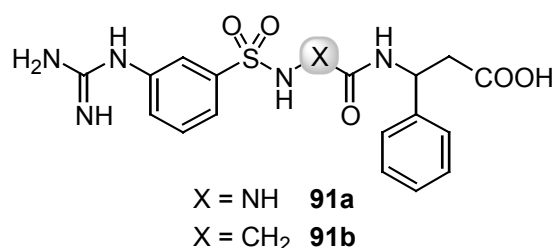


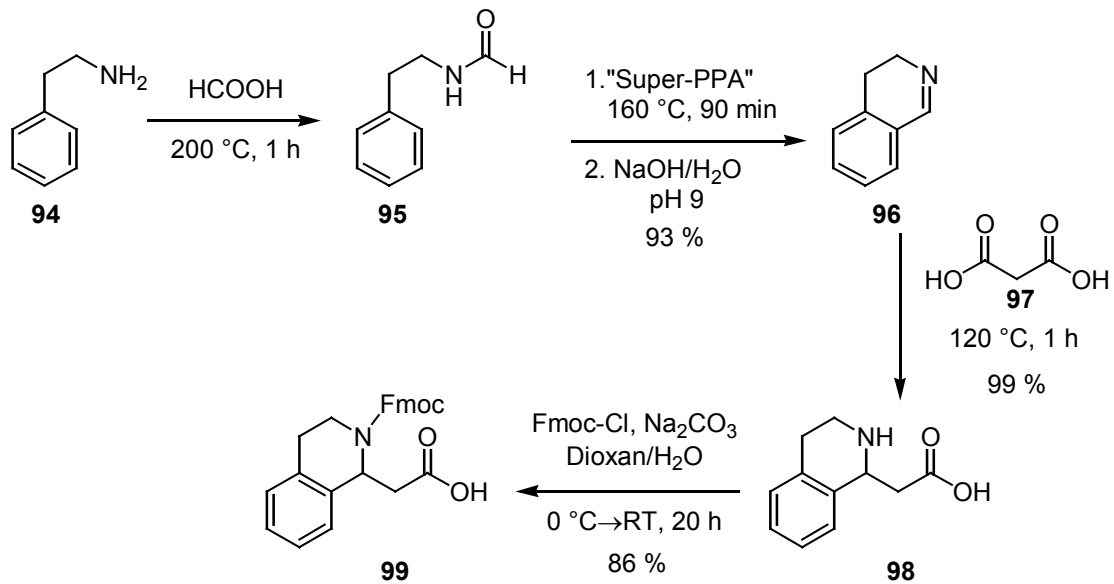
Abb. 7.12: Sulfonamidverbindungen **91a** und **91b**.

Die Testung der erhaltenen Verbindungen **91a** und **91b** (Abb. 7.12) in isolierten Rezeptorassays zeigte, dass sie keine Affinität gegenüber den Integrinrezeptoren $\alpha v\beta 3$ -, $\alpha v\beta 5$ -, $\alpha v\beta 6$ -und $\alpha IIb\beta 3$ besitzen. Vermutlich ist die größere sterische Ausdehnung der Sulfonyl- gegenüber der Carbonylgruppe sowie die andere Stereochemie der Sulfonamidgruppe im Vergleich zur Amidgruppe (90° vs. 0° , 180°) störend.

Ein Ersatz des *Spacers* 3-Aminobenzoessäure durch die räumlich anspruchsvollere Aminophenyllessigsäure bzw. Aminomethylbenzoessäure in RGD-Mimetika führte ebenfalls zu inaktiven Verbindungen (**92**, **93**) (Tab. 10.2).

7.3.2 Modifikation des C-Terminus

Die Verbindung 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-1-yl-essigsäure (**99**) stellt ein konformativ eingeschränktes Derivat der 3-Amino-3-phenylpropionsäure dar und wurde bereits in $\alpha 4\beta 7$ -Integrinantagonisten als Asp-Thr-Strukturtemplat eingebaut.^[332] Im Rahmen dieser Arbeit wurde die von D. Gottschling freundlicherweise zur Verfügung gestellte Verbindung **99** in RGD-Mimetika integriert. Das Ringgerüst konnte nach einer literaturbekannten Methode durch eine Bischler-Napieralski Reaktion aus Phenylethylamin **94** aufgebaut werden.^[384] In einer Knoevenagel-analogen Reaktion wurde das 3,4-Dihydroisochinolin (**96**) mit Malonsäure (**97**) umgesetzt.^[385] Abschließend erfolgte *N*-terminal die Einführung der Fmoc-Schutzgruppe (Schema 7.11).



Schema 7.11: Synthese von *N*-Fmoc-geschützter 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-1-yl-essigsäure (**99**) von D. Gottschling.^[332]

Als weiteres Tetrahydroisochinolinderivat wurde die käuflich erhältliche 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3(*S*)-yl-essigsäure (**100**, Abb. 7.13) als *C*-terminale Versteifung eingeführt.

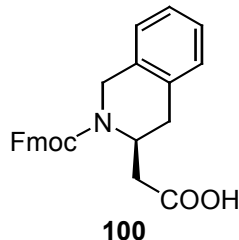


Abb. 7.13: Käuflicher *N*-Fmoc-geschützter Säurebaustein 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin-3(*S*)-yl-essigsäure (**100**).

Bei der Synthese der entsprechenden RGD-Mimetika (**99a**, **b** und **100a**, **b**) wurde in Gegenwart der rigiden Aminosäurederivate wie bei der Darstellung der Sulfonamide zunächst Glycin verwendet. Die Untersuchung der αv -Integrinaffinitäten in isolierten Rezeptorassays zeigte den Verlust der Affinität durch den Einbau der Tetrahydroisochinolinderivate (Tab. 7.4).

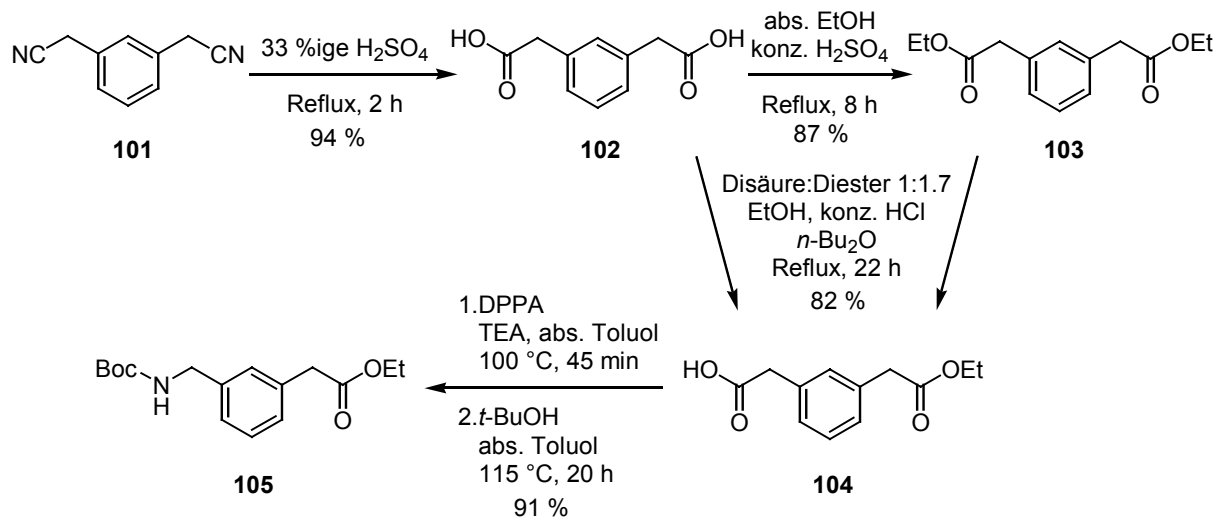
Tab. 7.4: Inhibierung der Integrinaffinitäten in Prozent bei angegebener Peptidkonzentration.

Verb.	Isochinolin ^a	Base ^b	Spacer ^c	Integrin [nM-Konz., % Inhibierung]			
				$\alpha v \beta 3$	$\alpha v \beta 5$	$\alpha v \beta 6$	$\alpha II b \beta 3$
99a	1-Thich	Gua	aryl	10 ⁴ , 10 %	10 ⁴ , 0 %	10 ⁴ , 12 %	10 ⁴ , 3 %
99b	1-Thich	Apy	alkyl	10 ⁴ , 12 %	10 ⁴ , 0 %	10 ⁴ , 10 %	10 ⁴ , 6 %
100a	3-Thich	Gua	aryl	10 ⁵ , 22 %	10 ⁵ , 12 %	10 ⁵ , 2 %	10 ⁵ , 10 %
100b	3-Thich	Apy	alkyl	10 ⁵ , 60 %	10 ⁵ , 13 %	10 ⁵ , 2 %	10 ⁵ , 3 %

^a 1-Thich = Tetrahydroisochinolin-1-yl-essigsäure; 3-Thich = Tetrahydroisochinolin-3(S)-yl-essigsäure; ^b Gua = Guanidin, Apy = Aminopyridin; ^c aryl = 1,3-subst. Benzol, alkyl = -(CH₂)₄-.

Eine weitere Möglichkeit der Erhöhung der Rigidität des *Backbones* bietet der Ersatz der C-terminalen Amidbindung durch einen Aromaten. Die Darstellung der entsprechenden Derivate erfolgte in Lösung, da der kombinierte Glycinsäurebaustein **AB** bei der Synthese als Ester **105** anfiel und eine Anbindung an die feste Phase für nur ein bzw. zwei Syntheseschritte keinen ausreichenden Vorteil gebracht hätte.

Das käufliche Phenyldiacetonitril **101** wurde zur Disäure hydrolysiert, in Ethanol zu **103** verestert. Aus diesen beiden Substanzen konnte nach einer Literatur bekannten Methode der Baustein **104** synthetisiert werden (Schema 7.12).^[386] Im letzten Schritt wird die Carboxylgruppe mittels DPPA in ein Isocyanat umgewandelt und durch Zugabe von *tert*-Butanol die Boc-Schutzgruppe eingeführt.^[387] Für weitere Reaktionen kann diese Aminoschutzgruppe in Lösung sauer abgespalten und von dem Produkt im Vakuum rückstandslos entfernt werden.



Schema 7.12: *Synthese des kombinierten Glycin-Säurebausteins 105.*^[386, 387]

Die weitere Umsetzung von **105** mit dem kombinierten *Spacer*-Basenbaustein 5-[*N*-(4-Methylpyridin-2-yl)-amino]-pentansäure (**55**) unter Zugabe von EDCI·HCl und DIPEA führte nach Esterhydrolyse mit 1N NaOH und Isolierung mit Hilfe von HPLC zu der Verbindung **106** in einer Ausbeute von 98 %. Die Kupplung von 3-(*N*-Boc)-Aminobenzoesäure an den Glycin-Säurebaustein, ebenfalls mittels EDCI·HCl und DIPEA, anschließende Boc-Entschützung, Guanylierung und Entfernung der Schutzgruppen ergab nach HPLC-Reinigung Verbindung **107** in 4 % Ausbeute.

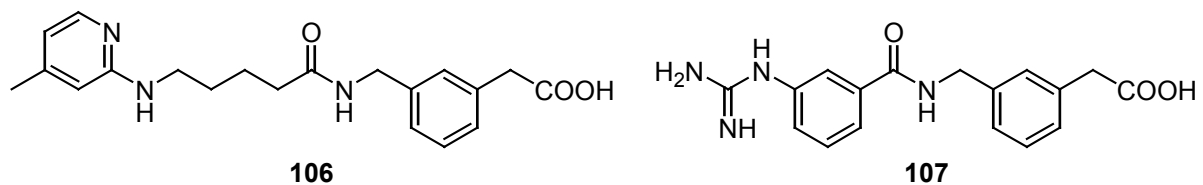


Abb. 7.14: *Verbindungen 106 und 107.*

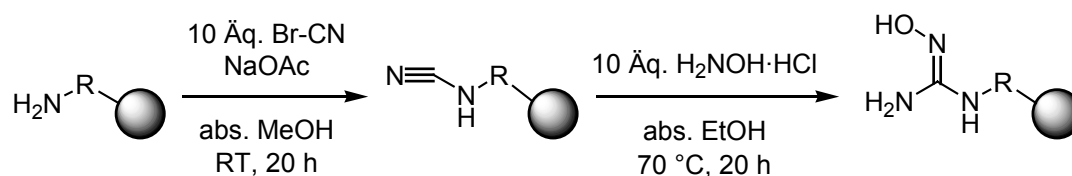
Diese in Abb. 7.14 dargestellten Derivate zeigten im Bindungsassay keine Interginaffinitäten im nanomolaren Bereich (Tab. 10.2). Zuerst wurde vermutet, dass durch Fehlen eines weiteren C-terminalen Phenylrings die Affinität verloren geht. Von A. Meyer durchgeführte *Docking*studien am $\alpha\beta 3$ -Integrin^[79, 318-320] ergaben aber für die Verbindung **107** kein bevorzugtes Bindungsmotiv. Durch den C-terminalen Phenylring wird das Rückgrat vermutlich derart versteift, dass keine ausreichende Bindung mit dem Rezeptor zustande kommt.

Eine eingehendere systematische Untersuchung bzgl. verschiedener Ringgrößen und Zyklisierungspositionen wurde nicht weiter verfolgt. Die bisherigen Resultate

zeigen, dass die Verwendung von zyklischen Säurebausteinen in RGD-Mimetika von den Integrinrezeptoren $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ und $\alpha\beta6$ nicht toleriert wird.

7.4 Ein Hydroxyguanidin-Mimetikum als Prodrug

In diesem Kapitel werden die Synthese und die *in vivo*-Studien eines Hydroxyguanidin-Mimetikums als *Prodrug* vorgestellt. Hydroxyguanidine sind als *Prodrugs* bekannt und werden in Form des Thrombininhibitors Ximelagatran[®] dieses Jahr in den Markt eingeführt.^[361-364] Sie haben u.a. eine verbesserte Absorption und Verteilung des Wirkstoffes im Organismus (Kapitel 3.2). Dieses *Prodrug*-Konzept wurde am Beispiel des hochaffinen aza-RGD-Mimetikum **49** untersucht. Die Herstellung des *Prodrugs* wurde für die Festphase konzipiert. Die Synthese erfolgte aufgrund der Reaktionsbedingungen am HL-PHB-TentaGel-Harz, da dieses durch den zusätzlichen PEG-Linker noch gute Quelleigenschaften in Methanol und Ethanol besitzt und die Verbindung erst unter stark sauren Bedingungen (TFA:TIPS:H₂O = 95:2.5:2.5) von dem *p*-Hydroxybenzylalkohollinker abgespalten wird. Nach der Belegung des Harzes mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäure (**52**) erfolgte die bereits beschriebene Umsetzung mit dem aza-Glycinbaustein **35** und dem aromatischen *Spacer*baustein **35** (Kapitel 6.3). Die Hydroxyguanidinfunktion konnte durch Übertragen einer klassischen Methode zur Darstellung von Hydroxyguanidinen in Lösung^[388-391] auf die Festphase generiert werden (Schema 7.13).



Schema 7.13: Synthese von Hydroxyguanidinderivaten an der Festphase in Analogie zu klassischen Methoden.^[388-391]

Das *Prodrug* **49OH** wurde nach HPLC-Reinigung in einer Ausbeute von 16 % erhalten. Außerdem wurde das von G. Sulyok beschriebene RGD-Mimetikum **49** als Referenz für *in vitro*- und *in vivo*-Assays synthetisiert.

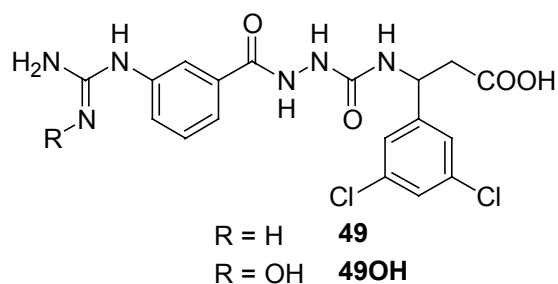


Abb. 7.15: Hydroxyguanidinprodrug **49OH** und analoges aza-RGD-Mimetikum **48**.

Ein Vergleich der beiden Verbindungen in dem isolierten Rezeptorbindungsassay zeigt (Tab. 7.5), dass die Affinität von **49OH** durch die Guanidinmodifikation gegenüber dem $\alpha v \beta 6$ -Integrinrezeptor nicht und gegenüber dem $\alpha v \beta 3$ -Integrinrezeptor nur gering beeinflusst wird.

Tab. 7.5: Affinität und Selektivität der RGD-Mimetika gegenüber verschiedenen Integrinen.

Verb.	Integrin, IC ₅₀ [nM]			
	$\alpha v \beta 3$	$\alpha v \beta 5$	$\alpha v \beta 6$	$\alpha IIb \beta 3$
49	1.0	10 ³ , 69 %	1.4	10 ⁴ , 62 %
49OH	5.5	10 ³ , 38 %	1.6	10 ⁴ , 16 %

Die Reduktion von **49OH** zu Guanidin **49** wurde in einem *in vitro*-Assay mit verschiedenen Enzymen untersucht. Hierfür wurde eine HPLC-Analytik entwickelt und anhand der Referenz **49** eine Kalibrierung vorgenommen. Anschließend wurde **49OH** mit verschiedenen Enzymquellen, welche solche Reduktionen *in vivo* katalysieren, inkubiert. Die in Abb. 7.16 dargestellten Ergebnisse wurden aus 2 Ansätzen jeweils zweimal ermittelt.

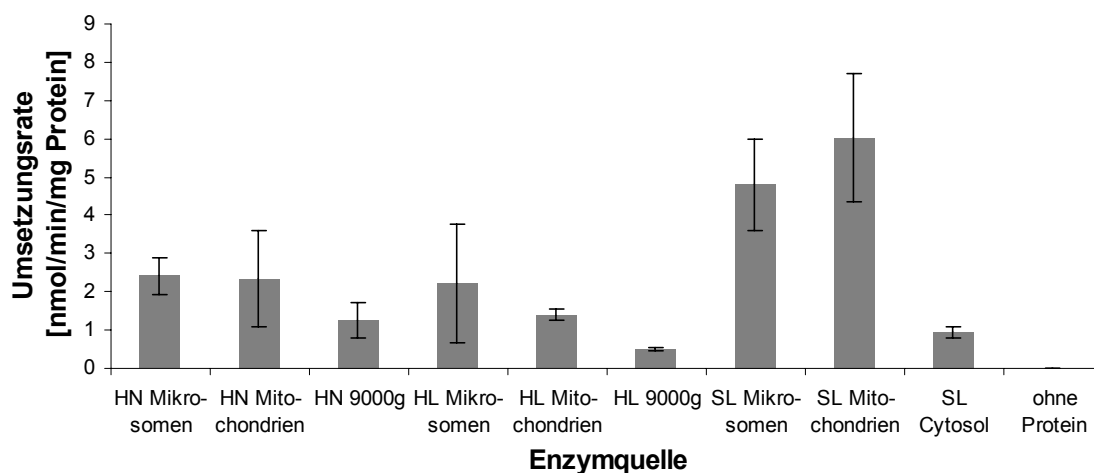


Abb. 7.16: Ergebnisse der Umsetzung von **49OH** zu **49** mit Proteinen als Enzymquellen; H: Human, N: Niere, L: Leber, S: Schwein, 9000g: Überstand der 9000g-Zentrifugation.

Die Umsetzungsdaten zeigen eine umfangreiche Reduktion von Hydroxyguanidin **49OH** zu Guanidin **49**. Der Überstand der 9000g-Zentrifugation und Cytosol reduzieren auch andere Verbindungen nur schlecht.^[392] Dies lässt auf eine Verwendbarkeit von **49OH** als *Prodrug* für **49** schließen.

Das *Prodrug*-Konzept wurde außerdem durch *in vivo*-Untersuchungen des pharmakokinetischen Wirkstoffprofils an Ratten überprüft (siehe auch Kapitel 7.2.9). Die beiden Verbindungen **49** und **49OH** wurden den Ratten einzeln oder als Mischung mit anderen Verbindungen in geringen Konzentrationen injiziert (0.2 mg/kg Körpergewicht) oder oral verabreicht (0.5 mg/kg Körpergewicht). Die Bestimmung der Wirkstoffkonzentration im Blut wurde mittels gekoppelter LC-MS-Analyse durchgeführt, wobei innerhalb eines Tages sieben Messwerte nach 0.1, 0.5, 1, 2, 4 und 6 Stunden aufgenommen wurden. Durch graphische Darstellung der gemittelten Werte von drei Ratten erhält man die in Abb. 7.17 dargestellten Plasmaspiegelkurven.

Die Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen sind in Tab. 7.6 dargestellt. Anhand der AUC-Werte (*area under curve*), die sich aus der graphischen Darstellung der Wirkstoffkonzentrationen ergeben, werden die Halbwertszeit $t_{1/2}$, die Clearance CL, sowie die orale Bioverfügbarkeit BV berechnet.

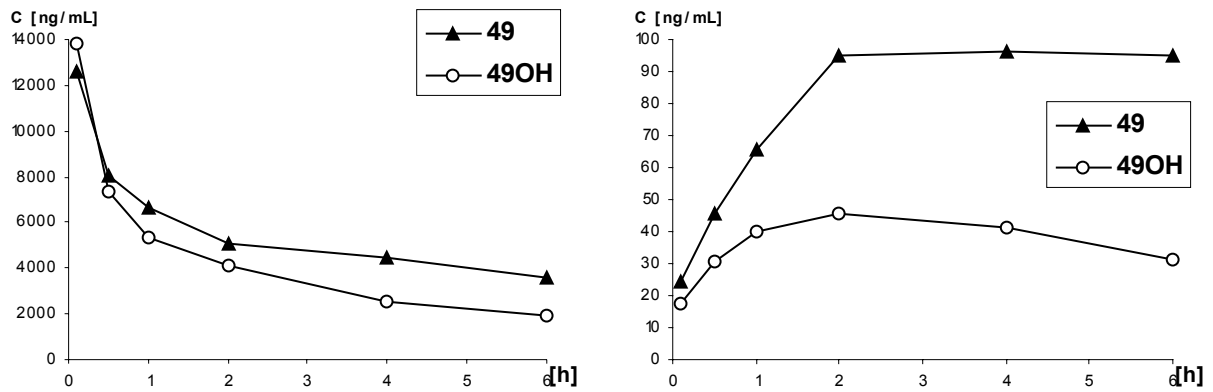


Abb. 7.17: Plasmaspiegelkurven nach intravenöser (i.v., 0.2 mg/kg) und peroraler (p.o., 0.5 mg/kg) Applikation in Ratten ($N = 3$).

Tab. 7.6: Pharmakokinetische Parameter des Guanidin- **49** und des Hydroxyguanidin-Mimetikums **49OH**.^a

Verb.	log P	AUC _{i.v.}	AUC _{p.o.}	$t_{1/2}$ ^b	CL ^b	BV
		[ng/mL·h]	[ng/mL·h]	[h]	[liter/h/kg]	[%]
49	1.82	32500	503	3.97	0.02	<5
49OH	1.98	24400	228	2.50	0.03	<5

^a Mittelwert von je drei Versuchstieren; ^b diese Parameter beziehen sich auf intravenöse Applikation.

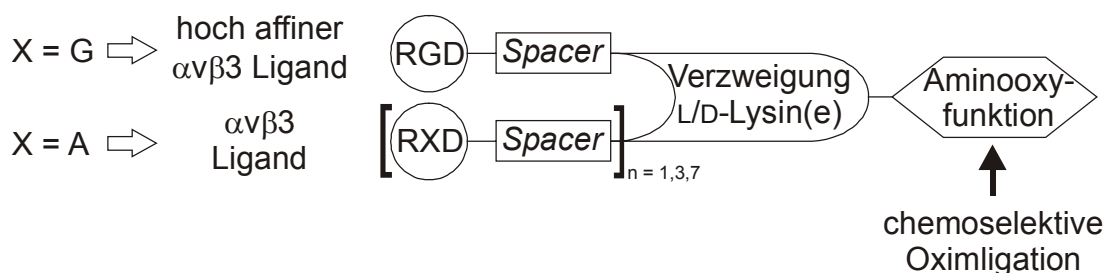
Die orale Verfügbarkeit von **49** und **49OH** ist mit einem Wert unter 5 % nur gering, da die Substanzen sehr polar ($\log P < 5$) und von hoher Basizität sind. Überraschenderweise wird das *Prodrug* nach oraler Verabreichung deutlich schlechter resorbiert als **49** selbst. Die AUC_{p.o.} ist um mehr als die Hälfte geringer. Dies spiegelt sich auch in dem schlechteren log P -Wert (1.98 vs. 1.82). wieder. Die Hydroxyguanidinverbindung besitzt ebenso wie **49** eine geringe Clearance, die Metabolisierung zur Guanidinverbindung verläuft jedoch mit etwa 10 % nach intravenöser Applikation nur sehr langsam. Nach oraler Gabe wird nur ein Drittel des Plasmaspiegels des Hydroxyguanidin-*Prodrugs* erreicht. Diese Studie zeigt, dass eine orale Applikation von **49OH** zu keiner ausreichenden Menge an Wirkstoff **49** führt.

Aufgrund der Ergebnisse der *in vitro*- und *in vivo*-Studien wurde eine Kombination des Hydroxyguanidins mit einem Carbonsäureester in einem RGD-Mimetikum als doppeltes *Prodrug* nicht weiter verfolgt.

8 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Entwicklung monomerer und multimerer, hoch affiner und selektiver $\alpha v \beta 3$ -Integrinliganden. Im Mittelpunkt steht dabei das gezielte Adressieren der $\alpha v \beta 3$ -exprimierenden Tumoren bei der Tumordiagnostik und -therapie mittels dieser Liganden als *Tracer*. Die hierdurch erzielte kontrastreiche Darstellung maligner Tumoren ermöglicht deren Nachweis und Stadieneinteilung, die Dosierung von Chemotherapeutika bzw. Endoradiotherapeutika sowie die Kontrolle des Therapieeffektes.

Die hergestellten multimeren peptidischen $\alpha v \beta 3$ -Liganden sind aus mehreren zyklischen RGD-Peptiden der Form $c(-\text{RGDfE}-)$ bzw. $c(-\text{RADfE}-)$, einem *Spacer* (ein bzw. mehrere Einheiten Ahx oder Hegas), der für einen ausreichenden Abstand der einzelnen Bindungsregionen sorgt, einer Verzweigungseinheit und einer funktionellen Gruppe zur Radiomarkierung mittels chemoselektiver Oximligation aufgebaut:



Die einfach bindenden Multimere ($X = A$; $n = 1, 3 \neq 7$) dienen als Kontrollverbindungen zu den multivalenten Analoga. Die Radiomarkierung erfolgte einerseits mit ^{125}I , wobei hier in der Konjugation 4-Trimethylstannylbenzaldehyd als Vorläufer eingesetzt wurde, und andererseits mit ^{18}F , das direkt durch Ligation mit 4- ^{18}F Fluorbenzaldehyd eingeführt werden konnte. In Zusammenarbeit mit T. Poethko *et al.* wurde hierfür eine schnelle, sehr effiziente Methode entwickelt. Sie eröffnet völlig neue Perspektiven für den routinemäßigen Einsatz von ^{18}F Fluor in der Klinik. Die *in vivo*-Biodistributionsstudien in Tumormausmodellen (M21, M21-L) von Dimer **D2 ^{18}F** und Tetramer **T2 ^{18}F** ($X = G$, ein Hegas, ein bzw. zwei L-Lysine und ^{18}F -markiert) zeigten eine schnellere *Clearance* des Tetramers, während die Aufnahme der *Tracer* im M21 Melanom 120 min *p.i.* nahezu gleich blieb (**D2 ^{18}F** : 1.6 ± 0.7 % ID/g,

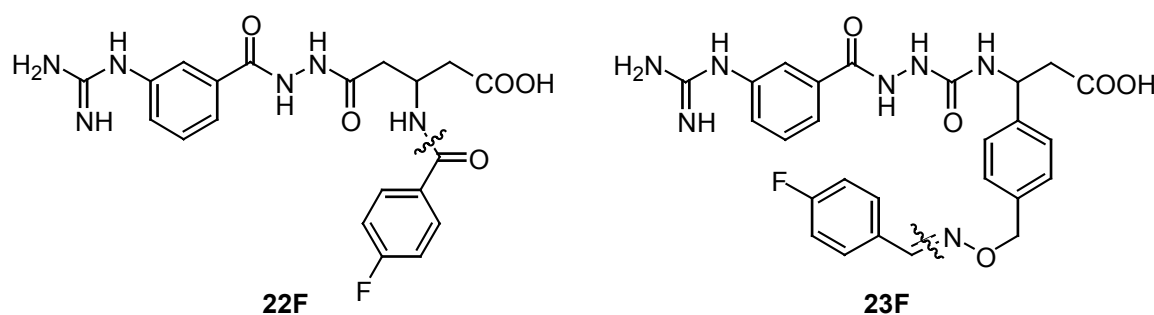
T2¹⁸F: 1.7 ± 0.1 % ID/g). Die hieraus resultierenden hervorragenden Tumor/Hintergrund-Verhältnisse (**T2¹⁸F**: Tumor/Blut 21.25 ± 11.76 , Tumor/Muskel 23.12 ± 3.63) ermöglichten eine kontrastreiche PET-Aufnahme des $\alpha\beta3$ -positiven Tumorgewebes (M21) in der Maus. Die Spezifität der Anreicherung konnte in einer Blockadestudie (i.v. Gabe von 18 mg *c*(-RGDfV-) 10 min vor *Tracer*injektion) nachgewiesen werden. Eine Metabolitenanalyse ergab eine hinreichende Stabilität von **T2¹⁸F**. Somit ist das im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte, ¹⁸F-markierte, tetravalente RGD-Peptid **T2¹⁸F** momentan der vielversprechendste *Tracer* zur nicht-invasiven Bestimmung der $\alpha\beta3$ -Integrinexpression in Melanomen.

Durch die Synthese einfach bindender Multimere (**d**, **t1**, **t2**) wurden biologische Studien ermöglicht, die eine Aussage über den Effekt (pharmakokinetisch vs. kooperativ) treffen können, welcher zu der verbesserten Biodistribution von **T2¹⁸F** verglichen mit **D2¹⁸F** führte. Zudem ist eine erhöhte proteolytische Stabilität von **T2¹⁸F** durch sein Analogon **T3** zu erwarten, da dieses als Verzweigungseinheit das nicht natürliche D-Lysin enthält. Aufgrund der hergestellten multimeren RGD-Peptide mit längeren *Spacern* (**D3**, **T4**) besteht die Möglichkeit der Optimierung der räumlichen Anordnung und des Abstands der Bindungsregionen. Durch die Verfügbarkeit einer größeren Zahl an Bindungsregionen in Form eines Oktamers (**O1**, **O2**) wurde auch eine weitere Steigerung der Anreicherung in $\alpha\beta3$ -positivem Tumorgewebe in Aussicht gestellt.

Darüber hinaus wurden die aminoxyfunktionalisierten multimeren RGD-Peptide durch Konjugation zu einem Amin umgesetzt und somit für $\alpha\beta3$ - und $\alpha\beta5$ -Integrinbindungsstudien mittels Oberflächenplasmonfluoreszenzspektroskopie (SPFS) an einem Modellsystem für biologische Membranen bereitgestellt.

Als Alternative zu den radioaktiv markierbaren Peptiden wurden die strukturell minimierten RGD-Mimetika neben den für die Wechselwirkung mit dem $\alpha\beta3$ -Integrin essentiellen terminalen Säure- und Basenfunktionen zusätzlich mit einer funktionellen Gruppe am Asp-Mimetikum modifiziert. Diese stellt einerseits eine Aminogruppe zur Radiomarkierung mit [¹⁸F]SFB und andererseits eine Aminoxygruppe zur Konjugation mit 4-[¹⁸F]Fluorbenzaldehyd dar. Die Untersuchung der

Biodistribution von **22**¹⁸F ([¹⁸F]GBHO-2, $\alpha\text{v}\beta\text{3}$: 8.2 nM) in Tumormausmodellen zeigte eine spezifische Anreicherung in $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -positiven Tumoren. PET-Aufnahmen belegen, dass diese Verbindung eine interessante Alternative zu dem tetravalenten RGD-Peptid **T2**¹⁸F und insbesondere zu [¹⁸F]Galacto-RGD^[205] darstellt. Ob das ¹⁸F-Analogon des hoch affinen und $\alpha\text{v}\beta\text{3}/\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -selektiven aza-RGD-Mimetikums **23**F ($\alpha\text{v}\beta\text{3}$: 2.1 nM) ebenfalls ein großes Potential für die PET besitzt, wird in weiterführenden Arbeiten evaluiert.



In Hinblick auf die Entwicklung von Tumorthapeutika wurden u.a. in ihrer Konformation eingeschränkte, nicht-peptidische $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Liganden sowie ein Prodrug synthetisiert und *in vitro* und *in vivo* auf ihre Aktivität, Selektivität sowie orale Bioverfügbarkeit untersucht. Eine C-terminale Versteifung des Rückgrates erfolgte durch den Einbau von zyklischen β -Aminosäuren als Asp-Mimetikum bzw. von Aromaten als Asp-Gly-Mimetikum sowie die Substitution der Amidbindung durch das bioisostere Sulfonamid. In den biologischen Studien zeigte sich, dass diese Modifikationen der Liganden von den Integrinrezeptoren $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ und $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ nicht toleriert werden. Hingegen resultierten aus dem Einsatz verschiedener Guanidin-Mimetika Verbindungen mit (sub-)nanomolarer Affinität gegenüber dem $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrinrezeptor und hauptsächlich $\alpha\text{v}\beta\text{3}/\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -biselektivem Charakter. Die Bestimmung der Pharmakokinetik durch *in vivo*-Studien mit Ratten ergab eine orale Bioverfügbarkeit von kleiner gleich 5 %. Durch *in vitro*-Assays konnte eine umfangreiche Reduktion des synthetisierten Hydroxyguanidin-*Prodrugs* **49OH** zu dem guanidinhaltigen RGD-Mimetikum **49** beobachtet werden. Dieses Ergebnis konnte mittels *in vivo*-Untersuchungen durch Bestimmung der Pharmakokinetik nicht bestätigt werden, da nach intravenöser Applikation 10 % von **49OH** zu dem Wirkstoff **49** metabolisiert wurden.

9 EXPERIMENTELLER TEIL

9.1 Material und Methoden

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 eingesetzten **Reagenzien** stammten von den Firmen *Aldrich*, *Fluka*, *Sigma*, *Merck* und *Lancaster*, entsprachen der Qualität „zur Synthese“ oder „per analysis“ und wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die **Aminosäure-**, **Schutzgruppen-** **derivate** und **Kupplungsreagenzien** wurden, falls nicht selbst hergestellt, von den Firmen *Aldrich*, *Advanced ChemTech*, *Alexis*, *Bachem*, *Merck*, *Neosystem*, *NovaBiochem*, *PepTech Corporation*, *Quantum Biotechnologies* und *Synthetech* bezogen. Die für die Festphasensynthese verwendeten **Harze** stammten von *PepChem* (Tübingen) (Tritylchlorid-Polystyrol-Harz), *NovaBiochem* (WANG-Harz) und *Rapp Polymere* (HL-PHB-TentaGel-Harz). Palladium/Aktivkohle war eine Stiftung der Firma *Degussa*.

Sämtliche **hydrolyse-** oder **luftempfindliche Reaktionen** wurden in ausgeheizten Glasgeräten in einer Argonatmosphäre (99.996 %) durchgeführt. Lösungen wurden zu diesen Ansätzen über Gummisepten zugegeben. Bei **lichtempfindlichen Reaktionen** wurde direkte Lichteinstrahlung durch Umhüllen der Reaktionsgefäße mit Alufolie vermieden.

Die **Festphasensynthesen** wurden in Schüttelgefäßen aus Glas (>1 g Harz) oder in 2, 5, 10 oder 20 mL-Kunststoffspritzen mit PE-Fritten der Firma *Vetter-Laborbedarf* (Tübingen) durchgeführt. Die Durchmischung der Harzsuspension erfolgte durch Rotieren der Spritzen oder Schütteln von Schüttelgefäßen. **Festphasenreaktionen bei höheren Temperaturen** führte man in 2 bzw. 4 mL Schraubflaschen in kombinierten Heiz- und Schüttelapparaturen der Firma *IKA*, KS 125 oder KS 130 basic durch.

Dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle (DC-Kontrolle) und R_f -Wert-Bestimmung erfolgte auf mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichteten Aluminiumfolien der Firma *Merck* mit unterschiedlichen Laufmittelgemischen. Die Detektion erfolgte anhand UV-Absorption bei 254 nm sowie durch Eintauchen in Ninhydrinlösung (0.3 g Ninhydrin, 3 g Essigsäure, 100 ml Ethanol) oder Molybdätophosphorsäurelösung (6.25 g Phosphormolybdänsäure, 2.5 g Cer(IV)-Sulfat, 15 ml konz. Schwefelsäure, 235 ml H₂O) 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 - 1.4 bar Überdruck durchgeführt.

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

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

Als Eluent dienten Laufmittelgemische aus Wasser (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B) mit jeweils 0.1 Vol-% TFA im Gradientenbetrieb. Es wurden unterschiedliche lineare Gradientenprofile innerhalb von 30 Minuten verwendet. Im Fall der Anlage Äkta Basic 100F der Firma *Amersham Pharmacia Biotech* bestand Laufmittel B gerätebedingt aus 90 % Acetonitril und 10 % H₂O mit jeweils 0.1 Vol-% TFA. Die Flussraten betragen 1 mL/min (analytisch), 8 mL/min (semipräparativ) und 25 mL/min (präparativ). Die UV-Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 220 und 254 nm.

Massenspektren wurden durch Laser-Desorption (MALDI), Elektronenspray Ionisation (ESI), Elektronenstoß Ionisation (EI) oder Chemische Ionisation (CI) erhalten. **ESI-MS** 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: Omnicrom YMC ODS-A C₁₈ (120 Å, 3 µm, 125 mm × 2 mm), Flußrate 0.2 mL/min) durchgeführt. Als Eluent dienten Laufmittelgemische aus H₂O und Acetonitril mit jeweils 0.1 Vol-% Ameisensäure im Gradientenbetrieb. Es wurden unterschiedliche lineare Gradientenprofile innerhalb von 15 Minuten verwendet. **CI-MS** Messungen erfolgten durch H. Krause an einem Gerät der Firma *Finnigan* vom Typ MAT 8200 (Direkteinlass, 70 eV), ebenso wie die **MALDI-MS** Untersuchungen am *Bruker* BILFEX III im *reflector mode* (α -Cyanohydroxymizsäure). Die ESI-Spektren werden in der Form „**X** [**M** + **Z**]⁺“ bzw. bei mehrfacher Ladung in der Form „**X** [(**M** + **nZ**)/**n**]ⁿ⁺“ angegeben. Die Detektion der Molekülmasse **X** entspricht dabei dem positiv geladenen Anlagerungsprodukt des untersuchten Moleküls mit dem Molekulargewicht **M** und dem Kation **Z** bzw. den **n** Kationen **Z** geteilt durch **n**.

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

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

Die **NMR-Spektren** wurden an den Geräten der Firma *Bruker* AC 250 und DMX 500 bei 300 K aufgenommen. Die verwendeten Pulsprogramme stammen aus der *Bruker* Bibliothek oder wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe geschrieben. Interner Standard für chemische Verschiebungen von ^1H und ^{13}C war das Lösungsmittelsignal von DMSO- d_5 für ^1H ($\delta = 2.49$ ppm) und DMSO- d_6 für ^{13}C ($\delta = 39.5$ ppm) bzw. CHCl_3 für ^1H ($\delta = 7.24$ ppm) und CDCl_3 für ^{13}C ($\delta = 77.0$ ppm) bzw. 3-Trimethylsilyl- d_4 -propionsäure Natriumsalz bei D_2O . ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit ^1H -Breitbandentkopplung aufgenommen. Die Signal- und Konfigurationszuordnung erfolgte teilweise mit Hilfe verschiedener 2D-Experimente (TOCSY, DQF-COSY, HMBC).^[393]

Die **log*P***-Werte, Logarithmen der Verteilungskoeffizienten einer Substanz zwischen *n*-Octanol und Wasser, wurden mithilfe der Software ChemDraw Ultra 6.0 nach der von Crippen *et al.* vorgeschlagenen Fragmentierungsmethode berechnet.^[155]

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

9.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Belegung von TCP-Harz

Zu trockenem TCP-Harz (maximale Belegungsdichte 0.9 mmol/g, 1.0 g) werden *N*-terminal geschützte Aminosäure bzw Säurebaustein (1.2 bis 1.5 mmol), trockenes CH_2Cl_2 (8 mL) und DIPEA (3 mmol) hinzugefügt. Zum *Cappen* von nicht umgesetzten Trityl-Gruppen werden nach 1 h Schütteln DIPEA (0.5 mL, 3 mmol) und Methanol (3 mL) zugesetzt und weitere 15 min geschüttelt. Das Harz wird über eine Fritte abgesaugt und mit CH_2Cl_2 (3 x 8 mL, je 3 min), NMP (3 x 8 mL, je 3 min), und nochmals mit CH_2Cl_2 (3 x 8 mL, je 3 min) gewaschen. Beim letzten Waschschrift gibt man sukzessive kleinere Mengen Methanol zu und wäscht abschließend mit reinem

Methanol (2 x 8 mL, je 3 min). Nach Trocknen des Harzes über Nacht im Hochvakuum wird die Belegungsdichte nach folgender Formel bestimmt:

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

n	Belegungsdichte [mmol / g belegtes Harz]
m_{ges}	Gesamtmasse des Harzes nach der Belegung [g]
m_{Harz}	Masse des eingesetzten Harzes [g]
M_{Xxx}	Molmasse der Aminosäure [g/mol]
M_{HCl}	Molmasse HCl (36.461 g/mol)

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

AAV 2: Belegung von OH-funktionalisierten Harzen nach Blankemeyer-Menge *et al.*:^[394]

Die Quellung des Harzes erfolgt jeweils 5 min mit trockenem DMF und anschließend mit trockenem CH₂Cl₂. Zu einer 0.1 M Lösung aus *N*-Fmoc-geschützter, wasserfreier Aminosäure (1.5-2 Äq.) (Fmoc-Aminosäuren mit Kristallwasser werden zuvor aus Dioxan lyophilisiert) in trockenem CH₂Cl₂ fügt man *N*-Methylimidazol (1.5 Äq.) und MSNT (2 Äq.) hinzu. Falls die Fmoc-Aminosäure nur sehr schlecht löslich sein sollte, so wird zusätzliches *N*-Methylimidazol zugegeben. Diese Lösung wird zum Harz gegeben. Nach 1 h wird das Harz mit CH₂Cl₂ (3 x je 3 min) und DMF (3 x 3 min) gewaschen. Nicht umgesetzte OH-Gruppen werden mit einer Lösung aus Essigsäureanhydrid (2 mL), DIPEA (3.4 mL) und DMF (30.6 mL) *gecappt*. Abschließend wird das Harz jeweils mit NMP (3 x 3 min), Methanol (3 x 3 min) und CH₂Cl₂ (3 x 3 min) gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Die Bestimmung der Beladung erfolgt gravimetrisch (AAV xx).

AAV 3: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe:

Das Harz (1 g) wird für 5 min mit NMP (1 x 10 mL) gequollen. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt mit 20 %-iger Piperidin/NMP Lösung (2 x 10 mL) zuerst 5 min danach 15 min. In Gegenwart von ivDde-Schutzgruppen erfolgt die Fmoc-

Entschützung nur zweimal 5 min, da sonst eine Teilabspaltung der ivDde-Schutzgruppen erfolgt. Das Harz wird anschließend mit NMP (5 x 10 mL, je 3 min) gewaschen.

AAV 4: Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe:

Das Harz (1 g) wird für 5 min mit NMP (1 x 10 mL) gequollen. Die Abspaltung der ivDde-Schutzgruppe erfolgt mit 2 %-iger Hydrazin/NMP Lösung (2 x 10 mL, je 5 min). Das Harz wird anschließend mit NMP (5 x 10 mL, je 3 min) gewaschen.

AAV 5: Festphasensynthese linearer Peptide mit Fmoc/*tert*-Butyl-Schutzgruppenstrategie

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

Schritt	Reagenzien	Operation	Zeit / min
1	NMP	waschen	1 x 3
2	20% Piperidin / NMP	Fmoc-Abspaltung	1 x 5
3	20% Piperidin / NMP	Fmoc-Abspaltung	1 x 15
4	NMP	waschen	4 x 2
5	Fmoc-AS-OH Kupplungsreagenz/Base	kuppeln	1 x 60 - 90
6	NMP	waschen	4 x 2

Wird die Synthese an einer Stelle unterbrochen, so wäscht man das Harz mit NMP (5 x 3 min), CH₂Cl₂ (5 x 3 min), und trocknet es im Vakuum. Vor der Abspaltung des Peptids vom Harz wird die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe analog der Schritte 1-3 des Fließschemas entfernt.

AAV 6: Kupplung mit TBTU/HOBt:

Das harzgebundene freie Amin wird mit einer 0.1-0.2 M Lösung aus *N*-Fmoc-geschützter Aminosäure (2 – 2.5 Äq. bezogen auf freien N-Terminus an der Festphase im Schüttelgefäß), TBTU und HOBt (jeweils 1 Äq. bezogen auf die Aminosäure) und

DIPEA (pH 8 – 9, 5.2 – 5.6 Äq. bezogen auf die Aminosäure) in NMP versetzt. Die Kupplungsdauer beträgt 60 min. Anschliessend wird das Harz mit NMP (5 x 3 min) gewaschen.

AAV 7: Kupplung mit HATU/HOAt:

Das harzgebundene freie Amin wird mit einer 0.1-0.2 M Lösung aus *N*-Fmoc-geschützter Aminosäure (2 – 2.5 Äq. bezogen auf freien N-Terminus an der Festphase im Schüttelgefäß), HATU und HOAt (jeweils 1 Äq. bezogen auf die Aminosäure) und *sym*-Collidin (25 Äq. bezogen auf die Aminosäure) in NMP versetzt. Die Kupplungsdauer beträgt 60 min. Anschliessend wird das Harz mit NMP (5 x 3 min) gewaschen.

AAV 8: Abspaltung seitenkettengeschützter Verbindungen vom TCP-Harz

Nach Waschen des Harzes (0.25 g) mit CH₂Cl₂ (4 x 2 mL, je 2 min) erfolgt die Abspaltung durch

- a) CH₂Cl₂:HOAc:TFE (3:1:1) 1 x 60 min, 1 x 30 min und 2 x 10 min oder
- b) 20 % HFIP in CH₂Cl₂ 5 x 20 min.

Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum eingeeengt und der Rückstand bei (a) zweimal mit Toluol koevaporiert. Abschließend lyophilisiert man aus *tert*Butanol/Wasser.

AAV 9: Abspaltung vollständig entschützter Verbindungen vom TCP-Harz

- a) Das Harz (0.25 g) wird mit CH₂Cl₂ (4 x 2 mL, je 2 min) gewaschen und mit einem 47.5:47.5:5-Gemisch aus CH₂Cl₂, TFA und TIPS (2 mL) für 1.5 h versetzt. Anschliessend wird mit einem 1:1 Gemisch CH₂Cl₂:TFA gewaschen (1 x 30 min, 1 x 10 min), die vereinigten Filtrate im Vakuum eingeeengt und der Rückstand aus *tert*Butanol/Wasser lyophilisiert.
- b) Das Harz (0.25 g) wird zunächst mit CH₂Cl₂ (4 x 2 mL, je 2 min) gewaschen. Vor der Zugabe der Abspatlösung werden ca. 250 µL TIPS in wenig CH₂Cl₂ zu dem Harz hinzugefügt. Anschliessend erfolgt die Abspaltung vom Harz mit einem Gemisch aus 95 % TFA und 5 % Wasser (3 x 2 mL, je 5 min). Wird das

Harz nicht entfärbt, so wird zusätzlich TIPS zur Abspatlösung gegeben. Die vereinigten Filtrate werden noch 3 h unter gelegentlichem Schütteln stehen gelassen. Anschließend wird das Lösungsmittel im Hochvakuum bei 35 °C abdestilliert. Der Rückstand wird aus Wasser/*tert*-Butanol lyophilisiert.

AAV 10: Abspaltung vollständig entschützter Verbindungen vom Wang-Harz

Das Harz (0.25 g) wird zunächst mit CH₂Cl₂ (4 x 2 mL, je 2 min) gewaschen und mit einem 95:2.5:2.5 Gemisch aus TFA:TIPS:H₂O (2 mL) für 1 h versetzt. Anschließend wird mit einem 95:5 Gemisch TFA:H₂O gewaschen (3 x 2 mL, je 5 min). Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum eingengt, der Rückstand zweimal mit Toluol koevaporiert und aus *tert*Butanol/Wasser lyophilisiert.

AAV 11: Entschützung der Seitenketten

- a) Die Verbindung wird in einem 1:1 Gemisch aus TFA und CH₂Cl₂ in Gegenwart von TIPS bei 0 °C innerhalb von 3-6 h entschützt und im Vakuum bis zur Trockne eingengt.
- b) Die Verbindung wird in einem 95:2.5:2.5 Gemisch aus TFA:TIPS:H₂O in 3-4 h entschützt und im Vakuum bis zur Trockne eingengt.

AAV 12: Zyklisierung seitenkettengeschützter Peptide nach Shiori *et al.*^[273]

Das lineare Peptid-Acetat wird in hoher Verdünnung ($5 \cdot 10^{-3}$ M) in frisch destilliertem DMF gelöst. und nach Zugabe von 3 Äq. DPPA und 5 Äq. NaHCO₃ als feste Base für 48 h bei RT gerührt. Nach Abfiltrieren des NaHCO₃ wird das DMF bei 40 °C im Hochvakuum bis auf ein geringes Volumen abdestilliert und die verbleibende Lösung zur Ausfällung in H₂O getropft. Anschließend wird der Niederschlag abzentrifugiert, dreimal H₂O gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

AAV 13 (Fragment)Kupplung am Harz und in Lösung

- a) (*mit HATU, HOAt, 2,4,6-Collidin*) 1.5 Äq. Carbonsäurefragment (bezogen auf die freie Menge *N*-Terminus am Harz), 1.45 Äq. HATU, 1.45 Äq. HOAt und 15

Äq. 2,4,6-Collidin werden in trockenem DMF (Konz. Carbonsäurefragment 0.2 mM) gelöst. Nach 90 – 120 min wird die Lösung zum Harz gegeben und man lässt 12 h bei Raumtemperatur reagieren.

- b) (mit *EDCI·HCl*, *DIPEA*) Die Verbindung mit freiem C-Terminus und das Amin (1 Äq.) werden in trockenem CH_2Cl_2 unter Zugabe von *EDCI·HCl* (1.2 Äq.) und *DIPEA* (1.3 Äq. pro Säure) unter Argon 20 h gerührt und anschließend mit 1N H_2SO_4 , 10 %iger wässriger Na_2CO_3 -Lösung, H_2O und gesättigter wässriger NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. (Bei sehr kleinen Ansätzen entfällt das Ausschütteln; lediglich das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt.)
- c) (mit *PyBOP*, *HOBt*, 2,4,6-Collidin) 1.5 Äq. Carbonsäurefragment (bezogen auf die freie Menge N-Terminus am Harz), 1.5 Äq. *PyBOP*, 1.5 Äq. *HOBt* und 15 Äq. 2,4,6-Collidin werden in trockenem DMF (Konz. Carbonsäurefragment 0.2 mM) gelöst und zum Harz gegeben. Die Kupplungszeit beträgt 12 h; bzw. für Kupplung in Lösung: Die Verbindung mit freiem C-Terminus wird mit dem Amin (1.1 Äq.), *PyBOP* (1.1 Äq.), *sym*-Collidin (30 Äq.) in trockenem DMF unter Argon 24 h gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt.

AAV 14: Abspaltung der Z-Schutzgruppe

1 mmol Z-geschütztes Peptid wird in 30 mL *N,N*-Dimethylacetamid gelöst. Nach Zugabe von 0.5 g Katalysator (5 % Pd/C) wird die Suspension 4 h unter H_2 -Atmosphäre gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels bei 40 °C im Hochvakuum wird der Rückstand in 50 mL Methanol aufgenommen und der Katalysator zunächst über Kieselgur, anschließend durch ein Mikrofilter der Porengröße 0.45 μm abfiltriert. Nach Einengen des Filtrates wird das Peptid mit Ether gefällt, gewaschen und lyophilisiert.

AAV 15: Oximligation

Zu einer 0.5 M Lösung des vollständig geschützten und HPLC-gereinigten Peptids in 90 % ACN/H₂O (HPLC-Qualität) bei pH 4 (TFA, HPLC-Qualität) gibt man den Aldehyd (3 Äq.) und lässt 2 h bei RT rühren. Anschließend wird die saure Lösung mit Wasser verdünnt und die Lösungsmittel durch Lyophilisieren entfernt. Der Rückstand wird viermal mit Diethylether gewaschen und aus ACN/H₂O lyophilisiert.

AAV 16: Synthese von β -Aminosäuren ^[395]

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

AAV 17: Modifizierte Darstellung von *N*-Fmoc-geschützten Aminosäuren nach Chang *et al.* ^[396]

Die Aminosäure (5 mmol) wird in einer 10 %igen wässrigen Na₂CO₃-Lösung (15 mL) gelöst und bei 0 °C mit Dioxan (5 mL) versetzt. Anschließend wird unter starkem Rühren innerhalb 30 min eine Lösung von Fmoc-Cl (5.5 mmol, 1.1 Äq.) in Dioxan (7.5 mL) zugetropft. Nach 1 h wird das Kühlbad entfernt und 5-25 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wird per DC kontrolliert. Danach wird das Reaktionsgemisch in Eiswasser (150 mL) gegossen und mit kaltem Diethylether. Bei *tert*-Butyl-geschützten Derivaten wird die eisgekühlte, wässrige Phase mit 10 %iger Zitronensäure auf pH 4 eingestellt. Bei säurestabilen Derivaten wird die eisgekühlte, wässrige Phase zuerst mit konz. HCl dann mit 1N HCl auf pH = 2 angesäuert. Der ausgefallene Feststoff wird durch Filtration abgetrennt, mit Wasser (2 × 20 mL) gewaschen und im Exsikkator getrocknet. *N*-Fmoc-geschützte Aminosäuren, die sich nach Ansäuern als Öl abscheiden, werden mit Ethylacetat (3 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wäscht man mit verdünnter HCl (pH 3) und dreimal mit H₂O. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

AAV 18: Darstellung von *N*-Fmoc-geschützten Aminosäuren mit Fmoc-ONSu ^[289]

Zu einer etwa 0.5M Suspension der Aminosäure und NaHCO₃ (1 Äquiv) in einer Mischung aus H₂O:Aceton (1:1) wird bei Raumtemperatur Fmoc-ONSu (1 Äq.) in einer Portion zugegeben und 20 h bei RT gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung vorsichtig mit konz. HCl auf pH = 1 angesäuert und das Aceton am Rotationsverdampfer abdestilliert. Die verbleibende wässrige Suspension wird zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen mit 0.1N HCl und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

AAV 19: Synthese von 3-Aryl-glutarsäurederivaten modifiziert nach Perregaard *et al.* ^[397]

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

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

AAV 20: Synthese von Glutarsäureanhydridderivaten Perregaard *et al.* ^[397]

Glutarsäurederivate (10 mmol) werden mit Essigsäureanhydrid (2.8 mL, 30 mmol) bis zur vollständigen Lösung unter Rückfluss auf 130 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird tropfenweise Et₂O (2 mL) zugegeben. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit kaltem Et₂O (2 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

AAV 21: Synthese von 5-(N'-Fmoc-Hydrazino)-5-oxopentansäure-Derivaten

Das Glutarsäureanhydrid (2.0 mmol) wird zusammen mit Fmoc-Hydrazin (**34**) (2.0 mmol) in absolutem THF (20 mL) unter Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsverlauf wird mittels DC kontrolliert. Nach Beendigung der Reaktion wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das ölige Produkt im Hochvakuum getrocknet.

AAV 22: Verseifung von C-terminalen Methylestern

Zu einer Lösung aus Methylester (1.0 mmol) und MeOH (5 mL) gibt man unter Rühren 1N Natronlauge (1.5 mL) hinzu. Enthält der Methylester saure funktionelle Gruppen, so muß entsprechend mehr Base verwendet werden. Die Reaktion ist nach einigen Minuten beendet (DC-Kontrolle).

AAV 23: Einbau von Fmoc-azaGly an der Festphase

Das harzgebundene freie Amin wird mit trockenem CH_2Cl_2 (5×2 min) gewaschen und mit einer ca. 0.3 M Lösung von 5-(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-on (**46**) (3 Äq.) in trockenem CH_2Cl_2 versetzt. Nach 90 min Schütteln bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Waschen mit CH_2Cl_2 (6×2 min) und NMP (4×2 min) abgebrochen.

AAV 24: Kupplung des Spacerbausteins nach der HATU-Methode:

Das harzgebundene freie Amin wird mit einer 0.1 M Lösung des *Spacer*bausteins (2.5 Äq. bezogen auf die Harzbeleung), HATU (2.4 Äq.) und *sym*-Collidin (30 Äq.) in trockenem DMF versetzt. Nach einer Kupplungszeit von 2-12 h wird die Reaktion durch Waschen mit DMF (6×2 min) beendet.

AAV 25: Einführen eines Säurechlorids an der Festphase

Das harzgebundene freie Amin wird zunächst mit trockenem CH_2Cl_2 (3×5 min) gewaschen und anschließend mit einer 0.1 M Lösung aus *m*-Nitrobenzylsulfonsäurechlorid (8 Äq.), trockenem Pyridin (10 Äq.) und DMAP (1 Äq.) in trockenem CH_2Cl_2 3 h bei RT geschüttelt. Durch Waschen mit CH_2Cl_2 (3×5 min) und DMF (3×5 min) wird die Reaktion beendet.

AAV 26: Reduktion von Nitroaromaten an der Festphase nach Meyers *et al.* ^[367]

Der harzgebundene Nitroaromat wird mit DMF (3 x 2 min) gewaschen und mit einer 2 M SnCl₂-Lösung (5 Äq.) in DMF versetzt. Man läßt die Harzsuspension 7 h bei RT schütteln. Danach wird das Harz mit DMF (3 x 2 min), CH₂Cl₂ (3 x 2 min) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

AAV 27: Guanylierung von harzgebundenen aliphatischen Aminen

Das harzgebundene freie aliphatische Amin wird mit trockenem CH₂Cl₂ (4 x 2 min) gewaschen und mit einer 0.1 M Lösung von *N,N'*-Bis-Boc-1-guanylpyrazol (**36**, 2 Äq.) in trockenem CH₂Cl₂ versetzt. Nach 20 h Schütteln bei Raumtemperatur wird das Harz mit CH₂Cl₂ (6 x 2 min) gewaschen.

Um nicht umgesetztes *N,N'*-Bis-Boc-1-guanylpyrazol zurückzugewinnen, werden die vereinigten CH₂Cl₂-Filtrate im Vakuum eingengt, der Rückstand in wenig Ethylacetat aufgenommen und mit dem zehnfachen Volumen an Hexan versetzt wird. Bei ca. -20 °C im Tiefkühler kristallisiert **36** langsam aus.

AAV 28: Guanylierung von harzgebundenen Anilinen

Das harzgebundene freie Anilin wird mit trockenem CHCl₃ (4 x 2 min) gewaschen und in ein Schraubglas passender Größe überführt. Nach Zugabe einer 0.8 M Lösung von *N,N'*-Bis-Boc-1-guanylpyrazol **36** (10 Äq.) in trockenem CHCl₃ wird das Gemisch 20 h bei 50 °C in einem Schüttler umgesetzt. Anschließend wird das Harz in einer Spritze mit Fritte abfiltriert und mehrmals mit CH₂Cl₂ gewaschen. Die Rückgewinnung von nicht umgesetztem *N,N'*-Bis-Boc-1-guanylpyrazol wird analog der in AAV 27 beschriebenen Methode durchgeführt.

AAV 29: Dihydroimidazolierung von harzgebundenen Anilinen

Das harzgebundene freie Anilin wird mit trockenem CHCl₃ (4 x 2 min) gewaschen und in ein Schraubglas passender Größe überführt. Nach Zugabe einer 0.8 M Lösung von **57** (10 Äq.) in trockenem CHCl₃ wird das Gemisch 20 h bei 50 °C in einem Schüttler umgesetzt. Anschließend wird das Harz in einer Spritze mit Fritte abfiltriert und mehrmals mit CH₂Cl₂ gewaschen.

AAV 30: Einführung von elektronenarmen Aromaten durch nukleophile, aromatische Substitution an der Festphase modifiziert nach Gibson *et al.*^[379]

Das harzgebundene freie Amin wird zunächst mit trockenem DMF (3 x 5 min) gewaschen und anschließend mit einer 0.5M Lösung aus 4-Fluorchinazolin (**88**, 15 Äq.), DIPEA (15 Äq.) in trockenem DMF versetzt. Nach 24 h Schütteln bei RT wird die Reaktion durch Waschen mit DMF (3 x 5 min) und CH₂Cl₂ (3 x 5 min) abgebrochen.

9.3 Synthese von RGD-Peptiden für die Tumordiagnose

9.3.1 Synthese der Bausteine

Zyklopeptide

c-(R[Pbf]GD[OtBu]fE-) und *c*-(R[Pbf]AD[OtBu]fE-) wurden durch kombinierte Festphasen-Lösungssynthese hergestellt. Nach AAV 1, 5 und 6 werden die linearen Peptide D[OtBu]fE[Bzl]R[Pbf]G und D[OtBu]fE[Bzl]R[Pbf]A an der Festphase aufgebaut, wobei die die Fmoc-Entschützung des Glutamats auf 2 x 5 min verkürzt und bei der Kupplung von Fmoc-D-Phe-OH 2,4,6-Collidin statt DIPEA als Base verwendet wurde. Die Abspaltung vom Harz erfolgt nach AAV 9a, die Zyklisierung nach AAV 12 und die partielle Entschützung der. Glutaminsäure nach AAV 14.

c-(R[Pbf]GD[OtBu]fE-) (C^{E*})

C₄₃H₆₀N₈O₁₂S*TFA: 913.05*114.02 g/mol

HPLC (10-90 %, 30 min) R_t = 21.3 min; **ESI-MS** *m/z* 1864.4 [2M+K]⁺, 1848.4 [2M+Na]⁺, 1825.3 [2M+H]⁺, 951.3 [M+K]⁺, 935.4 [M+Na]⁺, 913.4 [M+H]⁺, 857.5 [M-*t*Bu+2H]⁺.

c-(R[Pbf]AD[OtBu]fE-) (C^{A*})

C₄₄H₆₂N₈O₁₂S*TFA: 927.08*114.02 g/mol

HPLC (10-90 %, 30 min) R_t = 22.6 min; **ESI-MS** *m/z* 1892.0 [2M+K]⁺, 1875.9 [2M+Na]⁺, 1853.2 [2M+H]⁺, 965.3 [M+K]⁺, 949.4 [M+Na]⁺, 927.4 [M+H]⁺, 871.5 [M-*t*Bu+2H]⁺.

20-(*N*-Fmoc)-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure (16)

Zu einer Lösung von Hexaethylenglykol (30.0 g, 106 mmol) und Diazoessigsäure-*tert*-butylester (10.0 g, 70 mmol) in trockenem CH₂Cl₂ (150 mL) wurden unter Argon mehrere Tropfen BF₃·OEt₂ gegeben (N₂-Entwicklung!). Nach 6 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit Ethylacetat (450 mL) versetzt, mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung (5 x 50 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum bis Trockne eingengt. Man erhielt 20-Hydroxy-3,6,9,12,15,18-hexaoxaeicosansäure-*tert*-butylester (**14**, Rohprodukt 23.8 g; ¹H-NMR: 18 % Di-*tert*-butylester als Verunreinigung) als gelbes Öl, welches ohne weitere Reinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt wurde.

C₁₈H₃₆O₉: 396.47 g/mol

R_f = 0.6 (CHCl₃/MeOH 9:1); ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 3.98 (s, 2H, O-CH₂-COO), 3.70-3.52 (m, 24 H, (CH₂)₂), 2.51 (bs, 1H, OH), 1.44 (s, 9H, OC(CH₃)₃).

Zu einer Lösung des Rohproduktes **14** (23.8 g, „60“ mmol), Trimethylamin Hydrochlorid (1.1 g, 12 mmol) und Triethylamin (25 mL, 180 mmol) in trockenem CH₂Cl₂ (200 mL) wurde unter Argon bei 0 °C eine Lösung von *p*-Tosylchlorid (11.4 g, 60 mmol) in trockenem CH₂Cl₂ innerhalb von 10 min zugetropft. Nach Entfernen der Kühlung wurde noch 1 h gerührt, anschließend Ethylacetat (500 mL) zugegeben, mit 1N H₂SO₄, gesättigter wässriger NaHCO₃- und NaCl-Lösung (je 1 x 70 mL) gewaschen. Trocknen und über Na₂SO₄ und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab 20-Tosylato-3,6,9,12,15,18-hexaoxaeicosansäure-*tert*-butylester (Rohprodukt 37.8 g) als dunkelgelbes Öl, welches ohne weitere Reinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt wurde.

C₂₅H₄₂O₁₁S: 550.66 g/mol

R_f = 0.5 (CHCl₃/MeOH 20:1); ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 7.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, ^{Ar}C^{2,6}-*H*), 7.19 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, ^{Ar}C^{3,5}-*H*), 3.85 (s, 2H, CH₂COO), 3.55-3.44 (m, 24H, (CH₂)₂), 2.30 (s, 3H, CH₃), 1.30 (s, 9H, C(CH₃)₃).

Zu einer Lösung des Tosylats (36.0 g, „57 mmol“) in trockenem DMF (100 mL) wurde NaN₃ (5.50 g, 85 mmol) gegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das

DMF wurde im Hochvakuum abdestilliert, der Rückstand in Ethylacetat (300 mL) aufgenommen und mit gesättigter NaCl-Lsg. (3 x 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt an Kieselgel (80 g, Hexan/ Ethylacetat 3:2) chromatographiert. Man erhielt 20-Azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure-*tert*-butylester (27 g, Rohprodukt) als rötliches Öl, welches ohne weitere Reinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt wurde.

C₁₈H₃₅N₃O₈: 421.49 g/mol

R_f = 0.53 (CHCl₃/MeOH 20:1). Der Fleck des Azids war schwer zu erkennen. Überprüfung auf vollständigen Umsatz des Tosylats (UV-aktiv, R_f = 0.48)

Das Azid (27 g, ,57 mmol') wurde in einem 1:1 Gemisch Ethanol:Chloroform (160 mL) gelöst und unter Zugabe von 2.0 g Katalysator (5 % Pd/C) wurde das Gemisch 12 h unter H₂-Atmosphäre gerührt. Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (200 mL) aufgenommen und mit 1N KHSO₄-Lösung (1 x 100 mL, 2 x 50 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit K₂CO₃ basisch gestellt und mit Chloroform (1 x 100 mL, 2 x 50 mL) extrahiert. Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄, Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab 20-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure-*tert*-butylester (**15**, 15.03 g, 54 % über die letzten 4 Stufen) als rötliches Öl.

C₁₈H₃₇NO₈: 395.49 g/mol

R_f = 0.20 (CHCl₃/MeOH 4:1); ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 3.89 (s, 2H, OCH₂CO₂), 3.60-3.42 (m, 20 H, OCH₂CH₂O), 3.37 (t, J = 5.2 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₂), 2.72 (m, CH₂NH₂), 1.58 (br. s, 2H, NH₂), 1.33 (s, 9H, OC(CH₃)₃); ¹³C-NMR (62.9 MHz, CDCl₃) δ = 169.4 (CO₂*t*Bu), 81.1 (OCCH₃)₃, 73.1, 70.4-70.0, 68.8 (OCH₂), 41.5 (CH₂NH₂), 27.8 (CH₃); ESI-MS *m/z* (%) 418.2 [M+Na]⁺, 396.2 [M+H]⁺, 340.3 [M-*t*Bu+2H]⁺.

Zu einer Lösung des Amins **15** (9.00 g, 22.76 mmol) in einem 1:1 Gemisch THF: 10 %iger NaHCO₃-Lösung (50 mL) wurde bei 0 °C FmocCl (6.18 g, 23.89 mmol) in

THF (50 mL) innerhalb von 10 min zugetropft. Nach weiteren 30 min Rühren bei Raumtemperatur wurde das THF im Vakuum entfernt, und der wässrige Rückstand mit Ethylacetat (200 mL) extrahiert. Waschen der organischen Phase mit gesättigter NaCl-Lösung (2 x 50 mL), Trocknen über Na₂SO₄, Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab 20-(*N*-Fmoc)-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure-*tert*-butylester (13.72 g, Rohprodukt) als rötliches Öl, welches ohne weitere Aufreinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt wurde.

C₃₃H₄₇NO₁₀: 617.73 g/mol

R_f = 0.57 (CHCl₃/MeOH 9:1); HPLC (5-100 % in 30 min) R_t = 20.0 min; ESI-MS *m/z* (%) 640.2 [M+Na]⁺, 618.1 [M+H]⁺, 584.4 [M-*t*Bu+H+Na]⁺, 562.2 [M-*t*Bu+2H]⁺, 340.4 [M-Fmoc-*t*Bu+2H]⁺.

Der Fmoc-geschützte *tert*-Butylester (13.72 g, 22.21 mmol) wurde in einem 9:1 Gemisch TFA:Wasser (50 mL) gelöst und bei Raumtemperatur 30 min gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Hochvakuum entfernt, der Rückstand in Ether (200 mL) und DCM (100 mL) aufgenommen und mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (5 x 70 mL) ausgeschüttelt. Um eine Suspensionbildung zu vermeiden wurde das Ausschütteln sehr vorsichtig durchgeführt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden unter kräftigem Rühren mit KHSO₄ (3 g) und 6N HCl (ca. 15 mL) angesäuert, bis das Produkt ausölte. Weiterhin wurde diese Phase mit einer 2:1 Mischung aus Ether und CH₂Cl₂ (300 mL) extrahiert. Der gesamte Extraktionsvorgang wurde beginnend mit der NaHCO₃-Extraktion wiederholt. Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab (**16**, 12.49 g, 98 % über zwei Stufen) als schwach gelbes Öl.

C₂₉H₃₉NO₁₀: 561.62 g/mol

R_f = 0.30 (CHCl₃/MeOH 4:1); ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 9.72 (br. s, 1H, COOH), 7.73 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, ^{Fmoc}C-H), 7.58 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, ^{Fmoc}C-H), 7.37 (m, 2H, ^{Fmoc}C-H), 7.29 (m, 2H, ^{Fmoc}C-H), 5.54 (br. s, 1H, NH), 4.39 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, CHCH₂), 4.19 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CHCH₂), 4.13 (s, 2H, OCH₂CO₂), 3.62-3.45 (m, 22H, OCH₂CH₂), 3.37-3.24 (m, 2H, CH₂NH₂); ¹³C-NMR (62.9 MHz, CDCl₃) δ = 172.2 (COOH), 156.6 (NHCOO), 143.9, 141.2, 127.6, 127.0, 125.0, 119.8 (^{AT}C), 70.9-

70.2, 68.8 66.6 (OCH₂), 47.1 (CH), 40.7 (CH₂NH); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 28.1 min; **ESI-MS** *m/z* (%) 606.5 [M-H+2Na]⁺, 600.4 [M+K]⁺, 584.6 [M+Na]⁺, 562.4 [M+H⁺]⁺, 340.4 [M-Fmoc+H]⁺.

Fmoc-D-Lysin(Fmoc)-OH (11)

Die Umsetzung von D-Lysin*HCl (2.00 g, 10.9 mmol) nach AVV 19 (5 Äq. NaHCO₃, pH = 8.5) und Umkristallisieren aus heißem CHCl₃ ergaben **11** (6.47 g, 100 %) als hellgelben Feststoff.

C₃₆H₃₄N₂O₆: 590.67 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.58 (br. s, 1H, COOH), 7.90 (d, *J* = 7.5 Hz, 4H, arom.), 7.75-7.62 (m, 5H, H^{N α} -Lys, arom.), 7.45-7.29 (m, 9H, H^{N β} -Lys, arom.), 4.32-4.22 (m, 6H, CH-CH₂-O), 3.97-3.88 (m, 1H, H ^{α} -Lys), 3.00-2.97 (m, 2H, H ^{ϵ} -Lys), 1.73-1.55 (m, 2H, H ^{β} -Lys), 1.40-1.38 (m, 4H, H ^{γ,δ} -Lys); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 27.8 min; **ESI-MS** *m/z* 1219.3 [2M+K]⁺, 1203.1 [2M+Na]⁺, 1181.0 [2M+H]⁺, 629.2 [M+K]⁺, 613.4 [M+Na]⁺, 591.2 [M+H]⁺.

9.3.2 Synthese von multimeren RGD-Peptiden

TCP-Harz wurde nach AAV 1 mit Fmoc-Dpr[Aoa(Boc)]-OH belegt. Nach AAV 7 wurde weiterhin ein- bzw. zweimal mit Fmoc-Lys(Fmoc)-OH umgesetzt und anschließend ein bzw. zwei *Spacer*aminosäuren Fmoc-Ahx-OH bzw. Fmoc-Hegas-OH eingeführt. Die Fragmentkupplung am Harz mit *cyclo*(-RGDfE-) bzw. *cyclo*(-RADfE-) erfolgte nach AAV 13. Die Peptide wurden nach AAV 8b vom Harz abgespalten, evtl. HPLC gereinigt, nach AAV 11b entschützt, wiederum HPLC gereinigt und lyophilisiert. Die Detektion während der HPLC-Reinigung erfolgte mit der Wellenlänge 254 nm.

[c(-RGDfE)-Ahx]₂-K-Dpr(Aoa)-OH (D1)

HPLC-Reinigung (D, 20-50 in 30 min) ergab **D1** (66 mg, 31%) als weißen Feststoff.

C₇₅H₁₁₃N₂₃O₂₃*TFA: 1704.84*342.07 g/mol

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.31-8.29 (m, 2H, *H^N*-Gly), 8.16 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, *H^{Nα}*-Lys) 8.07-8.05 (m, 3H, *H^{Nα}*-Dpr, *H^N*-Glu), 8.00-7.97 (m, 4H, *H^N*-D-Phe, *H^N*-Asp), 7.90-7.89 (m, 1H, *H^{Nβ}*-Dpr), 7.74-7.69 (m, 5H, *H^{Nα}*-Arg, *H^N*-Ahx, *H^{Nε}*-Lys), 7.46-7.45 (m, 2H, *H^{Nε}*-Arg), 7.25-7.14 (m, 10H, ^{D-Phe}C-H), 6.81 (br s, 4H, NH₂-Arg), 4.63-4.60 (m, 2H, *H^α*-Asp), 4.46-4.41 (m, 2H, *H^α*-D-Phe), 4.32-4.29 (m, 2H, *H^α*-Lys, *H^ε*-Lys), 4.21-3.97 (m, 9H, *H^α*-Dpr, *H^α*-Arg, CH₂-Aoa, *H^α*-Gly, *H^α*-Glu), 3.51-3.38 (m, 2H, *H^β*-Dpr), 3.24 (d, 2H, *J* = 14.6 Hz, *H^α*-Gly), 3.09-2.94 (m, 11H, *H^ε*-Lys, *H^δ*-Arg, *H^ε*-Ahx, *H^β*-D-Phe), 2.80-2.77 (m, 2H, *H^β*-D-Phe), 2.71-2.66 (m, 2H, *H^β*-Asp), 2.38-2.34 (m, 2H, *H^β*-Asp), 2.11-2.10 (m, 4H, *H^α*-Ahx), 2.02-1.93 (m, 6H, *H^γ*-Glu, *H^β*-Lys), 1.78-1.62 (m, 6H, *H^β*-Glu, *H^β*-Arg), 1.46-1.21 (m, 22H, *H^β*-Arg, *H^β*-Ahx, *H^γ*-Arg, *H^δ*-Ahx, *H^δ*-Lys, *H^γ*-Ahx, *H^γ*-Lys); **HPLC** (5-90 % in 30 min) R_t = 12.3 min; **ESI-MS** *m/z* 1704.8 [M+H]⁺, 853.4 [(M+2H)/2]²⁺.

[c(-RGDfE)-Hegas]₂-K-Dpr(Aoa)-OH (D2)

HPLC-Reinigung (D, 20-50 in 30 min) ergab **D2** (53 mg, 23 %) als weißen Feststoff.

C₉₁H₁₄₅N₂₃O₃₅*TFA: 2121.26*342.07 g/mol

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.31-8.29 (m, 3H, *H^N*-Gly, *H^{Nα}*-Lys) 8.08-8.04 (m, 3H, *H^{Nα}*-Dpr, *H^N*-Glu), 8.00-7.97 (m, 4H, *H^N*-D-Phe, *H^N*-Asp), 7.90-7.89 (m, 1H, *H^{Nβ}*-Dpr), 7.77-7.73 (m, 3H, *H^N*-Hegas, *H^{Nα}*-Arg), 7.64-7.60 (m, 2H, *H^{Nε}*-Lys, *H^N*-Hegas), 7.45-7.44 (m, 2H, *H^{Nε}*-Arg), 7.25-7.13 (m, 10H, ^{D-Phe}C-H), 6.79 (br s, 4H, NH₂-Arg), 4.65-4.60 (m, 2H, *H^α*-Asp), 4.47-4.43 (m, 2H, *H^α*-D-Phe), 4.34-4.28 (m, 3H, *H^α*-Lys, *H^ε*-Lys, *H^α*-Dpr), 4.16-4.12 (m, 2H, *H^α*-Arg) 4.07-3.96 (m, 6H, CH₂-Aoa, *H^α*-Gly, *H^α*-Glu), 3.91 (s, 2H, OCH₂CO-Hegas), 3.84 (s, 2H, OCH₂CO-Hegas), 3.55-3.49 (m, 46H, *H^β*-Dpr, CH₂-Hegas), 3.39-3.37 (m, 2H, CH₂NH-Hegas), 3.27-3.22 (m, 2H, *H^α*-Gly), 3.18-3.16 (m, 2H, CH₂NH-Hegas), 3.09-3.04 (m, 5H, *H^δ*-Arg, *H^ε*-Lys), 2.95 (dd, *J* = 14.4/7.1 Hz, 2H, *H^β*-D-Phe), 2.79 (dd, *J* = 13.7/6.4 Hz, 2H, *H^β*-D-Phe), 2.69 (dd, *J* = 16.3/8.7 Hz, 2H, *H^β*-Asp), 2.35 (dd, *J* = 16.3/5.4 Hz, 2H, *H^β*-Asp), 2.02-1.90 (m, 4H, *H^γ*-Glu), 1.83-1.63 (m, 7H, *H^β*-Glu, *H^β*-Arg, *H^β*-Lys), 1.57-1.36 (m, 9H, *H^β*-Lys, *H^β*-Arg, *H^γ*-Arg, *H^δ*-Lys), 1.26-1.22 (m, 2H, *H^γ*-Lys); **HPLC** (5-90 % in

30 min) $R_t = 12.9$ min; **ESI-MS** m/z 1061.5 $[(M+2H)/2]^{2+}$; **MALDI-MS** m/z 2120.7 $[M+H]^+$.

[c(-RGDfE)-Hegas₂]₂-k-Dpr(Aoa)-OH (D3)

HPLC-Reinigung (D, 20-50 in 30 min) ergab **D3** (53 mg, 23 %) als weißen Feststoff.

$C_{119}H_{199}N_{25}O_{49}$ *TFA: 2763.99*342.07 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min) $R_t = 12.9$ min; **ESI-MS** m/z 1382.4 $[(M+2H)/2]^{2+}$, 929.5 $[(M+Na+2H)/3]^{3+}$, 922.2 $[(M+3H)/3]^{3+}$.

[c(-RADfE)-Hegas]₂-K-Dpr(Aoa)-OH (D4)

HPLC-Reinigung (C, 20-50 in 30 min) ergab **D3** (43 mg, 7 %) als weißen Feststoff.

$C_{93}H_{149}N_{23}O_{35}$ *TFA: 2149.31*342.07 g/mol

HPLC (5-90 % in 30 min) $R_t = 12.9$ min; **ESI-MS** m/z 1094.5 $[(M+K+H)/2]^{2+}$, 1086.7 $[(M+Na+H)/2]^{2+}$, 1075.6 $[(M+2H)/2]^{2+}$, 717.6 $[(M+3H)/3]^{3+}$; **MALDI-MS** m/z 2148.9 $[M+H]^+$.

{[c(-RGDfE)-Ahx]₂-K}₂-K-Dpr(Aoa)-OH (T1)

HPLC-Reinigung (geschützt: B, 60-100 in 30 min; entschützt: D, 20-50 in 30 min) ergab **T1** (73 mg, 18 %) als weißen Feststoff.

$C_{151}H_{227}N_{45}O_{43}$ *TFA: 3360.70*570.12 g/mol

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) $\delta = 8.32-8.30$ (m, 4H, H^N -Gly), 8.12 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, $H^{N\alpha}$ -Lys), 8.07-8.05 (m, 5H, $H^{N\alpha}$ -Dpr, H^N -Glu), 8.00-7.98 (m, 8H, H^N -D-Phe, H^N -Asp), 7.88-7.80 (m, 4H, $H^{N\beta}$ -Dpr, $H^{N\epsilon}$ -Lys), 7.73-7.68 (m, 8H, $H^{N\alpha}$ -Arg, H^N -Ahx), 7.45-7.44 (m, 4H, $H^{N\epsilon}$ -Arg), 7.25-7.13 (m, 20H, ^{D-Phe}C-H), 6.81 (br s, 8H, NH₂-Arg), 4.62 (dd, $J = 8.6$ Hz, 4H, H^α -Asp), 4.45 (dd, $J = 7.2$ Hz, 4H, H^α -D-Phe), 4.33-4.29 (m, 3H, H^α -Lys), 4.23-3.97 (m, 8H, H^ϵ -Lys, H^α -Dpr, H^α -Arg) 4.07-3.96 (m, 10H, H^α -Gly, CH₂-Aoa, H^α -Glu), 3.51-3.39 (m, 2H, H^β -Dpr), 3.25 (dd, $J = 15.0/3.6$ Hz, 4H, H^α -Gly), 3.08 (m, 8H, H^δ -Arg), 2.98-2.93 (m, 15H, H^ϵ -Ahx, H^ϵ -Lys, H^β -D-Phe), 2.79 (dd, $J = 6.4$ Hz, 4H, H^β -D-Phe), 2.69 (dd, $J = 8.2$ Hz, 4H, H^β -Asp), 2.38-2.34 (m, 4H, H^β -

Asp), 2.13-1.89 (m, 22H, H^α -Ahx, H^γ -Glu, H^β -Lys), 1.83-1.62 (m, 12H, H^β -Glu, H^β -Arg), 1.47-1.35 (m, 34H, H^β -Arg, H^β -Ahx, H^γ -Arg, H^δ -Ahx, H^δ -Lys), 1.22-1.20 (m, 14H, H^γ -Ahx, H^γ -Lys); **HPLC** (5-90 % in 30 min) $R_t = 13.0$ min; **ESI-MS** m/z 1680.7 [(M+2H)/2]²⁺, 1121.2 [(M+3H)/3]³⁺, 841.4 [(M+4H)/4]⁴⁺; **MALDI-MS** m/z 3359.5 [M+H]⁺.

{[c(-RGDfE)-Hegas]₂-K}₂-K-Dpr(Aoa)-OH (T2)

HPLC-Reinigung (geschützt: B, 60-100 in 30 min; entschützt: D, 20-50 in 30 min) ergab **T2** (43 mg, 8 %) als weißen Feststoff.

$C_{183}H_{291}N_{45}O_{67}$ *TFA: 4193.53*570.12 g/mol

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) $\delta = 8.31$ -8.30 (m, 4H, H^N -Gly), 8.14 (d, 3H, $J = 8.3$ Hz, $H^{N\alpha}$ -Lys), 8.08-8.06 (m, 5H, $H^{N\alpha}$ -Dpr, H^N -Glu), 7.99-7.98 (m, 8H, H^N -D-Phe, H^N -Asp), 7.90-7.89 (m, 1H, $H^{N\beta}$ -Dpr), 7.82-7.73 (m, 6H, H^N -Hegas, $H^{N\alpha}$ -Arg), 7.65-7.59 (m, 5H, $H^{N\varepsilon}$ -Lys, H^N -Hegas), 7.54-7.49 (m, 4H, $H^{N\varepsilon}$ -Arg), 7.25-7.13 (m, 20H, ^D-Phe-C-H), 6.89 (br s, 8H, NH₂-Arg), 4.65-4.60 (m, 4H, H^α -Asp), 4.47-4.43 (m, 4H, H^α -D-Phe), 4.33-4.12 (m, 11H, H^α -Lys, H^α -Dpr, H^ε -Lys, H^α -Arg), 4.07-3.96 (m, 10H, CH₂-Aoa, H^α -Gly, H^α -Glu), 3.91 (s, 4H, OCH₂CO-Hegas), 3.84 (s, 4H, OCH₂CO-Hegas), 3.54-3.39 (m, 94H, H^β -Dpr, CH₂-Hegas, CH₂NH-Hegas), 3.25 (d, 4H, $J = 13.5$ Hz, H^α -Gly), 3.18-3.17 (m, 4H, CH₂NH-Hegas), 3.09-3.04 (m, 11H, H^δ -Arg, H^ε -Lys), 3.00-2.92 (m, 4H, H^β -D-Phe), 2.80-2.76 (m, 4H, H^β -D-Phe), 2.69 (dd, 4H, $J = 16.2/8.9$ Hz, H^β -Asp), 2.35 (dd, 4H, $J = 16.2/5.7$ Hz, H^β -Asp), 2.00-1.90 (m, 8H, H^γ -Glu), 1.82-1.72 (m, 8H, H^β -Glu, H^β -Arg), 1.67-1.64 (m, 8H, H^β -Glu, H^β -Lys), 1.48-1.22 (m, 32H, H^β -Lys, H^β -Arg, H^γ -Arg, H^δ -Lys, H^γ -Lys); **HPLC** (5-90 % in 30 min) $R_t = 13.4$ min; **MALDI-MS** m/z 4191.9 [M+H]⁺.

{[c(-RGDfE)-Hegas]₂-k}₂-k-Dpr(Aoa)-OH (T3)

HPLC-Reinigung (geschützt: B, 60-100 in 30 min; entschützt: D, 22-42 in 30 min) ergab **T3** (8 mg, 1 %) als weißen Feststoff.

$C_{183}H_{291}N_{45}O_{67}$ *TFA: 4193.53*570.12 g/mol

HPLC (5-90 % in 30 min) $R_t = 13.4$ min; **ESI-MS** m/z 1398.6 [(M+3H)/3]³⁺, 1058.8 [(M+2Na+2H)/4]⁴⁺, 1055.0 [(M+Na+3H)/4]⁴⁺, 1049.5 [(M+4H)/4]⁴⁺, 839.8 [(M+5H)/5]⁵⁺.

{[cyclo(-RGDfE)-Hegas]₂-k}₂-k-Dpr(Aoa)-OH (T4)

HPLC-Reinigung (geschützt: D, 60-90 in 30 min; entschützt: D, 24-50 in 30 min) ergab **T4** (36 mg, 8 %) als weißen Feststoff.

$C_{239}H_{399}N_{49}O_{95}$ *TFA: 5478.10*570.12 g/mol

HPLC (5-90 % in 30 min) $R_t = 14.6$ min; **ESI-MS** m/z 1370.7 [(M+4H)/4]⁴⁺, 1096.9 [(M+5H)/5]⁵⁺.

([c(-RGDfE)-Hegas]₂-k)₂-k-Dpr(Aoa)-OH (O1)

HPLC-Reinigung (geschützt: D, 70-100 in 30 min; entschützt: D, 22-50 in 30 min) ergab **O1** (128 mg, 17 %) als weißen Feststoff.

$C_{367}H_{583}N_{89}O_{131}$ *TFA: 8338.08*1026.21 g/mol

HPLC (5-100 % in 30 min) $R_t = 13.2$ min; **ESI-MS** m/z 1390.4 [(M+6H)/6]⁶⁺, 1192.2 [(M+7H)/7]⁷⁺, 1043.4 [(M+8H)/8]⁸⁺.

([c(-RGDfE)-Hegas]₂-k)₂-k-Dpr(Aoa)-OH (O2)

HPLC-Reinigung (geschützt: D, 70-90 in 30 min; entschützt: D, 22-50 in 30 min) ergab **O2** (72 mg, 8 %) als weißen Feststoff.

$C_{479}H_{799}N_{97}O_{187}$ *TFA: 10909.01*1026.21 g/mol

HPLC (5-90 % in 30 min) $R_t = 14.9$ min; **ESI-MS** m/z 1364.6 [(M+8H)/8]⁸⁺, 1213.3 [(M+7H)/7]⁷⁺.

{[c(-RADfE)-Hegas][c(-RGDfE)-Hegas]}-K-Dpr(Aoa)-OH (d)

HPLC-Reinigung (D, 20-45 in 30 min) ergab **d** (10 mg, 8 %) als weißen Feststoff.

$C_{92}H_{147}N_{23}O_{35}$ *TFA: 2135.29*342.07 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min) $R_t = 11.9$ min; **ESI-MS** m/z 1087.4 [(M+K+H)/2]²⁺, 1079.3 [(M+H+Na)/2]²⁺, 1068.5 [(M+2H)/2]²⁺, 725.6 [(M+K+2H)/3]³⁺, 712.9 [(M+3H)/3]³⁺.

{[c(-RADfE)-Ahx]₃[c(-RGDfE)-Ahx]}-K-K-Dpr(Aoa)-OH (t1)

HPLC-Reinigung (geschützt: D, 67-80 in 17 min; entschützt: D, 20-45 in 30 min) ergab **t1** (4 mg, 2 %) als weißen Feststoff.

$C_{154}H_{233}N_{45}O_{43}$ *TFA: 3402.78*570.12 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min) $R_t = 11.9$ min; **ESI-MS** m/z 1135.1 [(M+3H)/3]³⁺, 851.9 [(M+4H)/4]⁴⁺.

{[c(-RADfE)-Hegas]₃[c(-RGDfE)-Hegas]}-K-K-Dpr(Aoa)-OH (t2)

HPLC-Reinigung (geschützt: D, 60-100 in 30 min; entschützt: D, 20-45 in 30 min) ergab **t2** (3 mg, 1 %) als weißen Feststoff.

$C_{186}H_{297}N_{45}O_{67}$ *TFA: 4235.61*570.12 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min) $R_t = 12.5$ min; **ESI-MS** m/z 1059.8 [(M+4H)/4]⁴⁺, 848.3 [(M+5H)/5]⁵⁺.

9.3.3 Konjugation der multimeren RGD-Peptide zu Oximen

Die Umsetzung mit dem entsprechenden Aldehyd nach AAV 15 ergab folgende Verbindungen:

[c(-RGDfE)-Ahx]₂-K-Dpr[Ac(2-*p*-Iodbenzaldehydoxim)]-OH (D1I)

$C_{82}H_{116}IN_{23}O_{23}$ *TFA: 1918.84*228.05

Ausbeute 1.1 mg, quant.; **HPLC** (5-90 % in 30 min) $R_t = 16.5$ min; **ESI-MS** m/z 1918.7 [M+H]⁺, 960.5 [(M+2H)/2]²⁺.

[c(-RGDfE)-Ahx]₂-K-Dpr[Ac(2-*p*-Trimethylstannylbenzaldehydoxim)]-OH (D1S)

$C_{85}H_{125}N_{23}O_{23}Sn$ *TFA: 1955.75*228.05 g/mol

Ausbeute 1.6 mg, 83 %; **HPLC** (5-90 % in 30 min) $R_t = 18.8$ min **ESI-MS** m/z 1956.9 $[M+H]^+$, 979.2 $[(M+2H)/2]^{2+}$.

[c(-RGDfE)-Hegas]₂-K-Dpr[Ac(2-p-Iodobenzaldehydoxim)]-OH (D2I)

$C_{98}H_{148}IN_{23}O_{35} \cdot TFA$: 2335.26*228.05 g/mol

Ausbeute 1.1 mg, 96 %; **HPLC** (5-90 % in 30 min) $R_t = 16.9$ min; **ESI-MS** m/z 1179.0 $[(M+Na+H)/2]^{2+}$, 1168.7 $[(M+2H)/2]^{2+}$, 792.2 $[(M+2Na+H)/3]^{3+}$, 786.9 $[(M+Na+2H)/3]^{3+}$, 779.5 $[(M+3H)/3]^{3+}$.

[c(-RGDfE)-Hegas]₂-K-Dpr[Ac(2-p-Trimethylstannylbenzaldehydoxim)]-OH (D2S)

$C_{101}H_{157}N_{23}O_{35}Sn \cdot TFA$: 2372.17*228.05 g/mol

Ausbeute 2.2 mg, 99 %; **HPLC** (5-90 % in 30 min) $R_t = 19.0$ min; **ESI-MS** m/z 1197.6 $[(M+Na+H)/2]^{2+}$, 1187.2 $[(M+2H)/2]^{2+}$, 804.7 $[(M+2Na+H)/3]^{3+}$, 799.2 $[(M+Na+2H)/3]^{3+}$.

[c(-RGDfE)-Hegas]₂-k-Dpr[Ac(2-p-Fluorbenzaldehydoxim)]-OH (D3F)

$C_{120}H_{202}FN_{25}O_{49} \cdot TFA$: 2870.09*228.05 g/mol

Ausbeute 1.1 mg, quant.; **HPLC** (5-90 % in 30 min) $R_t = 16.0$ min; **ESI-MS** m/z 1435.5 $[(M+2H)/2]^{2+}$, 970.2 $[(M+K+2H)/3]^{3+}$, 965.0 $[(M+Na+2H)/3]^{3+}$, 957.5 $[(M+3H)/3]^{3+}$, 728.1 $[(M+K+3H)/4]^{4+}$.

[c(-RADfE)-Hegas]₂-K-Dpr[Ac(2-p-Fluorbenzaldehydoxim)]-OH (D4F)

$C_{100}H_{152}FN_{23}O_{35} \cdot TFA$: 2255.41*228.05 g/mol

Ausbeute 1.2 mg, 98 %; **HPLC** (5-90 % in 30 min) $R_t = 16.3$ min; **ESI-MS** m/z 1147.3 $[(M+K+H)/2]^{2+}$, 1139.0 $[(M+Na+H)/2]^{2+}$, 1127.9 $[(M+2H)/2]^{2+}$.

{[c(-RGDfE)-Ahx]₂-K}₂-K-Dpr[Ac(2-p-Iodobenzaldehydoxim)]-OH (T1I)

$C_{158}H_{230}IN_{45}O_{43} \cdot TFA$: 3574.70*456.09 g/mol

Ausbeute 0.8 mg, 77 %; **HPLC** (5-90 % in 30 min) $R_t = 15.5$ min; **ESI-MS** m/z 1205.0 [(M+2Na+H)/3]³⁺, 1192.5 [(M+3H)/3]³⁺, 904.2 [(M+2Na+2H)/4]⁴⁺, 894.9 [(M+4H)/4]⁴⁺, 723.7 [(M+2Na+3H)/5]⁵⁺.

{[c(-RGDfE)-Ahx]₂-K}₂-K-Dpr[Ac(2-*p*-Trimethylstannylbenzaldehydoxim)]-OH (T1S)

$C_{161}H_{241}N_{45}O_{43}Sn \cdot TFA$: 3611.61*456.09 g/mol

Ausbeute 3.2 mg, 90 %; **HPLC** (5-90 % in 30 min) $R_t = 17.0$ min; **ESI-MS** m/z 1205.0 [(M+3H)/3]³⁺, 913.5 [(M+2Na+2H)/4]⁴⁺, 904.0 [(M+4H)/4]⁴⁺, 730.7 [(M+2Na+3H)/5]⁵⁺.

{[c(-RGDfE)-Ahx]₂-K}₂-K-Dpr[Ac(2-*p*-Fluorbenzaldehydoxim)]-OH (T1F)

$C_{158}H_{230}FN_{45}O_{43} \cdot TFA$: 3466.79*456.09 g/mol

Ausbeute 1.3 mg, quant.; **HPLC** (5-90 % in 30 min) $R_t = 14.9$ min; **ESI-MS** m/z 1156.4 [(M+3H)/3]³⁺, 877.2 [(M+K+3H)/4]⁴⁺, 867.9 [(M+4H)/4]⁴⁺, 702.1 [(M+K+4H)/5]⁵⁺.

{[c(-RGDfE)-Hegas]₂-K}₂-K-Dpr[Ac(2-*p*-Iodbenzaldehydoxim)]-OH (T2I)

$C_{190}H_{294}IN_{45}O_{67} \cdot TFA$: 4407.53*456.09 g/mol

Ausbeute 1.1 mg, 99 %; **HPLC** (5-90 % in 30 min) $R_t = 14.9$ min; **ESI-MS** m/z 1470.0 [(M+3H)/3]³⁺, 1113.6 [(M+2Na+2H)/4]⁴⁺, 1103.1 [(M+4H)/4]⁴⁺, 894.9 [(M+3Na+2H)/5]⁵⁺, 890.3 [(M+2Na+3H)/5]⁵⁺.

{[c(-RGDfE)-Hegas]₂-K}₂-K-Dpr[Ac(2-*p*-Trimethylstannylbenzaldehydoxim)]-OH (T2S)

$C_{193}H_{303}N_{45}O_{67}Sn \cdot TFA$: 4444.44*456.09 g/mol

Ausbeute 3.9 mg, 95 %; **HPLC** (5-90 % in 30 min) $R_t = 17.3$ min; **ESI-MS** m/z 1482.7 [(M+3H)/3]³⁺, 1121.9 [(M+2Na+2H)/4]⁴⁺, 1118.0 [(M+Na+3H)/4]⁴⁺, 1112.4 [(M+4H)/4]⁴⁺, 897.5 [(M+2Na+3H)/5]⁵⁺, 894.4 [(M+Na+4H)/5]⁵⁺.

{{c(-RGDfE)-Hegas}₂-k}₂-k-Dpr[Ac(2-*p*-Fluorbenzaldehydoxim)]-OH (T3F)

C₁₉₀H₂₉₄FN₄₅O₆₇*TFA: 4299.63*456.09 g/mol

Ausbeute 1.5 mg, quant.; **HPLC** (5-90 % in 30 min) R_t = 15.4 min; **ESI-MS** *m/z* 1433.9 [(M+3H)/3]³⁺, 1076.1 [(M+4H)/4]⁴⁺, 868.7 [(M+K+4H)/5]⁵⁺.

{{c(-RGDfE)-Hegas₂]₂-k}₂-k-Dpr[Ac(2-*p*-Fluorbenzaldehydoxim)]-OH (T4F)

C₂₄₆H₄₀₂FN₄₉O₉₅*TFA: 5585.10*456.09 g/mol

Ausbeute 1.5 mg, quant.; **HPLC** (5-90 % in 30 min) R_t = 15.9 min; **ESI-MS** *m/z* 1862.4 [(M+3H)/3]³⁺, 1397.1 [(M+4H)/4]⁴⁺, 1122.4 [(M+Na+4H)/5]⁵⁺, 1117.9 [(M+5H)/5]⁵⁺, 938.3 [(M+K+5H)/6]⁶⁺,

{{[c(-RGDfE)-Hegas]₂-k}₂-k-Dpr[Ac(2-*p*-Fluorbenzaldehydoxim)]-OH (O1F)

C₃₇₄H₅₈₆FN₈₉O₁₃₁*TFA: 8444.17*912.18 g/mol

Ausbeute 1.8 mg, quant.; **HPLC** (5-90 % in 30 min) R_t = 14.6 min; **ESI-MS** *m/z* 1207.3 [(M+7H)/7]⁷⁺, 1058.9 [(M+7H+Na)/8]⁸⁺, 1056.7 [(M+8H)/8]⁸⁺.

{{[c(-RGDfE)-Hegas]₂-k}₂-k-Dpr[Ac(2-*p*-Fluorbenzaldehydoxim)]-OH (O2F)

C₄₈₆H₈₀₂FN₉₇O₁₈₇*TFA: 8444.17*912.18 g/mol

Ausbeute 2.0 mg, quant.; **HPLC** (5-90 % in 30 min) R_t = 15.3 min; **ESI-MS** *m/z* 1574.5 [(M+7H)/7]⁷⁺, 1377.5 [(M+8H)/8]⁸⁺.

{{c(-RGDfE)-Hegas}[c(-RADfE)-Hegas]}-K-Dpr[Ac(2-*p*-Fluorbenzaldehydoxim)]-OH (dF)

C₉₉H₁₅₀FN₂₃O₃₅*TFA: 2241.38*228.05 g/mol

Ausbeute 1.1 mg, 92 %; **HPLC** (5-90 % in 30 min) R_t = 16.0 min; **ESI-MS** *m/z* 1121.5 [(M+2H)/2]²⁺, 760.9 [(M+K+2H)/3]³⁺, 755.5 [(M+Na+2H)/3]³⁺, 748.2 [(M+3H)/3]³⁺.

{[c(-RADfE)-Ahx]₃[c(-RGDfE)-Ahx]}-K-K-Dpr[Ac(2-*p*-Fluorbenzaldehyd-oxim)]-OH (t1F)

C₁₆₁H₂₂₃FN₄₅O₄₃*TFA: 3508.87*456.09 g/mol

Ausbeute 1.2 mg, quant.; **HPLC** (5-90 % in 30 min) R_t = 14.9 min; **ESI-MS** *m/z* 1755.2 [(M+2H)/2]²⁺, 1170.5 [(M+3H)/3]³⁺, 878.4 [(M+4H)/4]⁴⁺.

{[c(-RADfE)-Hegas]₃[c(-RGDfE)-Hegas]}-K-K-Dpr[Ac(2-*p*-Fluorbenzaldehyd-oxim)]-OH (t2F)

C₁₉₃H₃₀₀FN₄₅O₆₇*TFA: 4341.71*456.09 g/mol

Ausbeute 0.7 mg, quant.; **HPLC** (5-90 % in 30 min) R_t = 15.4 min; **ESI-MS** *m/z* 1448.0 [(M+3H)/3]³⁺, 1086.5 [(M+4H)/4]⁴⁺, 877.1 [(M+K+4H)/5]⁵⁺.

9.4 Synthese von RGD-Mimetika für die Tumordiagnostik

9.4.1 Synthese der Bausteine

5-[*N'*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(4-methoxyphenyl)-pentansäure

4-Methoxybenzaldehyd (6.81 g, 50 mmol) wurde nach AAV 19 umgesetzt. Umkristallisieren aus der 2.5-fachen Menge Ethanol (160 mL, aufgrund schlechter Löslichkeit) ergab 2,4-Bisaceto-3-(4-methoxy)-phenylglutarsäurediethylester (10.97 g, 58 %) als weißen Feststoff. Das Zwischenprodukt (11.00 g, 29.1 mmol) wurde sofort verseift. Nach dem Ansäuern der wässrigen Phase mit konz. HCl auf pH = 1 wurde die ausgefallene Glutarsäure abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die wässrige Phase wurde zusätzlich mit Et₂O (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Durch Vereinigung der bräunlichen Feststoffe wurde 3-(4-Methoxyphenyl)-glutarsäure (5.96 g, 86 %) erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 11.98 (br. s, 2H, COOH), 7.35 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-*H*), 6.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-*H*), 3.49-3.45 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.70-2.46 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 13.0 min; **ESI-MS** *m/z* 515.1 (100) [2M+K⁺], 499.0 (35) [2M+Na⁺].

3-(4-Methoxy)-phenylglutarsäure (5.86 g, 24.6 mmol) wurde mit Essigsäureanhydrid (9.9 mL, 98 mmol, 4 Äq.) nach AAV 20 umgesetzt und ergab 3-(4-Methoxyphenyl)-glutarsäureanhydrid (4.16 g, 77 %) als weiße Nadeln.

$C_{12}H_{12}O_4$: 220.22 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ = 7.10 (d, J = 8.5 Hz, 2H, $^{\text{Phe}}\text{C}^{2,6}\text{-H}$), 6.90 (d, J = 8.5 Hz, 2H, $^{\text{Phe}}\text{C}^{3,5}\text{-H}$), 3.79 (s, 3H, O- CH_3), 3.34 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$), 3.06 (dd, J = 4.5/17.3 Hz, 2H, HCH-CH-HCH), 2.90 (dd, J = 11.2/17.3 Hz, 2H, HCH-CH-HCH); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 19.9 min.

3-(4-Methoxy)-phenylglutarsäureanhydrid (440 mg, 2.0 mmol) wurde nach AAV 21 mit Fmoc-Hydrazin (**34**) (509 mg, 2.0 mmol) innerhalb von 16 h umgesetzt und ergab 5-[N' -(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(4-methoxyphenyl)-pentansäure (950 mg, 99 %) als farbloses Öl.

$C_{27}H_{26}N_2O_6$: 474.51 g/mol

R_f = 0.1 (Hexan:Ethylacetat:HOAc: 1:1:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6) δ = 9.68 (s, 1H, NH), 9.18 (s, 1H, NH), 7.88 (d, J = 7.5 Hz, 2H, $^{\text{Fmoc}}\text{C-H}$), 7.71 (d, J = 7.5 Hz, 2H, $^{\text{Fmoc}}\text{C-H}$), 7.41 (t, J = 7.3 Hz, 2H, $^{\text{Fmoc}}\text{C-H}$), 7.31 (t, J = 7.6 Hz, 2H, $^{\text{Fmoc}}\text{C-H}$), 7.14 (d, J = 7.5 Hz, 2H, $^{\text{Phe}}\text{C}^{2,6}\text{-H}$), 6.82 (d, J = 7.5 Hz, 2H, $^{\text{Phe}}\text{C}^{3,5}\text{-H}$), 4.39-4.18 (m, 3H, $\text{CH-CH}_2\text{-O}$), 3.70 (s, 3H, O- CH_3), 3.50-3.35 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$), 2.67-2.27 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 30.8 min; **ESI-MS** m/z 948.9 [$2\text{M}+\text{H}$] $^+$, 497.0 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 475.0 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

3-Aminoglutarsäuredimethylester (**25**) modifiziert nach Crossley *et al.*^[331, 334]

3-Oxoglutarsäuredimethylester (4.86 g, 27.9 mmol) wurde zusammen mit Ammoniumformiat (17.6 g, 279 mmol) 2 h in trockenem Methanol unter Argon bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Natriumcyanoborhydrid (1.75 g, 27.9 mmol) wurde das Gemisch weitere 24 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, die weiße Masse in CH_2Cl_2 suspendiert, und filtriert. Nach dem Abrotieren des Lösungsmittels erhielt man ein farbloses Öl, welches in 1N HCl (100 mL) gelöst und mit Et_2O (2 x 50 mL) gewaschen wurde. Der Et_2O wurde verworfen und die wässrige Phase mit festem K_2CO_3 auf pH = 9-10

eingestellt. Nach Extraktion mit CH_2Cl_2 (3 x 100 mL), Trocknen über Na_2SO_4 und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man **25** (3.69 g, 75 %) als farbloses Öl.

$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_4$: 175.18 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6) δ = 3.60 (s, 6H, OCH_3), 3.40-3.28 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$), 2.61-2.28 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$); **CI-MS** m/z 176.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5-[*N'*-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(4-fluorbenzoylamino)-pentansäure (**30**)

3-Aminoglutaräuredimethylester (**25**, 2.74 g, 15.7 mmol) wurde nach AAV 13b mit 4-Fluorbenzoesäure umgesetzt. Die trübe Lösung wurde mit 1N H_2SO_4 , 10 %iger wässriger Na_2CO_3 -Lösung, H_2O und gesättigter wässriger NaCl -Lösung (je 1 x 70 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingeengt. Man erhielt 3-(4-Fluorbenzoylamino)-glutaräuredimethylester (3.63 g, 78 %) als gelbes Öl.

$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{FNO}_5$: 297.28 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6) δ = 8.44 (s, 1H, NH), 7.86-7.83 (m, 2H, $^{\text{Phe}}\text{C}^{2,6}\text{-H}$), 7.33-7.27 (m, 2H, $^{\text{Phe}}\text{C}^{3,5}\text{-H}$), 3.61-3.57 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$), 3.57 (s, 6H, COOCH_3), 2.66-2.40 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 15.8 min; **ESI-MS** m/z 632.8 $[\text{2M}+\text{K}]^+$, 616.9 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$, 320.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 297.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-(4-Fluorbenzoylamino)-glutaräuredimethylester (1.87 g, 6.29 mmol) wurde nach AAV 22 in einem Zeitraum von 20 h umgesetzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in H_2O (5 mL) aufgenommen und die Disäure mit konz. HCl ausgefällt, filtriert und mit wenig kaltem H_2O gewaschen. Trocknen im Hochvakuum ergab 3-(4-Fluorbenzoylamino)-glutaräure **26** (1.39 g, 82 %) als weißen Feststoff.

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{FNO}_5$: 269.23 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6) δ = 12.12 (s, 2H, COOH), 8.44 (s, 1H, NH), 7.86-7.83 (m, 2H, $^{\text{Phe}}\text{C}^{2,6}\text{-H}$), 7.33-7.27 (m, 2H, $^{\text{Phe}}\text{C}^{3,5}\text{-H}$), 3.60-3.56 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$), 2.59-2.38 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 10.2 min;

ESI-MS m/z 921.9 [3M-2H+3K]⁺, 906.0 [3M-2H+Na+2K]⁺, 883.9 [3M-H+2K]⁺, 867.9 [3M-H+Na+K]⁺, 845.8 [3M+K]⁺, 615.1 [2M-H+2K]⁺, 599.1 [2M-H+Na+K]⁺, 577.0 [2M+K]⁺, 561.0 [2M+Na]⁺, 325.7 [M+H₂O+K]⁺, 292.1 [M+Na]⁺, 270.1 [M+H]⁺, 252.0 [M-OH+H]⁺.

3-(4-Fluorphenylcarbonylamino)-glutarsäure (**26**, 395 mg, 1.47 mmol) wurde bei 0 °C in Ethylacetat (4.5 mL) gelöst. Nach Zugabe von DCC (363 mg, 1.76 mmol, 1.2 Äq.) wurde 1 h bei 0 °C und anschließend weitere 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Abfiltrieren des Harnstoffs und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab 3-(4-Fluorbenzoylamino)-glutarsäureanhydrid **28** (355 mg, 96 %) als beigen Feststoff.

C₁₂H₁₀FNO₄: 251.21 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 8.44 (s, 1H, NH), 7.86-7.83 (m, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 7.33-7.27 (m, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 3.60-3.56 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.59-2.38 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 14.3 min; **ESI-MS** m/z 558.9 [2M+H₂O+K]⁺, 540.9 [2M+K]⁺, 524.7 [2M+Na]⁺, 291.4 [M+K]⁺, 279.9 [M-H+Na+Li]⁺, 274.1 [M+Na]⁺, 252.0 [M+H]⁺.

3-(4-Fluorbenzoylamino)-glutarsäureanhydrid (**28**, 412 mg, 1.64 mmol) wurde nach AAV 21 in 21 h umgesetzt und ergab **30** (787 mg, 95 %) als farbloses Öl.

C₂₇H₂₄FN₃O₆: 505.49 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.18 (s, 1H, COOH), 9.74 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.23 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 8.37 (s, 1H, NH), 7.89 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, arom.), 7.72 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, arom.), 7.44-7.23 (m, 8H, arom.), 4.30-4.18 (m, 3H, CH-CH₂-O), 3.57-3.54 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.59-2.38 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 27.9 min; **ESI-MS** m/z 1049.0 [2M+K]⁺, 1023.9 [2M+Na]⁺, 1010.8 [2M+H]⁺, 544.0 [M+K]⁺, 528.2 [M+Na]⁺, 506.1 [M+H]⁺, 179.1 [Fmoc-CO₂]⁺.

5-[N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(benzyloxy-carbonylamino)-pentansäure (31)

3-Aminoglutarsäuredimethylester (**25**, 4.53 g, 25.9 mmol) wurden in 1 M NaHCO₃-Lösung (52 mL) und Dioxan (120 mL) gelöst. Bei 0 °C wurde eine Lösung von Benzyloxycarbonylchlorid (4.85 g, 28.4 mmol) in Dioxan (80 mL) langsam zugetropft. Nach 1 h wurde das Eisbad entfernt und weitere 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 300 g Eis wurde das Gemisch mit Et₂O (4 x 100 mL) extrahiert, mit 2N HCl, gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung und gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (je 1 x 80 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und Reinigung durch Flashchromatographie (Hexan:Ethylacetat 4:1) ergab 3-Benzyloxycarbonylaminoglutarsäuredimethylester (6.21 g, 78 %) als gelbes Öl.

C₁₅H₁₉NO₆: 309.32 g/mol

R_f = 0.33 (Hexan:Ethylacetat 1:1); ¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.38-7.29 (m, 6H, ^{Bz}C²⁻⁶-H, NH), 5.03 (s, 2H, CH₂-^{Bz}C), 4.31-4.23 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.58 (s, 6H, OCH₃), 2.56 (d, 4H, J = 6.5 Hz, CH₂-CH-CH₂); ¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-d₆) δ = 171.1, 155.6, 137.5, 129.9, 128.6, 127.3, 55.1, 52.7, 50.4, 48.1; HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 18.9 min; ESI-MS m/z 641.0 [2M+Na]⁺, 332.2 [M+Na]⁺; EI-MS m/z 309.1 [M]⁺.

3-Benzyloxycarbonylaminoglutarsäuredimethylester (3.09 g, 10.0 mmol) wurde nach AAV 22 in einem Zeitraum von 2 h umgesetzt. Die Disäure wurde mit konz. HCl ausgefällt, filtriert und mit wenig kaltem H₂O gewaschen. Trocknen im Hochvakuum ergab 3-Benzyloxycarbonylaminoglutarsäure **27** (2.67 g, 95%) als weißen Feststoff.

C₁₃H₁₅NO₆: 281.26 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.03 (br. s, 2H, COOH), 7.38-7.29 (m, 6H, ^{Bz}C²⁻⁶-H, NH), 5.05 (s, 2H, CH₂-^{Bz}C), 4.31-4.23 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.65-2.51 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 12.9 min; ESI-MS m/z 881.9 [3M+K]⁺, 865.7 [3M+Na]⁺, 601.1 [2M+K]⁺, 584.9 [2M+Na]⁺, 562.8 [2M+H]⁺, 304.1 [M+Na]⁺, 281.9 [M+H]⁺, 238.1 [M-COO+H]⁺.

3-Benzoyloxycarbonylaminoglutarsäure (815 mg, 2.90 mmol) wurde bei 0 °C in Ethylacetat (9 mL) gelöst. Nach Zugabe von DCC (658 mg, 3.19 mmol, 1.1 Äq.) wurde 1 h bei 0 °C und anschließend weitere 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Abfiltrieren des Harnstoffs und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab 3-Benzoyloxycarbonylaminoglutarsäureanhydrid **29** (718 mg, 94 %) als farbloses Öl.

$C_{13}H_{13}NO_5$: 263.25 g/mol

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.38-7.29 (m, 5H, $BzC^{2-6}-H$), 5.39 (br s, 1H, NH), 5.09 (s, 2H, CH_2-BzC), 4.24-4.15 (m, 1H, $CH_2-CH-CH_2$), 2.96 (d, J = 5.3 Hz, 4H, $CH_2-CH-CH_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 12.9 min; **ESI-MS** m/z 566.8 $[2M+H_2O+Na]^+$, 548.8 $[2M+Na]^+$, 526.7 $[2M+H]^+$, 319.9 $[M+H_2O+K]^+$, 286.1 $[M+Na]^+$, 281.9 $[M+H_2O+H]^+$, 263.9 $[M+H]^+$, 246.1 $[M-OH+H]^+$.

3-Benzoyloxycarbonylaminoglutarsäureanhydrid (840 mg, 3.19 mmol) wurde nach AAV 21 in einem Zeitraum von 22 h umgesetzt und ergab **31** (1.63 g, 99 %) als farbloses Öl.

$C_{28}H_{27}N_3O_7$: 517.53 g/mol

1H -NMR (250 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 12.21 (s, 1H, COOH), 9.76 (s, 1H, NH-NH-CO- CH_2), 9.25 (s, 1H, NH-NH-CO- CH_2), 7.89 (d, J = 7.3 Hz, 2H, arom.), 7.72 (d, J = 6.7 Hz, 2H, arom.), 7.44-7.33 (m, 9H, NH, arom.), 4.82 (s, 2H, CH_2-BzC), 4.32-4.21 (m, 3H, $CH-CH_2-O$), 3.59-3.56 (m, 1H, $CH_2-CH-CH_2$), 2.91 (dd, J = 5.6/15.6 Hz, 1H, $HCH-CH-CH_2$), 2.35-2.45 (m, 3H, $HCH-CH-CH_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 21.8 min; **ESI-MS** m/z 1589.8 $[3M+K]^+$, 1573.7 $[3M+Na]^+$, 1551.8 $[3M+H]^+$, 1312.7 $[(5M+H+K)/2]^{2+}$, 1073.1 $[2M+K]^+$, 1056.9 $[2M+Na]^+$, 1034.9 $[2M+H]^+$, 795.8 $[(3M+H+K)/2]^{2+}$, 555.9 $[M+K]^+$, 540.2 $[M+Na]^+$, 518.0 $[M+H]^+$, 474.2 $[M-CO_2+H]^+$, 179.1 $[Fmoc-CO_2]^+$.

3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(4-phthalimidoxymethylphenyl)-propionsäure (42)

Terephthaldialdehyd-*mono*-diethylacetal (10.0 g, 48.0 mmol) wurde in MeOH (150 mL) gelöst. Bei 0 °C wurde portionsweise $NaBH_4$ zugegeben (2.36 g, 62.4 mmol, 1.3 Äq.) und nach 20 h mit Eis (200 g) die Reaktion gequencht. Mit 2N HCl wurde zuerst auf pH 2 und anschließend sofort mit gesättigter wässriger Na_2CO_3 -Lösung auf

pH 4 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (5 x je 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab 4-Hydroxymethylbenzaldehyd (**38**, 6.53 g, 100 %) als farbloses Öl.

C₈H₈O₂: 136.15 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.00 (s, 1H, CHO), 7.87 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ^{Ar}C^{2,6}-H), 7.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ^{Ar}C^{3,5}-H), 4.80 (s, 2H, CH₂-OH), 2.18 (br. s, 1H, OH); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 9.4 min; EI-MS *m/z* 136 [M]⁺.

38 (7.31 g, 53.7 mmol) wurde nach AAV 16 (Malonsäure-mono-*tert*-butylester) über Nacht umgesetzt. Da die Aminosäure nicht ausfiel, wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in H₂O (100 mL) aufgenommen und mit gesättigter wässriger Na₂CO₃-Lösung auf pH 9-10 eingestellt. Extraktion mit CH₂Cl₂ (4 x 80 mL), Trocknen über MgSO₄ und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab 3-Amino-3-(4-hydroxymethylphenyl)-propionsäure-*tert*-butylester **39** (3.88 g, 29 %) als gelbes Öl.

C₁₄H₂₁NO₃: 251.32 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ^{Ar}C^{2,6}-H), 7.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ^{Ar}C^{3,5}-H), 5.06 (br. s, 1H, OH), 4.44 (s, 2H, CH₂-OH), 2.43 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂-CO), 1.81 (br. s, 2H, NH₂); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 11.3 min; ESI-MS *m/z* 252.1 [M+H]⁺, 196.0 [M-*t*Bu+2H]⁺.

Die Umsetzung von **39** (0.92 g, 3.66 mmol) nach AAV 17 und Reinigung durch Flashchromatographie (Hexan:Ethylacetat 3:1 800 mL, 2:1 1200 mL, 1:1 600 mL) ergab 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(4-hydroxymethylphenyl)-propionsäure-*tert*-butylester (**40**, 1.20 g, 69 %) als weißen Feststoff.

C₂₉H₃₁NO₅: 473.56 g/mol

R_f = 0.3 (Hexan:Ethylacetat 2:1); ¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.86 (d, *J* = 7.8 Hz, 3H, arom., NH), 7.65 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, arom.), 7.42-7.23 (m, 8H, arom.), 5.09 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, OH), 4.93-4.84 (m, 1H, NH-CH), 4.44 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH₂-OH), 4.29-4.23 (m, 3H, CH-CH₂-O), 2.64-2.57 (m, 2H, CH₂-CO), 1.30 (s, 9H,

(CH₃)₃); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 26.2 min; **ESI-MS** *m/z* 1202.8 [(5M+H+K)2]²⁺, 968.9 [2M+Na]⁺, 873.1 [2(M+*t*Bu+H)+K]⁺, 857.1 [2(M+*t*Bu+H)+Na]⁺, 729.9 [(3M+H+K)2]²⁺, 701.8 [(3M+2H)2]²⁺, 474.0 [M+H]⁺, 418.1 [M-*t*Bu+2H]⁺, 179.2 [Fmoc-CO₂]⁺.

Zu einer Lösung aus **40** (1.20 g, 2.53 mmol), *N*-Hydroxyphthalimid (412 mg, 2.53 mmol) und Triphenylphosphin (662 mg, 2.53 mmol) in trockenem THF (10 mL) bei 0 °C unter Argon wurde DIAD (0.5 mL, 2.53 mmol) über eine Spritze zugetropft und die Reaktionsmischung über Nacht gerührt. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und Reinigung durch Flashchromatographie (Hexan:Ethylacetat 3:1 400mL, 2:1 1800 mL) ergab 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(4-phthalimidoxymethylphenyl)-propionsäure-*tert*-butyl-ester (**41**, 1.55 g, 99 %) als weißen Feststoff.

C₃₇H₃₄N₂O₇: 618.68 g/mol

R_f = 0.1 (Hexan:Ethylacetat 2:1); **¹H-NMR** (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.84 (s, 1H, NH), 7.92-7.84 (m, 6H, arom.), 7.64 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, arom.) 7.45-7.27 (m, 8H, arom.), 5.13 (s, 2H, CH₂-O-N), 4.97-4.87 (m, 1H, NH-CH), 4.31-4.17 (m, 3H, CH-CH₂-O), 2.63 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂-CO), 1.29 (s, 9H, (CH₃)₃); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 30.0 min; **ESI-MS** *m/z* 1258.8 [2M+Na]⁺, 1236.8 [2M+H]⁺, 947.3 [(3M+H+K)2]²⁺, 657.1 [M+K]⁺, 641.2 [M+Na]⁺, 601.1 [M-*t*Bu+K]⁺, 585.3 [M-*t*Bu+Na]⁺, 563.1 [M-*t*Bu+H]⁺, 179.2 [Fmoc-CO₂]⁺.

Die Umsetzung von **41** (1.55 g, 2.51 mmol) nach AAV 11a (ohne TIPS) bei RT ergab 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(4-phthalimidoxymethylphenyl)-propionsäure (**42**, 1.41 g, 100 %) als weißen Feststoff.

C₃₃H₂₆N₂O₇: 562.57 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.84 (s, 1H, NH), 7.94-7.84 (m, 6H, arom.), 7.65 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, arom.) 7.48-7.25 (m, 8H, arom.), 5.13 (s, 2H, CH₂-O-N), 4.98-4.89 (m, 1H, NH-CH), 4.27-4.15 (m, 3H, CH-CH₂-O), 2.76-2.60 (m, 2H, CH₂-CO); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 24.8 min; **ESI-MS** *m/z* 1163.1 [2M+K]⁺, 1147.1 [2M+Na]⁺, 1124.9 [2M+H]⁺, 601.2 [M+K]⁺, 585.3 [M+Na]⁺, 563.1 [M+H]⁺, 179.2 [Fmoc-CO₂]⁺.

***N*-Fmoc-Hydrazin (34)**

Hydrazinoameisensäure-*tert*-butylester (5.0 g, 37.8 mmol) und DIPEA (7.9 mL, 45.4 mmol) wurden unter Argonatmosphäre in trockenem THF (50 mL) gelöst. Man fügte portionsweise Fmoc-Cl (9.78 g, 37.8 mmol, 1 Äq.) hinzu und ließ den Ansatz über Nacht bei RT rühren. Anschließend trennte man den weißen Niederschlag ab und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wurde einem 1:1 Gemisch TFA:CH₂Cl₂ (ca. 100 mL) gelöst und für 30 min bei RT gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel vollständig entfernt und der erhaltene Feststoff in Ethylacetat (200 mL) aufgenommen, mit 10 %iger wässriger NaHCO₃-Lösung (3 x 100 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (1 x 100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum bis zur Trockne einrotiert. Den Rückstand lyophilisierte man aus Dioxan und erhielt **34** (8.2 g, 85 %) als weißen Feststoff.

C₁₅H₁₄N₂O₂: 254.28 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.34 (br. s, 1H, H₂N-NH), 7.88 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, ^{Fmoc}C-H), 7.69 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, ^{Fmoc}C-H), 7.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, ^{Fmoc}C-H), 7.32 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, ^{Fmoc}C-H), 4.32-4.15 (m, 3H, CH-CH₂), 4.07 (br. s, 2H, H₂N-NH); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 16.1 min; ESI-MS *m/z* 357.8 [M-2H+2H₂O+3Na]⁺, 338.3 [M-2H+H₂O+3Na]⁺, 317.2 [M-H+H₂O+2Na]⁺, 179.2 [M-CO₂-N₂H₃]⁺.

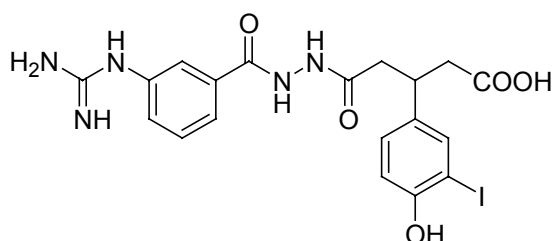
5-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)-3*H*-[1,3,4]oxadiazol-2-on (46)^[336]

Eine Suspension von Fmoc-Hydrazin (**34**, 0.995 g, 3.91 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL) und gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (40 mL) wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und 5 min heftig gerührt. Danach beließ man die Reaktionsmischung 5 min ohne Rühren, spritzte zur organischen (unteren) Phase Phosgen (1.9 M in Toluol, 6.3 mL, 11.7 mmol, 3 Äq.) und begann unmittelbar nach der Zugabe die Reaktionsmischung wieder zu rühren. Nach 10 min wurde das Reaktionsgemisch mit H₂O (15 mL) und CH₂Cl₂ (15 mL) versetzt. Anschließend wurden die Phasen getrennt, die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ (2 x 40 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab **46** (1.03 g, 94 %) als farblosen Feststoff.

$C_{16}H_{12}N_2O_3$: 280.28 g/mol

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.00 (br. s, 1H, NH), 7.75 (d, J = 7.4 Hz, 2H, $Fmoc$ -C-H), 7.58 (d, J = 7.9 Hz, 2H, $Fmoc$ -C-H), 7.45 (t, J = 7.4 Hz, 2H, $Fmoc$ -C-H), 7.35 (t, J = 7.5 Hz, 2H, $Fmoc$ -C-H), 4.49 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH- CH_2), 4.36 (t, J = 7.3 Hz, 1H, CH- CH_2); ^{13}C -NMR (62.5 MHz, $CDCl_3$) δ = 156.1, 152.5, 142.4, 141.3, 128.2, 127.3, 125.1, 120.2, 72.9, 46.2; IR (KBr) ν = 3300s, 1780s, 1650s, 1451m, 1426m, 1347m, 1224m, 918m, 758w, 740m cm^{-1} .

9.4.2 RGD-Mimetika



5-[N'-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-3-(3-iod-4-hydroxyphenyl)-5-oxopentansäure (21I)

Mit 5-[N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(4-methoxyphenyl)-pentansäure belegtes TCP-Harz (2.5 g, 0.50 mmol/g, 1.26 mmol) ergab nach AAV 5, 24 (35), 28, 8a, 11a und Lyophilisieren den Methylether (Rohprodukt 590 mg). Zu der Suspension des Methylethers in trockenem CH_2Cl_2 (25 mL) wurde bei -78 °C eine BBr_3 -Lösung (1M Lösung in CH_2Cl_2 , 20 mL, 16 Äq.) langsam zugetropft und weitere 7 h bei -78 °C gerührt. Man ließ die Reaktionsmischung langsam auftauen und beendete die Reaktion nach 16 h durch Zugabe von H_2O (100 mL). Die organische Phase wurde mit H_2O gewaschen (2 x je 20 mL). Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit 1N NaOH neutralisiert und lyophilisiert (155 mg). Die HPLC-Reinigung (B, 10-50 % in 30 min) und Lyophilisieren ergab das TFA-Salz von 21 (45 mg, 7 %) als weißen Feststoff.

$C_{19}H_{21}N_5O_5 \cdot TFA$: 399.40*114.02 g/mol

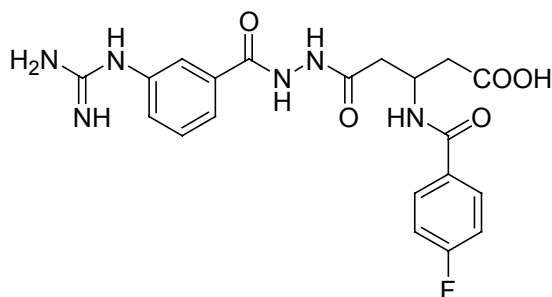
1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ = 12.05 (br. s, 1H, COOH), 10.32 (s, 1H, NH-NH-CO- CH_2), 9.92 (s, 1H, NH- $^{Ar}C^{quart}$), 9.83 (s, 1H, NH-NH-CO- CH_2), 9.18 (s, 1H, OH), 7.76 (d, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.70 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.49-7.57 (m, 5H, $^{Gua}N_2H_4$),

7.41 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, $^{Ar}C^4-H$), 7.04 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, $^{Phe}C^{2,6}-H$), 6.65 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, $^{Phe}C^{3,5}-H$), 3.45-3.36 (m, 1H, $CH_2-CH-CH_2$), 2.71 (dd, $J = 5.3/15.5$ Hz, 1H, $HCH-CH-CH_2$), 2.40-2.51 (m, 3H, $HCH-CH-CH_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 6.4$ min; **ESI-MS** m/z 1236.3 $[3M+K]^+$, 1198.1 $[3M+H]^+$, 837.2 $[2M+K]^+$, 821.2 $[2M+Na]^+$, 799.1 $[2M+H]^+$, 438.2 $[M+K]^+$, 422.1 $[M+Na]^+$, 400.2 $[M+H]^+$.

IPy_2BF_4 (56 mg, 150 μ mol, 1.5 Äq.) wurde unter Argon und Lichtausschluß in trockenem CH_2Cl_2 (1.5 mL) gelöst und **21** (40 mg, 100 μ mol Rohprodukt) zugegeben. Anschließend wurde TFA (165 μ L) in trockenem CH_2Cl_2 (150 μ L) zu dem Reaktionsgemisch getropft und 15 min gerührt. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, HPLC-Reinigung (C, 10-30 % in 30 min) und Lyophilisieren ergab das TFA-Salz von **21I** (3 mg, 5 % vom Rohprodukt) als weißen Feststoff.

$C_{19}H_{20}IN_5O_5 \cdot TFA$: 525.30*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) $\delta = 12.01$ (br. s, 1H, $COOH$), 10.32 (s, 1H, $NH-NH-CO-CH_2$), 10.10 (s, 1H, $NH-^{Ar}C$), 9.92 (s, 1H, $NH-NH-CO-CH_2$), 7.74 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, $^{Ar}C^6-H$), 7.69 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H, $^{Ar}C^2-H$), 7.55-7.52 (m, 6H, $^{Ar}C^5-H$, $GuaN_2H_4$, $^{Phe}C^2-H$), 7.40 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, $^{Ar}C^4-H$), 7.09 (dd, $J = 2.1/8.6$ Hz, 1H, $^{Phe}C^6-H$), 6.78 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, $^{Phe}C^2-H$), 3.42-3.35 (m, 1H, $CH_2-CH-CH_2$), 2.67 (dd, $J = 5.6/15.6$ Hz, 1H, $HCH-CH-CH_2$), 2.53-2.41 (m, 3H, $HCH-CH-CH_2$); **HPLC** (5-40 % in 30 min) $R_t = 16.5$ min; **ESI-MS** m/z 875.5 $[2M-H+2K]^+$, 859.5 $[2M-H+Na+K]^+$, 837.4 $[2M+K]^+$, 821.3 $[2M+Na]^+$, 799.3 $[2M+H]^+$, 438.3 $[M+K]^+$, 422.3 $[M+Na]^+$, 400.3 $[M+H]^+$.



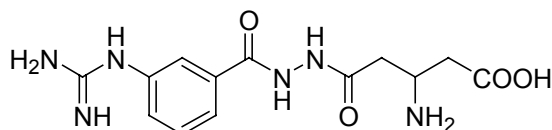
5-[N'-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-3-[N-(4-fluorbenzoyl)-amino]-5-oxopentansäure (**22F**)

0.2 g TCP-Harz wurde nach AAV 1 mit **30** (0.24 mmol) belegt. Die Umsetzung des belegten Harzes (270 mg, 0.60 mmol/g) nach AAV 5, 24 (**35**), 28, 11a, HPLC-

Reinigung (C, 17-26 % in 15 min) und Lyophilisieren ergab das TFA-Salz von **22F** (22.2 mg, 25 %) als weißen Feststoff.

$C_{20}H_{21}FN_6O_5 \cdot TFA$: 444.42*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.19 (s, 1H, COOH), 10.40 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 10.03 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.70 (br. s, 1H, NH- ^{Ar}C), 8.39 (d, J = 8.2 Hz, 1H, CO-NH-CH), 7.90-7.87 (m, 2H, $^{Bz}C^{2,6}$ -H), 7.78 (d, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.71 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.55 (t, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^5$ -H), 7.48-7.44 (m, 4H, $^{Gua}N_2H_4$), 7.42 (d, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^4$ -H), 7.31-7.28 (m, 2H, $^{Bz}C^{3,5}$ -H), 4.66-4.58 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.68-2.58 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 9.2 min; **ESI-MS** m/z 927.1 [2M+K]⁺, 911.0 [2M+Na]⁺, 888.9 [2M+H]⁺, 467.2 [M+Na]⁺, 445.1 [M+H]⁺.

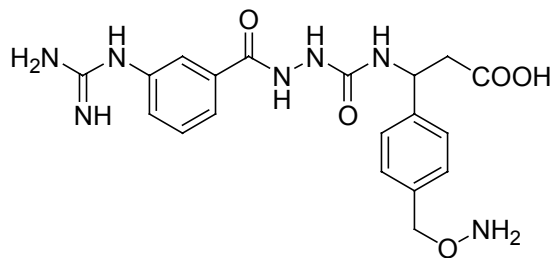


5-[N'-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-3-amino-5-oxopentansäure (**22**)

0.2 g TCP-Harz wurde nach AAV 1 mit **31** (0.24 mmol) belegt. Die Umsetzung des belegten Harzes (270 mg, 0.53 mmol/g) nach AAV 5, 24 (**35**), 28, 9, 14, HPLC-Reinigung (C, ODS-AQ; 5-40 % in 30 min) und Lyophilisieren ergab das TFA-Salz von **22** (18.9 mg, 24 %) als farblosen Feststoff.

$C_{13}H_{18}N_6O_4 \cdot TFA$: 322.32*228.05 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.23 (s, 1H, COOH), 10.40 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 10.03 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.70 (br. s, 1H, NH- ^{Ar}C), 7.78 (d, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.71 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.55 (t, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^5$ -H), 7.48-7.44 (m, 4H, $^{Gua}N_2H_4$), 7.42 (d, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^4$ -H), 3.42-3.30 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.62-2.30 (m, 4H, CH₂-CH-CH₂); **HPLC** (5-60 % in 30 min) R_t = 5.0 min; **ESI-MS** m/z 1004.9 [3M+K]⁺, 966.9 [3M+H]⁺, 721.1 [2M-H+2K]⁺, 705.1 [2M-H+Na+K]⁺, 683.1 [2M+K]⁺, 667.1 [2M+Na]⁺, 645.0 [2M+H]⁺, 361.0 [M+K]⁺, 345.1 [M+Na]⁺, 323.1 [M+H]⁺.

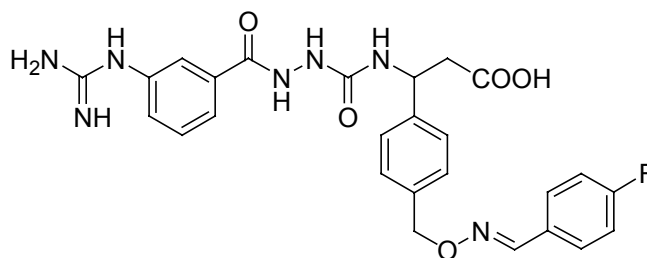


3-{N-[N'-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-aminooxy-methylphenyl)-propionsäure (**23**)

0.4 g TCP-Harz wurden nach AAV 1 mit **42** (284 mg, 0.50 mmol, 1.4 Äq.) belegt. Die weitere Umsetzung des Harzes (0.60 mmol/g) nach AAV 5, 23, 24 (**35**), 28 und 9a ergab **47** (Rohausbeute 195 mg, 84 %) als hellgelben Feststoff. Die Entschützung in trockenem Methanol (2.5 mL) unter Zugabe von Hydrazin Hydrat (500 μ L) in 2 h, anschließende HPLC-Reinigung (C, 5-25 % in 30 min) und Lyophilisieren ergab das TFA-Salz von **23** (47.6 mg, 30 %) als weißen Feststoff.

$C_{19}H_{23}N_7O_5 \cdot TFA$: 429.43*228.05 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.26 (br. s, 1H, COOH), 10.19 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.68 (s, 1H, NH- ^{Ar}C), 8.10 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.77 (d, J = 7.7 Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.69 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.53 (t, J = 7.7 Hz, 1H, $^{Ar}C^5$ -H), 7.42-7.39 (m, 5H, $^{Gua}N_2H_4$, $^{Ar}C^4$ -H), 7.35 (d, J = 8.1 Hz, 2H, $^{Phe}C^{2,6}$ -H), 7.30 (d, J = 8.1 Hz, 2H, $^{Phe}C^{3,5}$ -H), 7.01 (d, J = 8.5 Hz, 1H, NH-CH), 5.10-5.06 (m, 1H, NH-CH), 4.76-4.73 (m, 2H, CH_2 -CO-NH $_2$), 2.77-2.67 (m, 2H, NH-CH- CH_2); **HPLC** (5-90 % in 30 min) R_t = 7.1 min; **ESI-MS** m/z 1326.0 [3M+K] $^+$, 1288.2 [3M+H] $^+$, 919.3 [2M-H+Na+K] $^+$, 897.3 [2M+K] $^+$, 881.3 [2M+Na] $^+$, 859.2 [2M+H] $^+$, 468.3 [M+K] $^+$, 452.3 [M+Na] $^+$, 430.0 [M+H] $^+$.



3-{N-[N'-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-{4-[methyl-(4-fluorobenzaldehydoxim)]-phenyl}-propionsäure (23F)

Konjugation von **23** (1.0 mg, 1.5 μmol) nach AAV 15 ergab das TFA-Salz von **23F** (0.8 mg, 81 %) als farblosen Feststoff.

$\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{FN}_7\text{O}_5 \cdot \text{TFA}$: 535.53 * 114.02 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ = 12.21 (br. s, 1H, COOH), 10.21 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.71 (s, 1H, NH-ArC), 8.28 (s, 1H, N-CH-BzC), 8.06 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.73 (br. s, 3H, GuaN_2H_3), 7.66-7.63 (m, 4H, $\text{BzC}^{2,6}\text{-H}$, $\text{ArC}^{2,6}\text{-H}$), 7.45 (t, J = 7.2 Hz, 1H, $\text{ArC}^5\text{-H}$), 7.33-7.27 (m, 5H, $\text{PheC}^{2,3,5,6}\text{-H}$), 7.23 (t, J = 8.9 Hz, 2H, $\text{BzC}^{3,5}\text{-H}$), 7.19 (d, J = 8.6 Hz, 1H, NH-CH), 5.10 (s, 1H, $\text{PheC-CH}_2\text{-O}$), 4.96-4.92 (m, 1H, NH-CH), 2.63-2.55 (m, 2H, NH-CH- CH_2); **HPLC** (5-90 % in 30 min) R_t = 18.1 min; **ESI-MS** m/z 1071.1 $[\text{2M+H}]^+$, 536.2 $[\text{M+H}]^+$.

9.5 Synthese von RGD-Mimetika für die Tumorthherapie

9.5.1 Synthese der Bausteine

3-(N-Fmoc)-Amino-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure (51)

4-Chlorbenzaldehyd (4.22 g, 30 mmol) wurde nach AAV 16 umgesetzt und ergab 3-Amino-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure (4.73 g, 79 %) als weißen Feststoff.

$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClNO}_2$: 199.63 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, D_2O): δ = 7.49-7.33 (m, 4H, PheC-H), 4.60 (t, J = 8.1 Hz, 1H, $\text{NH}_2\text{-CH}$), 3.54 (d, J = 8.4 Hz, 1H, CH-CH_2), 2.80 (d, J = 8.1 Hz, 1H, CH-CH_2); **HPLC** (10-80 % in 30 min) R_t = 9.8 min; **ESI-MS** m/z 235.9 $[\text{M}^{37\text{Cl}}+\text{H}]^+$, 233.9 $[\text{M}^{35\text{Cl}}+\text{H}]^+$, 176.9 $[\text{M}^{37\text{Cl}}-\text{CH}_2\text{COOH}+\text{H}]^+$, 174.9 $[\text{M}^{35\text{Cl}}-\text{CH}_2\text{COOH}+\text{H}]^+$.

3-Amino-3-(4-chlor)-phenylpropionsäure (1.00 g, 5.0 mmol) wurde nach AAV 17 innerhalb von 25 h umgesetzt und ergab **51** (1.93 g, 91 %) als weißen Feststoff.

$C_{24}H_{20}ClNO_4$: 421.87 g/mol

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

3-(N-Fmoc)-Amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäure (**52**)

3,5-Dichlorbenzaldehyd (5.04 g, 28.8 mmol) wurde nach AAV 16 umgesetzt und ergab 3-Amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäure (3.08 g, 46 %) als weißen Feststoff.

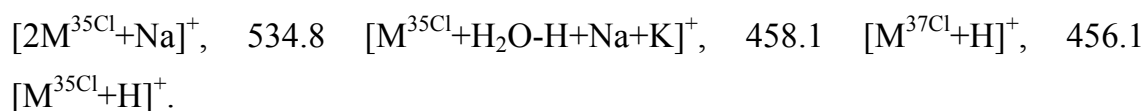
$C_9H_9Cl_2NO_2$: 234.08 g/mol

1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 7.49$ (s, 3H, $^{Phe}C-H$), 4.23 (m, 1H, NH₂-CH), 2.42 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 11.3$ min; **ESI-MS** m/z 235.9 [$M^{37Cl}+H$]⁺, 233.9 [$M^{35Cl}+H$]⁺, 176.9 [$M^{37Cl}-CH_2COOH+H$]⁺, 174.9 [$M^{35Cl}-CH_2COOH+H$]⁺.

3-Amino-3-(3,5-dichlor)-phenylpropionsäure (614 mg, 2.62 mmol) wurde mit Fmoc-Cl (679 mg, 2.62 mmol, 1 Äq.) nach AAV 17 innerhalb von 16 h umgesetzt und ergab **52** (1.04 g, 88 %) als weißen Feststoff.

$C_{24}H_{19}Cl_2NO_4$: 456.32 g/mol

$R_f = 0.7$ (Hexan:Ethylacetat:HOAc 1:2:0.1); 1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 12.35$ (br. s, 1H, COOH), 7.98 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH), 7.88 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, $^{Fmoc}C-H$), 7.64 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, $^{Fmoc}C-H$), 7.50-7.28 (m, 7H, $^{Fmoc/Phe}C-H$), 4.90 (dt, 1H, NH-CH), 4.28 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H, CH-CH₂-O), 4.19 (dd, 1H, CH-CH₂-O), 2.76-2.56 (m, 2H, CH₂-CO); **HPLC** (30-80 % in 30 min) $R_t = 26.7$ min; **ESI-MS** m/z 1405.7 [$M^{37Cl}+2M^{35Cl}+K$]⁺, 951.0 [$2M^{37Cl}+35Cl+K$]⁺, 949.0



5-[N'-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(4-chlorphenyl)-pentansäure (53)

4-Chlorbenzaldehyd (7.03 g, 50 mmol) wurde nach 19 unter Argon innerhalb von 5 d umgesetzt und ergab 2,4-Bisaceto-3-(4-chlor)-phenylglutarsäure-diethylester, der sofort zu 3-(4-Chlor)-phenylglutarsäure (4.81 g, 58 %), einen weißen Feststoff, verseift wurde.

$C_{11}H_{11}ClO_4$: 242.66 g/mol

1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.06 (br. s, 2H, COOH), 7.41-7.24 (m, 4H, $^{Phe}C-H$), 3.44-3.27 (m, 1H, $CH_2-CH-CH_2$), 2.64 (dd, J = 6.2 Hz/15.8 Hz, 2H, $CH-(HCH)_2$), 2.50 (dd, J = 8.8 Hz/15.6 Hz, 2H, $CH-(HCH)_2$); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 15.6 min; ESI-MS m/z 1218.3 $[5M^{3(37Cl)+2(35Cl)}+2H]^+$, 1036.9 $[4M^{35Cl}+3Na]^+$, 265.0 $[M^{35Cl}+Na]^+$.

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

$C_{11}H_9ClO_3$: 224.64 g/mol

R_f = 0.8 (Hexan:Ethylacetat:HOAc 1:1:0.1); 1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.43 (d, J = 8.5 Hz, 2H, $^{Phe}C^{2,6}$), 7.32 (d, J = 8.5 Hz, 2H, $^{Phe}C^{3,5}$), 3.61-3.55 (m, 1H, $CH_2-CH-CH_2$), 3.09-2.90 (m, 4H, $CH_2-CH-CH_2$); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 22.5 min; ESI-MS m/z 265.2 $[M+H_2O+Na]^+$.

3-(4-Chlor)-phenylglutarsäureanhydrid (674 mg, 3.0 mmol) wurde nach AAV 21 mit Fmoc-Hydrazin (34) (763 mg, 3.0 mmol) innerhalb von 48 h umgesetzt und ergab 53 (1.51 g, 100 %) als farbloses Öl.

$C_{26}H_{23}ClN_2O_5$: 478.92 g/mol

R_f = 0.1 (Hexan:Ethylacetat:HOAc 1:1:0.1); 1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.43 (br. s, 1H, COOH), 9.74 (s, 1H, NH), 9.08 (s, 1H, NH), 7.86 (d, J = 7.5 Hz, 2H, arom.), 7.68 (d, J = 7.5 Hz, 2H, arom.), 7.39-7.10 (m, 8H, arom.), 4.26-4.11

(m, 3H, *CH-CH₂-O*), 3.52-3.41 (m, 1H, *CH₂-CH-CH₂*), 2.62-2.33 (m, 4H, *CH₂-CH-CH₂*); **HPLC** (10-60 % in 30 min) $R_t = 31.0$ min; **ESI-MS** m/z 978.9 $[2M^{35Cl}+Na]^+$, 957.1 $[2M^{35Cl}+H]^+$, 479.0 $[M^{35Cl}+H]^+$.

5-[*N'*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(3,5-dichlor)-phenylpentansäure (54)

3,5-Dichlorbenzaldehyd (5.0 g, 28.6 mmol) wurde nach AAV 19 unter Argon innerhalb von 5 d umgesetzt. Umkristallisieren aus der 2-fachen Menge Ethanol (70 mL, aufgrund schlechter Löslichkeit) ergab 2,4-Bisaceto-3-(3,5-dichlor)-phenylglutarsäurediethylester, der sofort zu 3-(3,5-Dichlorphenyl)-glutarsäure (5.46 g, 93 %), einen weißen Feststoff, verseift wurde.

$C_{11}H_{10}Cl_2O_4$: 277.10 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) $\delta = 12.02$ (br. s, 2H, COOH), 7.41 (s, 1H, ^{Phe}C⁴-*H*), 7.35 (s, 2H, ^{Phe}C^{3,6}-*H*), 3.43-3.39 (m, 1H, *CH₂-CH-CH₂*), 2.65-2.51 (m, 4H, *CH₂-CH-CH₂*); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 17.1$ min; **ESI-MS** m/z 595.0 $[2M^{37Cl}+K]^+$, 591.0 $[2M^{35Cl+35Cl}+K]^+$, 577.0 $[2M^{35Cl+37Cl}+Na]^+$, 575.1 $[2M^{35Cl+35Cl}+Na]^+$.

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

$C_{11}H_8Cl_2O_3$: 259.08 g/mol

$R_f = 0.8$ (Hexan:Ethylacetat:HOAc 1:1:0.1); **¹H-NMR** (250 MHz, CDCl₃) $\delta = 7.53$ (s, 1H, ^{Phe}C⁴-*H*), 7.40 (s, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-*H*), 3.64-3.58 (m, 1H, *CH₂-CH-CH₂*), 3.13-2.94 (m, 4H, *CH₂-CH-CH₂*); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 23.9$ min; **ESI-MS** m/z 299.1 $[M+H_2O+Na]^+$.

3-(3,5-Dichlor)-phenylglutarsäureanhydrid (777 mg, 3.0 mmol) wurde nach AAV 21 mit Fmoc-Hydrazin (**34**) (763 mg, 3.0 mmol) innerhalb von 10 h umgesetzt und ergab **54** (1.62 g, 100 %) als farbloses Öl.

$C_{26}H_{22}Cl_2N_2O_5$: 513.37 g/mol

$R_f = 0.2$ (Hexan:Ethylacetat:HOAc 1:1:0.1); $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 9.69$ (s, 1H, NH), 9.11 (s, 1H, NH), 7.82 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, $^{\text{Fmoc}}\text{C-H}$), 7.70 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, $^{\text{Fmoc}}\text{C-H}$), 7.48-7.21 (m, 7H, $^{\text{Fmoc/Phc}}\text{C-H}$), 4.36-4.13 (m, 3H, CH- $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.52-3.36 (m, 1H, CH $_2\text{-CH-CH}_2$), 2.72-2.25 (m, 4H, CH $_2\text{-CH-CH}_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 23.6$ min; **ESI-MS** m/z 535.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 513.0 $[\text{M}+\text{H}]$.

3-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-aminomethylphenylethylester (105)

1,3-Phenyldiacetonitril (6.25 g, 40 mmol) wurden unter Zusatz von 33 %iger Schwefelsäure (65 mL) 2 h unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Der ausgefallene weiße Feststoff wurde abfiltriert, mit H $_2$ O gewaschen und ergab nach Trocknen im Hochvakuum **102** (7.46 g, 94 %).

C $_{10}$ H $_{10}$ O $_4$: 194.18 g/mol

Smp. 173 °C; $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 12.25$ (br. s, 2H, COOH), 7.25-7.14 (m, 3H, arom.), 3.55 (s, 4H, CH $_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 11.2$ min.

102 (7.31 g, 38 mmol) wurde unter Zusatz von katalytischen Mengen konz. Schwefelsäure (0.8 mL) in abs. Ethanol (22 mL) 8 h unter Rückfluss gekocht. Nach dem Entfernen des Lösemittels im Vakuum wurde der Rückstand in Eiswasser (150 mL) aufgenommen und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde zusätzlich mit Et $_2$ O (4 x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zuerst mit einer gesättigter Na $_2$ CO $_3$ -Lösung und anschließend mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO $_4$ getrocknet und Einengen im Vakuum bis zur Trockene ergab **103** (8.28 g, 87 %) als hellgelbes Öl.

C $_{14}$ H $_{18}$ O $_4$: 250.29 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 7.24$ -7.14 (m, 4H, arom.), 4.10 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, O-CH $_2$ -CH $_3$), 3.65 (s, 4H, $^{\text{Ar}}\text{C-CH}_2$), 1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, O-CH $_2$ -CH $_3$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 22.8$ min.

102 (5.0 g, 20 mmol) und **103** (6.6 g, 34 mmol) wurden in EtOH (1.6 mL), konz. HCl (1 mL) und Di-*n*-butylether (9 mL) 22 h unter Rückfluß gekocht. Die abgekühlte

Lösung wurde mit Toluol (10 mL) versetzt, wodurch nicht umgesetzte 3-Phenyldiessigsäure ausfiel, welche durch Filtration abgetrennt wurde und zweimal mit 10 mL Toluol gewaschen und im Hochvakuum getrocknet wurde. Die Toluolphase wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und anschließend mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und Einengen im Vakuum bis zur Trockene ergab 1,3-Phenyldiessigsäureethylester. Ansäuern der wässrigen Phase mit 10 %iger HCl auf pH 2, Extrahieren mit Diethylether, Trocknen über MgSO₄ und Einengen im Vakuum bis zur Trockene ergab **104** (3.64 g, 82 %) als gelbes Öl.

C₁₂H₁₄O₄: 222.24 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.20 (br. s, 1H, COOH), 7.23-7.12 (m, 4H, ^{Phe}C^{2,4,5,6}-H), 4.10 (q, J = 7.1 Hz, 2H, O-CH₂-CH₃), 3.65 (s, 4H, ^{Phe}C-CH₂), 1.25 (t, J = 7.1 Hz, 3H, O-CH₂-CH₃); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 16.5 min.

104 (2.60 g, 11.71 mmol) wurde in trockenem Toluol (11 mL) unter Zugabe von Triethylamin (1 Äq., 1.63 mL, 11.71 mmol) und DPPA (1 Äq., 2.52 mL, 11.71 mmol) 45 min bei 100 °C refluxiert, wobei ein Stickstoffentwicklung erfolgte. Die Reaktionsmischung ließ man auf 60 °C abkühlen und gab trockenes *tert*-Butanol (5 Äq., 5.6 mL, 58.51 mmol) in trockenem Toluol zu. Die Lösung wurde weitere 20 h bei 115 °C refluxiert. Nach Zugabe von Toluol (28 mL) wurde mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, 10 %iger Zitronensäure und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt **105** (3.14 g, 91 %) als gelbes Öl.

C₁₆H₂₃NO₄: 293.36 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 7.33-7.16 (m, 4H, ^{Phe}C^{2,4,5,6}-H), 5.17 (br. s, 1H, NH), 4.33 (d, J = 5.8 Hz, 2H, NH-CH₂), 4.11 (q, J = 7.0 Hz, 2H, O-CH₂-CH₃), 3.56 (s, 2H, ^{Phe}C-CH₂), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.22 (t, J = 7.0 Hz, 3H, O-CH₂-CH₃); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 23.2 min.

3-(*N*-Fmoc)-Aminomethylbenzoesäure modifiziert nach Jackson *et al.*^[398]

3-Cyanobenzoesäure (4.22 g, 28.7 mmol) wurde in Ethanol (95 mL) bei 50 °C unter Rühren gelöst. Nach Zugabe von 5 % Pd/C (0.45 g) wurde die Suspension 2 d bei

35 °C unter Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck stark gerührt. Der Katalysator wurde durch Filtration über Celite abgetrennt und mit H₂O gewaschen. Einengen des Filtrats im Vakuum und Lyophilisieren aus H₂O (50 mL) ergaben 3-(Aminomethyl)-benzoesäure (3.82 g, 88 %) als farbloses Öl.

C₈H₉NO₂: 151.16 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.59 (s, 1H, COOH), 8.49 (s, 2H, NH₂), 8.08 (s, 1H, ^{Bz}C²-H), 7.81 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, ^{Bz}C⁶-H), 7.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ^{Bz}C⁴-H), 7.40 (dd, *J* = 7.6 Hz, 1H, ^{Bz}C⁵-H), 3.96 (s, 2H, CH₂); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 5.6 min.

3-Aminomethylbenzoesäure (3.82 g, 25.3 mmol) wurde nach AAV 17 innerhalb von 20 h mit Fmoc-Cl (6.54 g, 25.3 mmol) umgesetzt. Reinigung mittels Flashchromatographie (Hexan:Ethylacetat 5:1) ergab 3-(*N*-Fmoc)-Aminomethylbenzoesäure (6.32 g, 67 %) als farblosen Feststoff.

C₂₃H₁₉NO₄: 373.40 g/mol

R_f = 0.6 (Hexan:Ethylacetat 1:1); ¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 7.92-7.80 (m, 1H, arom.), 7.67 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, arom.), 7.44-7.28 (m, 6H, arom., NH), 4.33 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂-CH), 4.27-4.18 (m, 3H, CH₂-CH, CH₂-^{Bz}C); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 23.5 min; ESI-MS *m/z* 1158.4 [3M+K]⁺, 1142.5 [3M+Na]⁺, 785.4 [2M+K]⁺, 769.2 [2M+Na]⁺, 747.2 [2M+H]⁺, 396.3 [M+Na]⁺, 374.2 [M+H]⁺, 179.2 [Fmoc-CO₂]⁺.

2-(*N*-Fmoc)-(3-Aminophenyl)-essigsäure

Die Umsetzung von 2-(3-Aminophenyl)-essigsäure (1.51 g, 10 mmol) nach AAV 17 und Umkristallisieren aus einem Hexan/Ethylacetat-Gemisch ergab 2-(*N*-Fmoc)-(3-Aminophenyl)-essigsäure (3.17g, 85 %) als weißen Feststoff.

C₂₃H₂₉NO₄: 373.40 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.30 (br. s, 1H, COOH), 9.70 (s, 1H, NH), 7.89 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, arom.), 7.75 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, arom.), 7.48-7.26 (m, 6H, arom.), 7.19 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, arom.), 6.89 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, arom.), 4.45 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂-CH), 4.30 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, CH₂-CH), 3.49 (s, 2H, CH₂-COOH);

HPLC (10-90 % in 30 min) $R_t = 25.0$ min; **ESI-MS** m/z 784.9 $[2M+K]^+$, 769.0 $[2M+Na]^+$, 412.1 $[M+K]^+$, 396.1 $[M+Na]^+$, 373.9 $[M+H]^+$, 179.2 $[Fmoc-CO_2]^+$.

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

5-Bromopentansäureethylester (31.36 g, 12 mL, 150 mmol) wurden zusammen mit 2-Amino-4-methylpyridin (32.44 g, 300 mmol, 2 Äq.) unter Rühren 16 h auf 100 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf RT wurde die Reaktionsmischung mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung (100 mL) versetzt und mit Et_2O (5×50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab ein gelbes Öl als Rohprodukt (24 g). Reinigung mittels Flashchromatographie ergab das Produkt 5-[*N*-(4-Methylpyridin-2-yl)-amino]-pentansäureethylester (6.30 g, 19 %) als weißen Feststoff.

$C_{13}H_{20}N_2O_2$: 236.31 g/mol

$R_f = 0.5$ (Hexan:Ethylacetat 1:10); 1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 7.78$ (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, NH), 6.28-6.25 (m, 2H, $^{Py}C^5-H$ und $^{Py}C^6-H$), 6.22 (s, 1H, $^{Py}C^3-H$), 4.02 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, O- CH_2-CH_3), 3.18 (dt, $J = 6.6$ Hz, 2H, NH- CH_2), 2.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2-CH_2-CO), 2.10 (s, 3H, $^{Py}C-CH_3$), 1.62-1.42 (m, 4H, $CH_2-CH_2-CH_2$) 1.15 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, O- CH_2-CH_3); **HPLC** (10-60 % in 30 min) $R_t = 14.8$ min; **ESI-MS** m/z 237.1 $[M+H]^+$, 191.1 $[M-OEt]^+$.

5-[*N*-(4-Methylpyridin-2-yl)-amino]-pentansäureethylester (6.30 g, 26.7 mmol) wurde in MeOH (8 mL) gelöst und 20 h bei Raumtemperatur mit 2N wässriger NaOH (16 mL, 32 mmol, 1.2 Äq.) behandelt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung im Vakuum eingeeengt und mit 1N HCl auf pH 4.5 eingestellt, so dass das Produkt ausfiel. Die Kristallisation der Mischung wurde über Nacht im Kühlschrank vervollständigt. Abfiltrieren des Niederschlags, Waschen mit H_2O (5 mL) und Trocknen im Vakuum ergab 5-[*N*-(4-Methylpyridin-2-yl)-amino]-pentansäure (4.47 g, 81 %) als gelblichen Feststoff.

$C_{11}H_{16}N_2O_2$: 208.26 g/mol

1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 7.79$ (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, NH), 6.30-6.26 (m, 2H, $^{Py}C^5-H$ und $^{Py}C^6-H$), 6.22 (s, 1H, $^{Py}C^3-H$), 3.17 (dt, $J = 5.8$ Hz, 2H, NH- CH_2),

2.21 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 2.11 (s, 3H, $^{\text{Py}}\text{C-CH}_3$), 1.58-1.41 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); $^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 174.6, 159.3, 147.3, 146.8, 113.1, 107.9, 40.5, 33.7, 28.8, 22.4, 20.8$; **HPLC** (10-60 % in 30 min) $R_t = 9.6$ min; **ESI-MS** m/z 209.2 $[\text{M+H}]^+$, 191.2 $[\text{M-OH}]^+$.

1-Boc-(3,5-Dimethylpyrazol-2-yl)-4,5-dihydro-1H-imidazol (57)^[399]

Eine Lösung von KOtBu (1.07 g, 9.0 mmol) in trockenem DMF (20 mL) wurde bei -5 °C mit 2-(3,5-Dimethylpyrazol)-4,5-dihydro-1H-imidazol*HBr (1.00 g, 4.1 mmol) versetzt. Nach Zugabe von Boc_2O (0.98 g, 4.5 mmol) bei gleicher Temperatur wurde das Reaktionsgemisch 2 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde weiteres KOtBu (0.46 g, 4.1 mmol) und Boc_2O (0.89 g, 4.1 mmol) zugegeben und bei Raumtemperatur 28 h gerührt. Zugabe von H_2O , Extraktion mit Ethylacetat, Trocknen über MgSO_4 Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab **57** (1.04 g, 97%) als gelbes Öl.

$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$: 264.32 g/mol

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6) $\delta = 6.08$ (s, 1H, CH), 3.94-3.83 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 3.80-3.75 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2.23 (s, 3H, CH_3), 2.11 (s, 3H, CH_3), 1.16 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 15.1$ min; **EI-MS** m/z 264.1 $[\text{M}]^+$; **ESI-MS** m/z 287.2 $[\text{M+Na}]^+$.

N-(1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-2-yl)-3-aminobenzoessäure (63)

Zu einer Lösung aus 2-Aminopyrimidin (3.75 g, 39.4 mmol) in wässriger HBF_4 (43 %, 135 mL) wurde bei -15 °C innerhalb 40 min eine Lösung Natriumnitrit (5.7 g, 82.6 mmol) in H_2O (22.5 mL) zugetropft. Nach erfolgter Zugabe wurde die türkise Lösung weitere 30 min bei -15 °C gerührt und anschließend mit 10N wässriger NaOH auf einen pH-Wert von 6-7 eingestellt. Nach dem Ausschütteln der gelben Lösung mit Et_2O (4 x 75 mL), wurde der Extrakt mit wässriger Kaliumcarbonat-Lösung (2 %ig, 1 x 15 mL) und H_2O (2 x 15 mL) gewaschen. Die organische Phase trocknete man über MgSO_4 getrocknet entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Destillation des Rückstands im Wasserstrahlvakuum ergab 2-Fluorpyrimidin (**60**, 1.30 g, 34 %) als farblose Flüssigkeit.

$\text{C}_4\text{H}_3\text{FN}_2$: 98.08 g/mol

Sdp. 56 °C (Wasserstrahlvakuum); **¹H-NMR** (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.81 (dd, 2H, ^{Pym}C^{4,6}-H), 7.58-7.52 (m, 1H, ^{Pym}C⁵-H); **¹³C-NMR** (62.5 MHz, DMSO-d₆): δ = 164.1, 162.0, 161.8, 160.7, 120.5, 120.4; **EI-MS** *m/z* 98.0 [M].

3-Aminobenzoesäureethylester (0.84 g, 5.1 mmol), 2-Fluorpyrimidin (**60**, 1.0 g, 10.2 mmol) und BF₃·Et₂O (0.5 mL) wurden in trockenem DMF (10 mL) 18 h bei 60 °C erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 1N HCl (100 mL) aufgenommen und mit Ethylacetat (4 x 80 mL) extrahiert. Trocknen über MgSO₄ und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab **62** (1.23 g, 99 %) als farblosen Feststoff.

C₁₃H₁₃N₃O₂: 243.27 g/mol

R_f = 0.35 (Hexan:Ethylacetat 1:1); **¹H-NMR** (250 MHz,) δ = 9.81 (br. s, 1H, NH), 8.50-8.48 (m, 2H, ^{Pym}C^{4,6}-H), 8.38 (s, 1H, ^{Ar}C³-H), 7.99 (d, *J* = 8.2 Hz, ^{Ar}C⁶-H), 7.51 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, ^{Ar}C⁴-H), 7.40 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, ^{Ar}C⁵-H), 6.87 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, ^{Pym}C⁵-H); **HPLC** (10-90 % in 30 min) *R_t* = 19.1 min; **ESI-MS** *m/z* 244.1 [M+H]⁺.

N-(Pyrimidin-2-yl)-3-aminobenzoesäureethylester (1.07 g, 5.0 mmol) wurde in einem 1:1 Gemisch Dioxan:H₂O (16 mL) und 1N HCl (18 mL) suspendiert und mit 5 % Pd/C (0.15 g) versetzt. Anschliessend wurde die Suspension 18 h unter Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck heftig gerührt. Der Katalysator wurde durch Filtration über Celite abgetrennt und mit H₂O gewaschen. Einengen des Filtrats in Vakuum, Zugabe von H₂O (10 mL) und Ausfällen mit 10N NaOH ergab **63** (1.09 g, 99 %) als farblosen Feststoff.

C₁₁H₁₃N₃O₂: 219.24 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.22 (s, 1H, COOH), 10.01 (s, 1H, NH-^{Ar}C), 8.41 (s, 2H, ^{Thpym}N₂H₂), 7.81 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-H), 7.74 (s, 1H, ^{Ar}C²-H), 7.55 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, ^{Ar}C⁵-H), 7.46 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-H), 3.30 (s, 4H, ^{Thpym}C^{4,6}-H₂), 1.89 (qn, *J* = 5.5 Hz, 2H, ^{Thpym}C⁵-H₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) *R_t* = 7.3 min; **ESI-MS** *m/z* 220.2 [M+H]⁺.

5-(Iminophenylmethyl)-aminobenzoessäure modifiziert (66) nach Shilcrat *et al.*^[373]

Eine Lösung aus Benzimidssäuremethylester Hydrochlorid (1.03 g, 6.0 mmol) in trockenem DMF (5 mL) wurden bei 0 °C unter Argon mit Triethylamin (835 µL, 6.0 mmol) versetzt und anschließend 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Entstandenes Triethylamin Hydrochlorid wurde unter Argon abfiltriert und das Filtrat in einem sauberen Rundkolben unter Argon mit 3-Aminobenzoessäure (588 mg, 4.3 mmol) und Triethylamin (199 µL, 1.4 mmol) bei 60 °C in 16 h umgesetzt. Abfiltrieren des Niederschlags, waschen mit DMF und Trocknen im Hochvakuum ergab **66** (1.02 g, 99 %) als weißen Feststoff.

$C_{14}H_{12}N_2O_2$: 240.26 g/mol

1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.94-7.93 (m, 4H, $^{Bmi}C^{2,6}$ -H, $^{Bmi}N_2H_2$), 7.56 (d, J = 7.6 Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.48-7.36 (m, 5H, $^{Bmi}C^{3-5}$ -H, $^{Ar}C^{2,5}$ -H), 7.07 (d, J = 7.6 Hz, 1H, $^{Ar}C^4$ -H); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 8.9 min; ESI-MS m/z 241.2 $[M+H]^+$.

5-(Iminophenylmethyl)-aminopentansäure modifiziert (67) nach Shilcrat *et al.*^[373]

Eine Lösung aus Benzimidssäuremethylester Hydrochlorid (1.03 g, 6.0 mmol) in trockenem DMF (5 mL) wurden bei 0 °C unter Argon mit Triethylamin (835 µL, 6.0 mmol) versetzt und anschließend 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Entstandenes Triethylamin Hydrochlorid wurde unter Argon abfiltriert und das Filtrat in einem sauberen Rundkolben unter Argon mit δ -Aminovaleriansäure (703 mg, 6.0 mmol) und Triethylamin (1.7 mL, 12 mmol) bei 60 °C in 16 h umgesetzt. Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, Lösen in H₂O (5 mL), Ausfällen mit 1N HCl und Trocknen des Niederschlags im Hochvakuum ergab **67** (0.63 g, 48 %) als weißen Feststoff.

$C_{12}H_{16}N_2O_2$: 220.27 g/mol

1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6) δ = 7.77 (d, J = 6.6 Hz, 2H, $^{Bmi}C^{2,6}$ -H), 7.60-7.51 (m, 3H, $^{Bmi}C^{3-5}$ -H), 3.30 (s, 2H, NH- CH_2), 2.04 (s, 2H, CH_2 -COOH), 1.66-1.57 (m, 4H, CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 8.9 min; ESI-MS m/z 969.2 $[4M-3H+4Na]^+$, 749.2 $[3M-3H+3Na]^+$, 743.2 $[3M-2H+2Na+K]^+$, 727.1 $[3M-$

$2\text{H}+3\text{Na}]^+$, 507.2 $[2\text{M}-2\text{H}+3\text{Na}]^+$, 501.3 $[2\text{M}-\text{H}+\text{Na}+\text{K}]^+$, 485.2 $[2\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$, 463.1 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 441.0 $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 265.2 $[\text{M}-\text{H}+2\text{Na}]^+$, 243.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 221.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3-[(3,4-Dihydro-2H-pyrrol-5-yl)-amino]-benzoesäure (74)

Zu 2-Pyrrolidinon (8.50 g, 99.9 mmol) wurde Dimethylsulfat (18.9 g, 150 mmol) zugetropft und 13 h bei 80°C erhitzt. Die braune Lösung wurde in eiskalte, gesättigte K_2CO_3 -Lösung (100 mL) gegeben, wobei sich ein brauner Niederschlag gebildet hat, der sich nach Zugabe von etwas H_2O wieder ausflöste. Anschließend wurde mit einem 1:1 Gemisch Et_2O :Pentan (3 x 100 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit H_2O und gesättigter, wässriger NaCl -Lösung (je 1 x 50 mL) gewaschen und über K_2CO_3 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt ($T \leq 20^\circ\text{C}$). Hierbei stieg die Wasserbadtemperatur kurzzeitig auf 40 °C, wodurch ein Teil des Produktes verloren ging. Reinigung durch Destillation im Wasserstrahlvakuum ergab 2-Methoxypyrrolidin **72** (3.09 g, 31 %) als farblose Flüssigkeit.

$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}$: 100.14 g/mol

Sdp. 33-35 °C (Wasserstrahlvakuum); **$^1\text{H-NMR}$** (250 MHz, CDCl_3) $\delta = 3.80$ (s, 3H, OCH_3), 3.66 (t, $J = 6:8$ Hz, 2H, $^{\text{Dhpyr}}\text{C}^2\text{-H}_2$), 2.44 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, $^{\text{Dhpyr}}\text{C}^4\text{-H}_2$), 2.03 (qn, $J = 6:9$ Hz, 2H, $^{\text{Dhpyr}}\text{C}^3\text{-H}_2$); **$^{13}\text{C-NMR}$** (62.5 MHz, CDCl_3): $\delta = 172.9, 54.4, 54.3, 30.0, 22.7$.

2-Methoxypyrrolidin (**72**, 1.00 g, 10.0 mmol) und 3-Aminobenzoesäure Hydrochlorid (1.74 g, 10.0 mmol) wurden in trockenem Methanol (8 mL) gelöst und unter Argon 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethanol (5 mL) aufgenommen. In der Kälte kristallisierte ein weißer Feststoff aus, der abfiltriert, mit wenig Et_2O gewaschen und im Vakuum getrocknet wurde. Ohne weitere Reinigung erhielt man **74** (1.93 g, 95 %) als weißen Feststoff.

$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$: 204.23 g/mol

R_f = 0.18 (MeOH; 3-Aminobenzoesäure: 0.62); **$^1\text{H-NMR}$** (250 MHz, D_2O) $\delta = 12.05$ (br. s, 1H, COOH), 7.96-7.89 (m, 2H, $^{\text{Ar}}\text{C}^{2,6}\text{-H}$), 7.68-7.62 (m, 2H, $^{\text{Ar}}\text{C}^{3,5}\text{-H}$), 3.64 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, $^{\text{Dhpyr}}\text{C}^2\text{-H}_2$), 3.06 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, $^{\text{Dhpyr}}\text{C}^4\text{-H}_2$), 2.21-2.09 (m, 2H, $^{\text{Dhpyr}}\text{C}^3\text{-H}_2$); **HPLC** (10-60 % in 30 min) $R_t = 7.3$ min; **ESI-MS** m/z 816.8

$[4M+H]^+$, 635.0 $[3M+Na]^+$, 612.7 $[3M+H]^+$, 431.3 $[2M+Na]^+$, 408.8 $[2M+H]^+$, 227.1 $[M+Na]^+$, 205.2 $[M+H]^+$.

3-[N-(2,3,4,5-Tetrahydropyridin-6-yl)-amino]-benzoesäure Hydrochlorid (78)

δ -Valerolactam (3.84 g, 38.7 mmol) und Trimethyloxoniumtetrafluoroborat (5.76 g, 38.9 mmol) wurden in trockenem CH_2Cl_2 (50 mL) gelöst und 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von CH_2Cl_2 (150 mL) wurde mit gesättigter, wässriger K_2CO_3 -Lösung, H_2O und gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (je 1 x 50 mL) gewaschen, über K_2CO_3 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Reinigung durch Destillation im Wasserstrahlvakuum ergab **77** (3.59 g, 82 %) als farblose Flüssigkeit.

$C_6H_{11}NO$: 113.16 g/mol

Sdp. 59 °C (Wasserstrahlvakuum); **1H -NMR** (250 MHz, $CDCl_3$) δ = 3.11 (s, 3H, OCH_3), 2.99 (t, J = 5.7 Hz, 2H, $^{Thpy}C^2-H_2$), 1.66 (t, J = 6.7 Hz, 2H, $^{Thpy}C^5-H_2$), 1.30-1.20 (m, 2H, $^{Thpy}C^3-H_2$), 1.12-1.03 (m, 2H, $^{Thpy}C^4-H_2$); **^{13}C -NMR** (62.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 161.8, 50.7, 45.9, 24.9, 21.7, 19.6.

77 (1.70 g, 15.0 mmol) wurde mit 3-Aminobenzoesäure Hydrochlorid (2.46 g, 14.2 mmol) in Acetonitril (20 mL) unter Erwärmen gelöst. Die Lösung wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das ausgefallene, farblose Salz wird abfiltriert, mit Acetonitril gewaschen, im Vakuum getrocknet und ergab **78** (2.59 g, 72 %) als farblosen Feststoff.

$C_{12}H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$: 218.25*36.46 g/mol

R_f = 0.29 (MeOH; 3-Aminobenzoesäure: 0.62); **1H -NMR** (250 MHz, D_2O) δ = 7.75 (d, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Ar}C^6-H$), 7.59 (s, 2H, $^{Ar}C^2-H$), 7.45 (t, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Ar}C^5-H$), 7.28 (d, J = 8.6 Hz, 1H, $^{Ar}C^4-H$), 3.22 (s, 2H, $^{Thpy}C^2-H_2$), 2.67 (s, 2H, $^{Thpy}C^5-H_2$), 1.75 (s, 4H, $^{Thpy}C^{3,4}-H_2$); **HPLC** (10-60 % in 30 min) R_t = 8.2 min; **ESI-MS** m/z 241.1 $[M+Na]^+$, 219.2 $[M+H]^+$.

5-(6-Chlorpyridazin-3-ylamino)-pentansäure (82)

Eine Mischung aus 3,6-Dichlorpyridazin (1.00 g, 6.71 mmol), 5-Aminopentansäure (944 mg, 8.06 mmol, 1.2 Äq.) und K_2CO_3 (557 mg, 4.03 mmol, 0.6 Äq.) wurde in *n*-Butanol (5 mL) innerhalb von 20 h bei 100 °C umgesetzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und zwischen H_2O und Ethylacetat (je 50 mL) verteilt. Durch Ansäuern der wässrigen Phase mit 2N HCl (ca. 1.5 mL, pH 4.5) konnte die Säure ausgefällt werden. Abnutschen und Trocknen im Vakuum ergaben **82** (690 mg, 45 %) als braunen Feststoff.

$C_9H_{12}ClN_3O_2$: 229.66 g/mol

1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.45 (br. s, 1H, [^{Py}aNH] $^+$), 7.56 (d, J = 9.5 Hz, 1H, $^{Py}aC^5-H$), 7.25 (d, J = 9.5 Hz, 1H, $^{Py}aC^4-H$), 4.53 (br. s, 1H, NH), 3.32 (s, 2H, NH- CH_2), 2.24 (s, 2H, CH_2-CH_2-CO), 1.59-1.56 (m, 4H, $CH_2-CH_2-CH_2-CH_2$); HPLC (5-60 % in 30 min) R_t = 9.3 min; ESI-MS m/z 230.2 [$M+H$] $^+$.

5-(Pyridazin-3-ylamino)-pentansäure (83)

5-(6-Chlorpyridazin-3-ylamino)-pentansäure (**82**, 459 mg, 2.00 mmol) wurden in MeOH (8 mL) und nach Zugabe von 20 % $Pd(OH)_2/C$ (50 mg) unter H_2 -Atmosphäre 2 h gerührt. Der Katalysator wurde über Kieselgur abfiltriert und Einengen des Filtrates bis zur Trockene ergab **83** (246, 63 %) als weißen Feststoff.

$C_9H_{13}N_3O_2$: 195.22 g/mol

1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6) δ = 8.45 (br. s, 1H, [^{Py}aNH] $^+$), 7.55-7.52 (m, 1H, $^{Py}aC^6-H$), 7.25-7.21 (m, 1H, $^{Py}aC^5-H$), 5.74 (s, 1H, $^{Py}aC^4-H$), 4.57 (br. s, 1H, NH), 3.31-3.29 (m, 2H, NH- CH_2), 2.26 (s, 2H, CH_2-CH_2-CO), 1.57-1.54 (m, 4H, $CH_2-CH_2-CH_2-CH_2$); HPLC (5-60 % in 30 min) R_t = 7.3 min; ESI-MS m/z 196.2 [$M+H$] $^+$.

4-Fluorchinazolin (88)

Eine Suspension aus 4-Hydroxychinazolin (50 g, 0.32 mol), PCl_5 (70.5 g, 0.34 mol) in Phosphoroxychlorid (130 mL, 0.14 mmol) wurden 2 h unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abdestillieren von Phosphoroxychlorid wurde der Rückstand in CH_2Cl_2 (500 mL) gelöst, mit Eiswasser (300 mL) gewaschen und schließlich wieder bis zur

Trockene eingengt. Nach dem Umkristallisieren in Hexyn erhält man 4-Chlorchinazolin (**87**, 24.5 g, 47 %) als leicht gelben Feststoff.

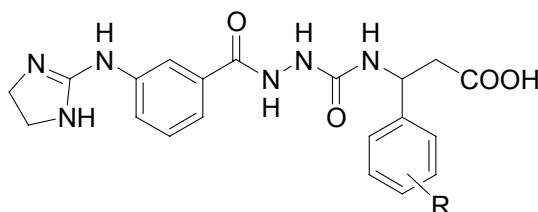
$C_8H_5ClN_2$: 164.59 g/mol

1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6) δ = 9.07 (s, 1H, $^{Ch}C^2$ -H), 8.18-8.15 (m, 1H, $^{Ch}C^8$ -H), 8.00-7.89 (m, 2H, $^{Ch}C^{5,6}$ -H), 7.71-7.64 (m, 1H, $^{Ch}C^7$ -H); ^{13}C -NMR (62.5 MHz, DMSO- d_6) δ = 159.54, 148.61, 140.71, 135.99, 128.79, 126.89, 121.87, 121.52; **EI-MS** m/z 164.0 $[M]^+$.

Eine Mischung aus **87** (2 g, 12.15 mmol) und trockenem KF (12 g, 206.5 mmol) wurden unter Ausschluß von Feuchtigkeit 8 h bei 250 °C erhitzt. Dabei schieden sich sowohl gelbes 4-Chlorchinazolin als auch farblose Nadeln von 4-Fluorchinazolin am Rückflusskühler ab (Achtung: Rückflusskühler geht nur noch sehr schwer ab!). Die farblosen Kristalle wurden vom Rückflusskühler abgekratzt und ohne weitere Reinigung in nachfolgenden Reaktionen eingesetzt.

$C_8H_5FN_2$: 148.14 g/mol

9.5.2 RGD-Mimetika



3-(*N*-{*N'*-[3-(4,5-Dihydro-1*H*-imidazol-2-yl)-aminobenzoyl]-hydrazino}-carbonyl)-amino-3-phenylpropionsäure (**58a**)

Mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-phenylpropionsäure (**50**) belegtes TCP-Harz (75 mg, 0.61 mmol/g, 46 μ mol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (**35**), 29, 9a, HPLC-Reinigung (B, 15-45 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **58a** (5 mg, 21 %) als weißen Feststoff.

$C_{20}H_{22}N_6O_4 \cdot TFA$: 410.43*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.25 (br. s, 1H, COOH), 10.54 (br. s, 1H, NH- ^{Ar}C), 10.18 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.39 (br. s, 2H, $^{Dhim}N_2H_2$), 8.10 (s, 1H, NH-

NH-CO-NH), 7.75 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.70 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.53 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, $^{Ar}C^5$ -H), 7.40 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, $^{Ar}C^4$ -H), 7.34-7.29 (m, 4H, $^{Phe}C^{2,3,5,6}$ -H), 7.22 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, $^{Phe}C^4$ -H), 7.06 (br. s, 1H, NH-CH), 5.09-5.05 (m, 1H, NH-CH), 3.66 (s, 4H, $^{Dhim}C^{4,5}$ -H₂), 2.75-2.66 (m, 2H, NH-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 9.8$ min; **ESI-MS** m/z 821.1 [2M+H]⁺, 411.2 [M+H]⁺.

3-{N-[N'-(3-(4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-yl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure (58b)

Mit 3-(N-Fmoc)-Amino-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure (**51**) belegtes TCP-Harz (0.1 g, 0.44 mmol/g, 44 μ mol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (**35**), 29, 9a, HPLC-Reinigung (B, 30-50 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **58b** (12 mg, 49 %) als weißen Feststoff.

$C_{20}H_{21}ClN_6O_4 \cdot TFA$: 444.87*114.02 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) $\delta = 12.29$ (br. s, 1H, COOH), 10.55 (br. s, 1H, NH- ^{Ar}C), 10.17 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.40 (br s, 2H, $^{Dhim}N_2H_2$), 8.14 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.76 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.69 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.54 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, $^{Ar}C^5$ -H), 7.41 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, $^{Ar}C^4$ -H), 7.38-7.34 (m, 4H, $^{Phe}C^{2,3,5,6}$ -H), 7.05 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, NH-CH), 5.08-5.03 (m, 1H, NH-CH), 3.67 (s, 4H, $^{Dhim}C^{4,5}$ -H₂), 2.77-2.67 (m, 2H, NH-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 12.5$ min; **ESI-MS** m/z 889.0 [2M^{35Cl}+H]⁺, 447.2 [M^{37Cl}+H]⁺, 445.2 [M^{35Cl}+H]⁺.

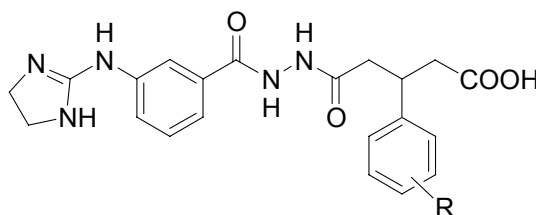
3-(N-{N'-[3-(4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-yl)-aminobenzoyl]-hydrazino}-carbonyl)-amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäure (58c)

Mit 3-(N-Fmoc)-Amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäure **52** belegtes TCP-Harz (0.1 g, 0.63 mmol/g, 63 μ mol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (**35**), 29, 9a, HPLC-Reinigung (B, 32-54 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **58c** (8 mg, 21 %) als weißen Feststoff.

$C_{20}H_{20}Cl_2N_6O_4 \cdot TFA$: 479.32*114.02 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) $\delta = 12.28$ (br. s, 1H, COOH), 10.59 (br. s, 1H, NH- ^{Ar}C), 10.20 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.46 (s, 2H, $^{Dhim}N_2H_2$), 8.25 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.75 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.70 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.54 (t, $J = 7.7$ Hz,

1H, ^{Ar}C⁵-H), 7.45 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-H), 7.41-7.39 (m, 3H, ^{Phe}C^{2,4,6}-H), 7.20 (br. s, 1H, NH-CH), 5.05-5.02 (m, 1H, NH-CH), 3.66 (s, 4H, ^{Dhim}C^{4,5}-H₂), 2.78-2.70 (m, 2H, NH-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 14.3 min; **ESI-MS** *m/z* 997.0 [M^{35Cl}+M^{35Cl+37Cl}+K]⁺, 980.9 [M^{35Cl}+M^{35Cl+37Cl}+Na]⁺, 960.9 [M^{35Cl}+M^{37Cl}+H]⁺, 958.9 [M^{35Cl}+M^{35Cl+37Cl}+H]⁺, 956.9 [2M^{35Cl}+H]⁺, 517.1 [M^{35Cl}+K]⁺, 501.2 [M^{35Cl}+Na]⁺, 481.2 [M^{35Cl+37Cl}+H]⁺, 479.2 [M^{35Cl}+H]⁺.



5-{N'-[3-(4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-yl)-aminobenzoyl]-hydrazino}-5-oxo-3-(4-chlorophenyl)-pentansäure (58d)

Mit 5-(N'-Fmoc-hydrazino)-5-oxo-3-(4-chlorophenyl)-pentansäure (**53**) belegtes TCP-Harz (0.2 g, 0.47 mmol/g, 94 μmol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (**35**), 29, 9a, HPLC-Reinigung (B, 30-50 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von xx (23 mg, 44 %) als weißen Feststoff.

C₂₁H₂₂ClN₅O₄*TFA: 443.88*114.02 g/mol

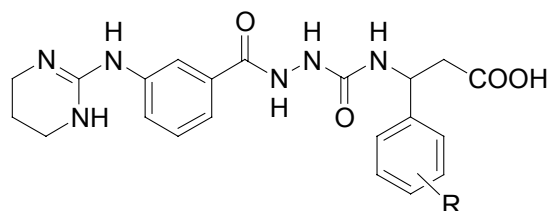
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.08 (br. s, 1H, COOH), 10.58 (s, 1H, NH-^{Ar}C), 10.30 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.95 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 8.43 (s, 2H, ^{Dhim}N₂H₂), 7.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-H), 7.69 (s, 1H, ^{Ar}C²-H), 7.54 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, ^{Ar}C⁵-H), 7.42 (dd, *J* = 1.8/8.0 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-H), 7.33 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 7.29 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 3.67 (s, 4H, ^{Dhim}C^{4,5}-H₂), 3.53-3.47 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 2.76 (dd, *J* = 5.6/16.3 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.57-2.51 (m, 3H, HCH-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 12.1 min; **ESI-MS** *m/z* 889.0 [M^{35Cl}+M^{37Cl}+H]⁺, 887.0 [2M^{35Cl}+H]⁺, 595.9 [M^{35Cl}+TFA+K]⁺, 580.0 [M^{35Cl}+TFA+Na]⁺, 482.2 [M^{35Cl}+K]⁺, 446.3 [M^{37Cl}+H]⁺, 444.3 [M^{35Cl}+H]⁺.

5-{*N'*-[3-(4,5-Dihydro-1*H*-imidazol-2-yl)-aminobenzoyl]-hydrazino}-5-oxo-3-(3,5-dichlorphenyl)-pentansäure (58e)

Mit 5-(*N'*-Fmoc-hydrazino)-5-oxo-3-(3,5-dichlorphenyl)-pentansäure (**54**) belegtes TCP-Harz (0.2 g, 0.48 mmol/g, 95 μ mol) ergab nach AAV 5, 24 (**35**), 29, 9a, HPLC-Reinigung (B, 35-50 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **58e** (24 mg, 41 %) als weißen Feststoff.

$C_{21}H_{21}Cl_2N_5O_4 \cdot TFA$: 478.33*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.16 (br. s, 1H, COOH), 10.55 (s, 1H, NH- ^{Ar}C), 10.30 (s, 1H, NH-NH-CO-CH $_2$), 9.96 (s, 1H, NH-NH-CO-CH $_2$), 8.40 (s, 2H, $^{Dhim}N_2H_2$), 7.74 (d, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.68 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.54 (t, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^5$ -H), 7.43-7.41 (m, 2H, $^{Phe}C^4$ -H, $^{Ar}C^4$ -H), 7.35 (d, J = 7.8 Hz, 2H, $^{Phe}C^{2,6}$ -H), 3.66 (s, 4H, $^{Dhim}C^{4,5}$ -H $_2$), 3.53-3.47 (m, 1H, CH $_2$ -CH-CH $_2$), 2.77 (dd, J = 5.5/16.3 Hz, 1H, HCH-CH-CH $_2$), 2.63 (dd, J = 9.4/16.3 Hz, 1H, HCH-CH-CH $_2$), 2.58 (d, J = 7.6 Hz, 2H, HCH-CH-CH $_2$); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 13.9 min; ESI-MS m/z 1434.0 [$2M^{35Cl}+M^{35Cl+37Cl}+H$] $^+$, 959.0 [$M^{35Cl}+M^{37Cl}+H$] $^+$, 957.0 [$M^{35Cl}+M^{35Cl+37Cl}+H$] $^+$, 955.0 [$2M^{35Cl}+H$] $^+$, 482.3 [$M^{37Cl}+H$] $^+$, 480.2 [$M^{35Cl+37Cl}+H$] $^+$, 478.3 [$M^{35Cl}+H$] $^+$.



3-{*N*-[*N'*-(3-(1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-2-yl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-phenylpropionsäure (64a)

Mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-phenylpropionsäure (**50**) belegtes TCP-Harz (0.1 g, 0.62 mmol/g, 62 μ mol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (**63**), 8a, HPLC-Reinigung (C, 10-32 % in 22 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **64a** (10 mg, 30 %) als weißen Feststoff.

$C_{21}H_{24}N_6O_4 \cdot TFA$: 424.45*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.24 (br. s, 1H, COOH), 10.17 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.62 (s, 1H, NH- ^{Ar}C), 8.17 (s, 2H, $^{Thpym}N_2H_2$), 8.09 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.73 (d, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.66 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.51 (t, J = 8.0 Hz, 1H,

^{Ar}C⁵-H), 7.37 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-H), 7.34-7.29 (m, 4H, ^{Phe}C^{2,3,5,6}-H), 7.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, ^{Phe}C⁴-H), 7.00 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, NH-CH), 5.10-5.05 (m, 1H, NH-CH), 3.28 (s, 4H, ^{Thpym}C^{4,6}-H₂), 2.76-2.67 (m, 2H, NH-CH-CH₂), 1.87 (qn, *J* = 5.7 Hz, 2H, ^{Thpym}C⁵-H₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 10.4 min; **ESI-MS** *m/z* 425.2 [M+H]⁺.

3-{*N*-[*N'*-(3-(1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-2-yl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure (64b)

Mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure **51** belegtes TCP-Harz (0.1 g, 0.44 mmol/g, 44 μmol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (**63**), 8a, HPLC-Reinigung (B, 30-50 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **64b** (19 mg, 33 %) als weißen Feststoff.

C₂₁H₂₃ClN₆O₄*TFA: 458.90*114.02 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.28 (br. s, 1H, COOH), 10.17 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.69 (s, 1H, NH-^{Ar}C), 8.21 (s, 2H, ^{Thpym}N₂H₂), 8.14 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.72 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-H), 7.66 (s, 1H, ^{Ar}C²-H), 7.51 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, ^{Ar}C⁵-H), 7.37-7.34 (m, 5H, ^{Ar}C⁴-H, ^{Phe}C^{2,3,5,6}-H), 7.05 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, NH-CH), NH-CH), 5.08-5.03 (m, 1H, NH-CH), 3.28 (s, 4H, ^{Thpym}C^{4,6}-H₂), 2.77-2.67 (m, 2H, NH-CH-CH₂), 1.87 (qn, *J* = 5.8 Hz, 2H, ^{Thpym}C⁵-H₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 12.9 min; **ESI-MS** *m/z* 957.1 [2M³⁷Cl+K]⁺, 955.1 [2M³⁵Cl+K]⁺, 941.0 [2M³⁷Cl+Na]⁺, 939.0 [2M³⁵Cl+Na]⁺, 919.0 [2M³⁷Cl+H]⁺, 917.0 [2M³⁵Cl+H]⁺, 497.1 [M³⁵Cl+K]⁺, 481.1 [M³⁵Cl+Na]⁺, 461.2 [M³⁷Cl+H]⁺, 459.2 [M³⁵Cl+H]⁺.

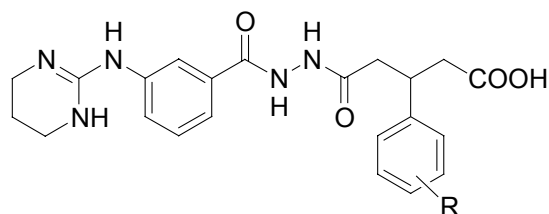
3-{*N*-[*N'*-(3-(1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-2-yl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäure (64c)

Mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäure (**52**) belegtes TCP-Harz (0.1 g, 0.63 mmol/g, 63 μmol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (**63**), 9a, HPLC-Reinigung (B, 30-54 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von xx (16 mg, 26 %) als weißen Feststoff.

C₂₁H₂₂Cl₂N₆O₄*TFA: 493.34*114.02 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.37 (br. s, 1H, COOH), 10.19 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.66 (s, 1H, NH-^{Ar}C), 8.24 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.20 (s, 2H,

$^{Thpym}N_2H_2$), 7.73 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, $^{Ar}C^6-H$), 7.67 (s, 1H, $^{Ar}C^2-H$), 7.51 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, $^{Ar}C^5-H$), 7.46 (s, 1H, $^{Phe}C^4-H$), 7.40 (s, 2H, $^{Phe}C^{2,6}-H$), 7.37 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, $^{Ar}C^4-H$), 7.12 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, NH-CH), 5.06-5.02 (m, 1H, NH-CH), 3.28 (s, 4H, $^{Thpym}C^{4,6}-H_2$), 2.81-2.71 (m, 2H, NH-CH-CH₂), 1.87 (qn, $J = 5.8$ Hz, 2H, $^{Thpym}C^5-H_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 14.7$ min; **ESI-MS** m/z 1478.8 $[2M^{35Cl}+M^{35Cl+37Cl}+H]^+$, 1025.0 $[M^{35Cl}+M^{35Cl+37Cl}+K]^+$, 1009.0 $[M^{35Cl}+M^{35Cl+37Cl}+Na]^+$, 988.9 $[M^{35Cl}+M^{37Cl}+H]^+$, 987.0 $[M^{35Cl}+M^{35Cl+37Cl}+H]^+$, 985.0 $[2M^{35Cl}+H]^+$, 531.2 $[M^{35Cl}+K]^+$, 515.2 $[M^{35Cl}+Na]^+$, 497.2 $[M^{37Cl}+H]^+$, 495.2 $[M^{35Cl+37Cl}+H]^+$, 493.2 $[M^{35Cl}+H]^+$.



5-[N'-(3-(1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-2-yl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(4-chlorophenyl)-pentansäure (64d)

Mit 5-(N'-Fmoc-hydrazino)-5-oxo-3-(4-chlorophenyl)-pentansäure (**53**) belegtes TCP-Harz (0.2 g, 0.48 mmol/g, 94 μ mol) ergab nach AAV 3, 24 (**63**), 9a, HPLC-Reinigung (B, 20-50 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **64d** (28 mg, 52 %) als weißen Feststoff.

$C_{22}H_{24}ClN_5O_4 \cdot TFA$: 457.91*114.02 g/mol

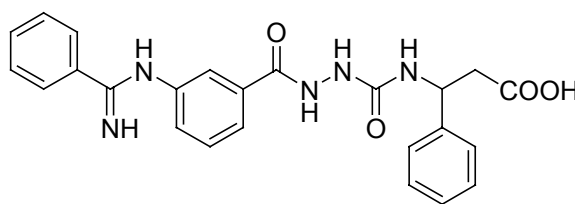
1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 12.08$ (br. s, 1H, COOH), 10.28 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.93 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.53 (s, 1H, NH- ^{Ar}C), 8.14 (s, 2H, $^{Thpym}N_2H_2$), 7.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, $^{Ar}C^6-H$), 7.65 (s, 1H, $^{Ar}C^2-H$), 7.51 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, $^{Ar}C^5-H$), 7.38 (dd, $J = 1.3/8.0$ Hz, 1H, $^{Ar}C^4-H$), 7.33 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, $^{Phe}C^{3,5}-H$), 7.29 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, $^{Phe}C^{2,6}-H$), 3.53-3.47 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.28 (s, 4H, $^{Thpym}C^{4,6}-H_2$), 2.76 (dd, $J = 5.5/16.0$ Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.57-2.51 (m, 3H, HCH-CH-CH₂), 1.89 (qn, $J = 5.5$ Hz, 2H, $^{Thpym}C^5-H_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 12.5$ min; **ESI-MS** m/z 1374.0 $[2M^{35Cl}+M^{37Cl}+H]^+$, 1372.0 $[3M^{35Cl}+H]^+$, 917.0 $[M^{35Cl}+M^{37Cl}+H]^+$, 915.0 $[2M^{35Cl}+H]^+$, 460.3 $[M^{37Cl}+H]^+$, 458.3 $[M^{35Cl}+H]^+$.

5-[N'-(3-(1,4,5,6-Tetrahydropyrimidin-2-yl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(3,5-dichlorophenyl)-pentansäure (64e)

Mit 5-(N'-Fmoc-hydrazino)-5-oxo-3-(3,5-dichlorophenyl)-pentansäure (**54**) belegtes TCP-Harz (0.5 g, 0.48 mmol/g, 238 μ mol) ergab nach AAV 3, 24 (**63**), 9a, HPLC-Reinigung (B, 35-50 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **64e** (89 mg, 62 %) als weißen Feststoff.

$C_{22}H_{23}Cl_2N_5O_4 \cdot TFA$: 492.35*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.17 (br. s, 1H, COOH), 10.29 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.94 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.63 (s, 1H, NH-ArC), 8.20 (s, 2H, ThpymN₂H₂), 7.70 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArC⁶-H), 7.65 (s, 1H, ArC²-H), 7.51 (t, J = 7.7 Hz, 1H, ArC⁵-H), 7.42 (t, J = 2.0 Hz, 1H, PheC⁴-H), 7.38 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArC⁴-H), 7.35 (d, J = 2.0 Hz, 2H, PheC^{2,6}-H), 3.53-3.47 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.29 (s, 4H, ThpymC^{4,6}-H₂), 2.77 (dd, J = 5.7/16.3 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.63 (dd, J = 9.5/16.3 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.58 (d, J = 7.8 Hz, 2H, HCH-CH-CH₂), 1.87 (qn, J = 5.7 Hz, 2H, ThpymC⁵-H₂); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 14.3 min; ESI-MS m/z 1477.9 [2M^{35Cl}+M^{37Cl}+H]⁺, 1476.0 [2M^{35Cl}+M^{35Cl+37Cl}+H]⁺ H]⁺, 988.0 [M^{37Cl}+H]⁺, 986.9 [M^{35Cl}+M^{37Cl}+H]⁺, 985.0 [M^{35Cl}+M^{35Cl+37Cl}+H]⁺, 983.0 [2M^{35Cl}+H]⁺, 496.2 [M^{37Cl}+H]⁺, 494.2 [M^{35Cl+37Cl}+H]⁺, 492.3 [M^{35Cl}+H]⁺.



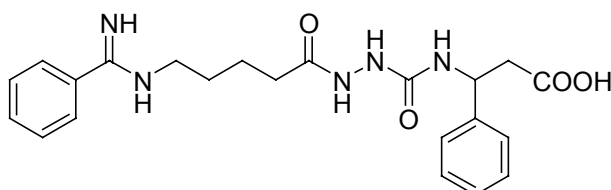
3-{N-[N'-(3-(Iminophenylmethyl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-phenylpropionsäure (68a)

Mit 3-(N-Fmoc)-Amino-3-phenylpropionsäure (**50**) belegtes TCP-Harz (0.1 g, 0.62 mmol/g, 62 μ mol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (**66**), 8a, HPLC-Reinigung (C, 25-34 % in 13 min) und Lyophilisieren **68a** (15 mg, 54 %) als weißen Feststoff.

$C_{24}H_{23}N_5O_4$: 445.47 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.25 (br. s, 1H, COOH), 11.51 (s, 1H, BmiNH), 10.27 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.87 (s, 1H, BmiNH), 8.15 (s, 1H, NH-NH-

CO-NH), 7.96-7.90 (m, 4H, ^{Ar}C^{2,4,5,6}-H), 7.79 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, ^{Bmi}C⁴-H), 7.69-7.63 (m, 4H, ^{Bmi}C^{2,3,5,6}-H), 7.35-7.29 (m, 4H, ^{Phe}C^{2,3,5,6}-H), 7.22 (tt, $J = 1.5/7.0$ Hz, 1H, ^{Phe}C⁴-H), 7.03 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, NH-CH), 5.11-5.06 (m, 1H, NH-CH), 2.78-2.68 (m, 2H, NH-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 11.4$ min; **ESI-MS** m/z 929.1 [2M+K]⁺, 891.0 [2M+H]⁺, 484.1 [M+K]⁺, 446.1 [M+H]⁺.

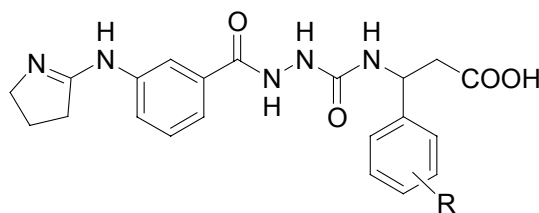


3-{N-[N'-(5-(Iminophenylmethyl)-aminopentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-phenylpropionsäure (**68b**)

Mit 3-(N-Fmoc)-Amino-3-phenylpropionsäure (**50**) belegtes TCP-Harz (0.1 g, 0.62 mmol/g, 62 μ mol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (**67**, 4 Äq.), 8a, HPLC-Reinigung (C, 15-35 % in 30 min) und Lyophilisieren **68b** (6 mg, 23 %) als weißen Feststoff.

C₂₂H₂₇N₅O₄: 425.48 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) $\delta = 12.23$ (br. s, 1H, COOH), 9.68 (s, 1H, ^{Bmi}NH), 9.48 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.38 (s, 1H, ^{Bmi}NH), 7.84 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.72-7.69 (m, 3H, ^{Bmi}C^{2,4,6}-H), 7.60 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, ^{Bmi}C^{3,5}-H), ^{Ar}C⁶-H), 7.31-7.27 (m, 4H, ^{Phe}C^{2,3,5,6}-H), 7.22-7.19 (m, 1H, ^{Phe}C⁴-H), 6.85 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NH-CH), 5.05-5.01 (m, 1H, NH-CH), 3.38-3.35 (m, 2H, NH-CH₂), 2.74-2.65 (m, 2H, NH-CH-CH₂), 2.14 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.67-1.57 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 10.9$ min; **ESI-MS** m/z 889.0 [2M+K]⁺, 873.0 [2M+Na]⁺, 850.9 [2M+H]⁺, 464.1 [M+K]⁺, 448.1 [M+Na]⁺, 426.1 [M+H]⁺.



3-{N-[N'-(3-(3,4-Dihydro-2H-pyrrol-5-yl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-phenylpropionsäure (75a)

Mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-phenylpropionsäure (**50**) belegtes TCP-Harz (80 mg, 0.62 mmol/g, 50 μ mol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (**73**), 8a, HPLC-Reinigung (C, 20-40 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **75a** (8 mg, 15 %) als weißen Feststoff.

$C_{21}H_{23}N_5O_4 \cdot TFA$: 409.44 * 114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.22 (br. s, 1H, COOH), 11.34 (br. s, 1H, [$^{D_{hpyr}}NH$] $^+$), 10.21 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.93 (br. s, 1H, NH- ^{Ar}C), 8.11 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.82 (d, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.78 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.59 (t, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^5$ -H), 7.49 (d, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^4$ -H), 7.34-7.29 (m, 4H, $^{Phe}C^{2,3,5,6}$ -H), 7.22 (t, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Phe}C^4$ -H), 7.04 (d, J = 8.4 Hz, 1H, NH-CH), 5.10-5.05 (m, 1H, NH-CH), 3.63 (t, J = 7.1 Hz, 2H, $^{D_{hpyr}}C^2$ - H_2), 2.96 (t, J = 6.9 Hz, 2H, $^{D_{hpyr}}C^4$ - H_2), 2.77-2.67 (m, 2H, NH-CH- CH_2), 2.12 (qn, J = 7.3 Hz, 2H, $^{D_{hpyr}}C^3$ - H_2); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 10.0 min; ESI-MS m/z 448.1 [$M+K$] $^+$, 432.2 [$M+Na$] $^+$, 410.1 [$M+H$] $^+$, 219.1 [$M-C_{10}H_{10}NO_3+2H$] $^+$.

3-{N-[N'-(3-(3,4-Dihydro-2H-pyrrol-5-yl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure (75b)

Mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure (**51**) belegtes TCP-Harz (0.2 g, 0.44 mmol/g, 89 μ mol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (**73**), 9a HPLC-Reinigung (B, 30-50 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **75b** (7 mg, 14 %) als weißen Feststoff.

$C_{21}H_{22}ClN_5O_4 \cdot TFA$: 443.88 * 114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.22 (br. s, 1H, COOH), 11.39 (br. s, 1H, [$^{D_{hpyr}}NH$] $^+$), 10.20 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.89 (br. s, 1H, NH- ^{Ar}C), 8.15 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.82-7.78 (m, 2H, $^{Ar}C^6$ -H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.59 (t, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^5$ -H),

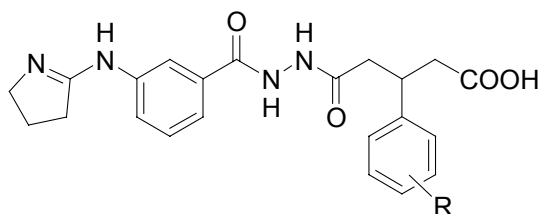
7.49 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, $^{Ar}C^4-H$), 7.38-7.34 (m, 4H, $^{Phe}C^{2,3,5,6}-H$), 7.09 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, NH-CH), 5.07-5.03 (m, 1H, NH-CH), 3.63 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, $^{Dhpyr}C^2-H_2$), 2.99-2.96 (m, 2H, $^{Dhpyr}C^4-H_2$), 2.77-2.67 (m, 2H, NH-CH-CH₂), 2.14-2.09 (m, 2H, $^{Dhpyr}C^3-H_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 12.5$ min; **ESI-MS** m/z 446.1 [$M^{37Cl}+H$]⁺, 444.2 [$M^{35Cl}+H$]⁺.

3-{*N*'-[*N*'-(3-(3,4-Dihydro-2H-pyrrol-5-yl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäure (75c)

Mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäure (**52**) belegtes TCP-Harz (0.1 g, 0.63 mmol/g, 63 μ mol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (**73**), 9a, HPLC-Reinigung (B, 32-54 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **75c** (12 mg, 32 %) als weißen Feststoff.

$C_{21}H_{21}Cl_2N_5O_4 \cdot TFA$: 478.3*114.02 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) $\delta = 12.37$ (br. s, 1H, COOH), 11.49 (br. s, 1H, [$^{Dhpyr}NH$]⁺), 10.24 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.91 (s, 1H, NH- ^{Ar}C), 8.29 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.86 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, $^{Ar}C^6-H$), 7.78 (s, 1H, $^{Ar}C^2-H$), 7.62 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, $^{Ar}C^5-H$), 7.49 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, $^{Ar}C^4-H$), 7.46 (s, 1H, $^{Phe}C^4-H$), 7.40 (s, 2H, $^{Phe}C^{2,6}-H$), 7.16 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH-CH), 5.07-5.02 (m, 1H, NH-CH), 3.63 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, $^{Dhpyr}C^2-H_2$), 3.02 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, $^{Dhpyr}C^4-H_2$), 2.81-2.71 (m, 2H, NH-CH-CH₂), 2.17-2.11 (qn, $J = 7.5$ Hz, 2H, $^{Dhpyr}C^3-H_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 14.5$ min; **ESI-MS** m/z 958.8 [$M^{35Cl}+M^{37Cl}+H$]⁺, 956.8 [$M^{35Cl}+M^{35Cl+37Cl}+H$]⁺, 954.8 [$2M^{35Cl}+H$]⁺, 480.1 [$M^{35Cl+37Cl}+H$]⁺, 478.1 [$M^{35Cl}+H$]⁺.



5-[*N*'-(3-(3,4-Dihydro-2H-pyrrol-5-yl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(4-chlorphenyl)-pentansäure (75d)

Mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure (**53**) belegtes TCP-Harz (0.2 g, 0.47 mmol/g, 94 μ mol) ergab nach AAV 3, 24 (**73**), 9a, HPLC-Reinigung (B,

30-50 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **75d** (10 mg, 18 %) als weißen Feststoff.

$C_{22}H_{23}ClN_4O_4 \cdot TFA$: 442.90*114.02 g/mol

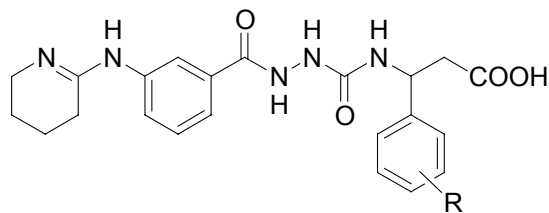
1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.08 (s, 1H, COOH), 11.44 (br. s, 1H, [$^{Dhpyr}NH$] $^+$), 10.33 (s, 1H, NH-NH-CO-CH $_2$), 9.97 (s, 1H, NH-NH-CO-CH $_2$), 9.90 (s, 1H, NH- ^{Ar}C), 7.84 (d, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.76 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.62 (t, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Ar}C^5$ -H), 7.48 (d, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Ar}C^4$ -H), 7.33 (d, J = 8.5 Hz, 2H, $^{Phe}C^{3,5}$ -H), 7.29 (d, J = 8.5 Hz, 2H, $^{Phe}C^{2,6}$ -H), 3.62 (t, J = 7.1 Hz, 2H, $^{Dhpyr}C^2$ -H $_2$), 3.53-3.47 (m, 1H, CH $_2$ -CH-CH $_2$), 3.01 (t, J = 7.6 Hz, 2H, $^{Dhpyr}C^4$ -H $_2$), 2.76 (dd, J = 5.5/16.3 Hz, 1H, HCH-CH-CH $_2$), 2.58-2.51 (m, 3H, HCH-CH-CH $_2$), 2.14 (qn, J = 7.3 Hz, 2H, $^{Dhpyr}C^3$ -H $_2$); **HPLC** (10-0 % in 30 min) R_t = 12.1 min; **ESI-MS** m/z 885.0 [$2M^{35Cl}+H$] $^+$, 445.2 [$M^{37Cl}+H$] $^+$, 443.3 [$M^{35Cl}+H$] $^+$.

5-[N' -(3-(3,4-Dihydro-2H-pyrrol-5-yl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(3,5-dichlorphenyl)-pentansäure (**75e**)

Mit 3-(N -Fmoc)-Amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäure (**54**) belegtes TCP-Harz (0.2 g, 0.48 mmol/g, 96 μ mol) ergab nach AAV 3, 24 (**73**), 9a, HPLC-Reinigung (C, 30-45 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **75e** (10 mg, 17 %) als weißen Feststoff.

$C_{22}H_{22}Cl_2N_4O_4 \cdot TFA$: 477.34*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.15 (br. s, 1H, COOH), 11.28 (br. s, 1H, [$^{Dhpyr}NH$] $^+$), 10.33 (s, 1H, NH-NH-CO-CH $_2$), 9.97 (s, 2H, NH-NH-CO-CH $_2$, NH- ^{Ar}C), 7.80 (d, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.76 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.59 (t, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Ar}C^5$ -H), 7.50 (d, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Ar}C^4$ -H), 7.42 (t, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Phe}C^4$ -H), 7.34 (d, J = 7.8 Hz, 2H, $^{Phe}C^{2,6}$ -H), 3.62 (t, J = 7.1 Hz, 2H, $^{Dhpyr}C^2$ -H $_2$), 3.53-3.47 (m, 1H, CH $_2$ -CH-CH $_2$), 2.97 (t, J = 7.1 Hz, 2H, $^{Dhpyr}C^4$ -H $_2$), 2.77 (dd, J = 5.6/16.3 Hz, 1H, HCH-CH-CH $_2$), 2.63 (dd, J = 9.5/16.3 Hz, 1H, HCH-CH-CH $_2$), 2.58 (d, J = 7.6 Hz, 2H, HCH-CH-CH $_2$), 2.50-2.48 (m, 2H, $^{Dhpyr}C^3$ -H $_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 14.1 min; **ESI-MS** m/z 955.0 [$M^{35Cl}+M^{35Cl+37Cl}+H$] $^+$, 952.9 [$2M^{35Cl}+H$] $^+$, 481.3 [$M^{37Cl}+H$] $^+$, 479.2 [$M^{35Cl+37Cl}+H$] $^+$, 477.3 [$M^{35Cl}+H$] $^+$.



3-{*N*-[*N'*-(3-(2,3,4,5-Tetrahydropyridin-6-yl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-phenylpropionsäure (79a)

Mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-phenylpropionsäure (**50**) belegtes TCP-Harz (80 mg, 0.62 mmol/g, 49 μ mol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (**78**, 4 Äq.), 8a, HPLC-Reinigung (C, 20-45 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **79a** (14 mg, 53 %) als weißen Feststoff.

$C_{22}H_{25}N_5O_4 \cdot TFA$: 423.47*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.28 (br. s, 1H, COOH), 10.99 (s, 1H, [^{Thpy}NH] $^+$), 10.23 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.26 (s, 1H, NH- ^{Ar}C), 8.15 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.89 (d, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.78 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.61 (t, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^5$ -H), 7.46 (d, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^4$ -H), 7.34-7.29 (m, 4H, $^{Phe}C^{2,3,5,6}$ -H), 7.21 (t, J = 7.1 Hz, 1H, $^{Phe}C^4$ -H), 7.05 (d, J = 8.5 Hz, 1H, NH-CH), 5.10-5.06 (m, 1H, NH-CH), 3.26 (s, 2H, $^{Thpy}C^2$ -H $_2$), 2.77-2.67 (m, 4H, $^{Thpy}C^5$ -H $_2$, NH-CH-CH $_2$), 1.76 (s, 4H, $^{Thpy}C^{3,4}$ -H $_2$); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 11.1 min; ESI-MS m/z 885.1 [$2M+K$] $^+$, 869.1 [$2M+Na$] $^+$, 847.1 [$2M+H$] $^+$, 462.1 [$M+K$] $^+$, 446.1 [$M+Na$] $^+$, 424.1 [$M+H$] $^+$.

3-{*N*-[*N'*-(3-(2,3,4,5-Tetrahydropyridin-6-yl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure (79b)

Mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure (**51**) belegtes TCP-Harz (0.2 g, 0.44 mmol/g, 89 μ mol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (**78**), 9a, HPLC-Reinigung (B, 30-50 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **79b** (8 mg, 14 %) als weißen Feststoff.

$C_{22}H_{24}ClN_5O_4 \cdot TFA$: 457.91*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.03 (br. s, 1H, COOH), 10.87 (s, 1H, [^{Thpy}NH] $^+$), 10.23 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.25 (s, 1H, NH- ^{Ar}C), 8.16 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.89 (d, J = 7.9 Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.77 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.62 (t, J = 7.9 Hz, 1H, $^{Ar}C^5$ -H), 7.47 (d, J = 7.9 Hz, 1H, $^{Ar}C^4$ -H), 7.40-7.32 (m, 4H, $^{Phe}C^{2,3,5,6}$ -H), 7.05

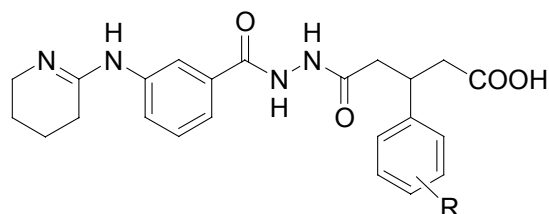
(d, $J = 8.5$ Hz, 1H, NH-CH), 5.08-5.03 (m, 1H, NH-CH), 3.26 (s, 2H, $^{Thpy}C^2-H_2$), 2.78-2.68 (m, 4H, $^{Thpy}C^5-H_2$, NH-CH-CH₂), 1.76 (s, 4H, $^{Thpy}C^{3,4}-H_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 13.1$ min; **ESI-MS** m/z 955.1 [$2M^{37Cl}+K$]⁺, 953.1 [$2M^{35Cl}+K$]⁺, 939.1 [$2M^{37Cl}+Na$]⁺, 937.1 [$2M^{35Cl}+Na$]⁺, 915.0 [$2M^{35Cl}+H$]⁺, 498.2 [$M^{37Cl}+K$]⁺, 496.1 [$M^{35Cl}+K$]⁺, 480.2 [$M^{35Cl}+Na$]⁺, 460.2 [$M^{37Cl}+H$]⁺, 458.2 [$M^{35Cl}+H$]⁺.

3-{*N*-[*N'*-(3-(2,3,4,5-Tetrahydropyridin-6-yl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäure (79c)

Mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäure (**52**) belegtes TCP-Harz (0.1 g, 0.63 mmol/g, 63 μ mol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (**78**), 9a, HPLC-Reinigung (B, 32-54 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **79c** (15 mg, 25 %) als weißen Feststoff.

$C_{22}H_{23}Cl_2N_5O_4 \cdot TFA$: 492.35*114.02 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) $\delta = 12.37$ (br. s, 1H, COOH), 10.94 (s, 1H, [^{Thpy}NH]⁺), 10.25 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.29 (s, 1H, NH-^{Ar}C), 8.28 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.90 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-H), 7.78 (s, 1H, ^{Ar}C²-H), 7.62 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, ^{Ar}C⁵-H), 7.47 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-H), 7.40 (s, 1H, ^{Phe}C⁴-H), 7.37 (s, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 7.16-7.14 (m, 1H, NH-CH), 5.07-5.02 (m, 1H, NH-CH), 3.26 (s, 2H, $^{Thpy}C^2-H_2$), 2.79-2.73 (m, 4H, $^{Thpy}C^5-H_2$, NH-CH-CH₂), 1.76 (s, 4H, $^{Thpy}C^{3,4}-H_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 14.7$ min; **ESI-MS** m/z 530.1 [$M^{35Cl}+K$]⁺, 494.2 [$M^{35Cl+37Cl}+H$]⁺, 492.2 [$M^{35Cl}+H$]⁺.



5-[*N'*-(3-(2,3,4,5-Tetrahydropyridin-6-yl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(4-chlorphenyl)-pentansäure (79d)

Mit 5-(*N'*-Fmoc-hydrazino)-5-oxo-3-(4-chlorphenyl)-pentansäure (**53**) belegtes TCP-Harz (0.2 g, 0.47 mmol/g, 94 μ mol) ergab nach AAV 3, 24 (**78**), 9a, HPLC-

Reinigung (B, 20-50 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **79d** (21 mg, 37 %) als weißen Feststoff.

$C_{23}H_{25}ClN_4O_4 \cdot TFA$: 456.92*114.02 g/mol

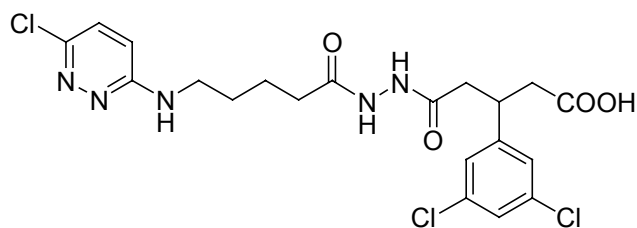
1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.08 (br. s, 1H, COOH), 10.88 (s, 1H, [^{Thpy}NH] $^+$), 10.34 (s, 1H, NH-NH-CO-CH $_2$), 9.97 (s, 1H, NH-NH-CO-CH $_2$), 9.24 (s, 1H, NH- ^{Ar}C), 7.88 (d, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.77 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.62 (t, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Ar}C^5$ -H), 7.47 (d, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Ar}C^4$ -H), 7.33 (d, J = 8.5 Hz, 2H, $^{Phe}C^{3,5}$ -H), 7.29 (d, J = 8.5 Hz, 2H, $^{Phe}C^{2,6}$ -H), 3.53-3.47 (m, 1H, CH $_2$ -CH-CH $_2$), 3.26 (s, 2H, $^{Thpy}C^2$ -H $_2$), 2.76 (dd, J = 5.5/16.3 Hz, 1H, HCH-CH-CH $_2$), 2.73 (s, 2H, $^{Thpy}C^5$ -H $_2$), 2.57-2.52 (m, 3H, HCH-CH-CH $_2$), 1.76 (s, 4H, $^{Thpy}C^{3,4}$ -H $_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 12.8 min; **ESI-MS** m/z 1370.9 [$2M^{35Cl}+M^{37Cl}+H$] $^+$, 915.0 [$2M^{37Cl}+H$] $^+$, 913.0 [$2M^{35Cl}+H$] $^+$, 459.2 [$M^{37Cl}+H$] $^+$, 457.3 [$M^{35Cl}+H$] $^+$.

5-[N' -(3-(2,3,4,5-Tetrahydropyridin-6-yl)-aminobenzoyl)-hydrazino]-5-oxo-3-(3,5-dichlorphenyl)-pentansäure (**79e**)

Mit 5-(N' -Fmoc-hydrazino)-5-oxo-3-(3,5-dichlorphenyl)-pentansäure (**54**) belegtes TCP-Harz (0.5 g, 0.48 mmol/g, 238 μ mol) ergab nach AAV 3, 24 (**78**), 9a, HPLC-Reinigung (B, 37-50 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **79e** (33 mg, 23 %) als weißen Feststoff.

$C_{23}H_{24}Cl_2N_4O_4 \cdot TFA$: 491.37*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.17 (br. s, 1H, COOH), 10.92 (s, 1H, [^{Thpy}NH] $^+$), 10.36 (s, 1H, NH-NH-CO-CH $_2$), 9.97 (s, 1H, NH-NH-CO-CH $_2$), 9.25 (s, 1H, NH- ^{Ar}C), 7.87 (d, J = 7.7 Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.76 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.62 (t, J = 7.7 Hz, 1H, $^{Ar}C^5$ -H), 7.47 (d, J = 7.7 Hz, 1H, $^{Ar}C^4$ -H), 7.42 (t, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Phe}C^4$ -H), 7.35 (d, J = 7.8 Hz, 2H, $^{Phe}C^{2,6}$ -H), 3.53-3.47 (m, 1H, CH $_2$ -CH-CH $_2$), 3.25 (s, 2H, $^{Thpy}C^2$ -H $_2$), 2.77 (dd, J = 5.7/16.3 Hz, 1H, HCH-CH-CH $_2$), 2.73 (s, 2H, $^{Thpy}C^5$ -H $_2$), 2.63 (dd, J = 9.3/16.3 Hz, 1H, HCH-CH-CH $_2$), 2.59 (d, J = 7.9 Hz, 2H, HCH-CH-CH $_2$), 1.77 (s, 4H, $^{Thpy}C^{3,4}$ -H $_2$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 14.2 min; **ESI-MS** m/z 495.3 [$M^{37Cl}+H$] $^+$, 493.3 [$M^{35Cl+37Cl}+H$] $^+$, 491.3 [$M^{35Cl}+H$] $^+$.

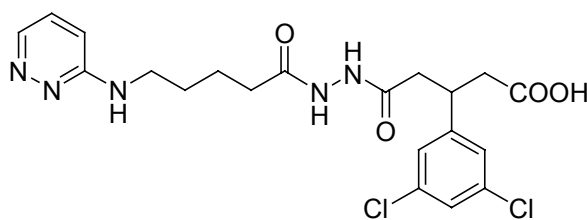


5-{*N'*-[5-(6-Chloropyridazin-3-ylamino)-pentanoyl]-hydrazino}-5-oxo-3-(3,5-dichlor-phenyl)-pentansäure (**84**)

Mit 5-(*N'*-Fmoc-hydrazino)-5-oxo-3-(3,5-dichlorphenyl)-pentansäure (**54**) belegtes TCP-Harz (0.1 g, 0.46 mmol/g, 46 μ mol) ergab nach AAV 3, 24 (**82**), 8b, HPLC-Reinigung (C, 30-45 % in 30 min) und Lyophilisieren **84** (13 mg, 56 %) als weißen Feststoff.

$C_{20}H_{22}Cl_3N_5O_4$: 502.78 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.13 (br. s, 1H, COOH), 9.71 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.66 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 8.46-8.44 (s, 1H, NH-CH₂), 7.48-7.44 (m, 1H, ^{Pyra}C⁵-H), 7.40-7.37 7.40-7.39 (m, 1H, ^{Phe}C⁴-H), 7.31-7.29 (m, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 6.96 (m, 1H, ^{Pyra}C⁴-H), 3.49-3.42 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.31-3.23 (m, 2H, NH-CH₂), 2.71 (dd, J = 5.5/16.4 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.63 (dd, J = 9.6/16.4 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.58 (d, J = 7.8 Hz, 2H, HCH-CH-CH₂), 2.17-2.04 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.59-1.51 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 14.2 min; ESI-MS m/z 1507.7 [$2M^{35Cl}+M^{37Cl}+H$]⁺, 1006.8 [$M^{35Cl}+M^{37Cl}+H$]⁺, 1004.7 [$M^{35Cl}+M^{35Cl+37Cl}+H$]⁺, 506.1 [$M^{37Cl}+H$]⁺, 504.2 [$M^{35Cl+37Cl}+H$]⁺, 502.3 [$M^{35Cl}+H$]⁺.

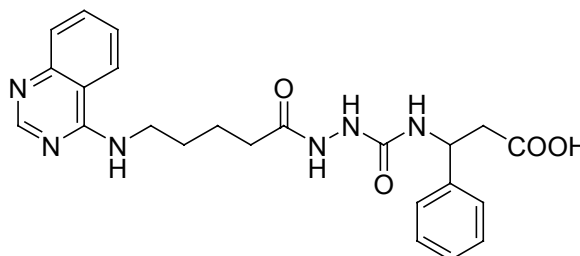


5-{*N'*-[5-(Pyridazin-3-ylamino)-pentanoyl]-hydrazino}-5-oxo-3-(3,5-dichlor-phenyl)-pentansäure (**85**)

Mit 5-(*N'*-Fmoc-hydrazino)-5-oxo-3-(3,5-dichlorphenyl)-pentansäure (**54**) belegtes TCP-Harz (0.1 g, 0.46 mmol/g, 46 μ mol) ergab nach AAV 3, 24 (**83**), 8b, HPLC-Reinigung (C, 30-45 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **85** (5 mg, 19 %) als weißen Feststoff.

$C_{20}H_{23}Cl_2N_5O_4 \cdot TFA$: 468.33*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.16 (br. s, 1H, COOH), 9.72 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 9.66 (s, 1H, NH-NH-CO-CH₂), 8.46-8.44 (m, 1H, NH-CH₂), 8.29 (br. s, 1H, [^{Pya}NH]⁺), 7.55-7.52 (m, 1H, ^{Pya}C⁶-H), 7.40-7.39 (m, 1H, ^{Phe}C⁴-H), 7.31-7.29 (m, 2H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 7.25-7.21 (m, 1H, ^{Pya}C⁵-H), 5.74 (s, 1H, ^{Pya}C⁴-H), 3.64-3.58 (m, 1H, CH₂-CH-CH₂), 3.31-3.23 (m, 2H, NH-CH₂), 2.71 (dd, J = 5.6/16.4 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.63 (dd, J = 9.6/16.4 Hz, 1H, HCH-CH-CH₂), 2.58 (d, J = 7.8 Hz, 2H, HCH-CH-CH₂), 2.17-2.07 (m, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.64-1.52 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 13.6 min; **ESI-MS** m/z 506.2 [$M^{35Cl}+K$]⁺, 490.2 [$M^{35Cl}+Na$]⁺, 472.3 [$M^{37Cl}+H$]⁺, 470.2 [$M^{35Cl+37Cl}+H$]⁺, 458.3 [$M^{35Cl}+H$]⁺.

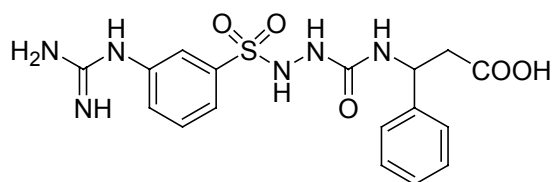


3-{N-[N'-(5-(Chinazolin-4-ylamino)-pentanoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-phenylpropionsäure (89)

Mit 3-(N-Fmoc)-Amino-3-phenylpropionsäure (**50**) belegtes Wang-Harz (86 mg, 0.90 mmol/g, 77 μ mol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (Fmoc-Aminovaleriansäure), 30, 10, HPLC-Reinigung (D, 20-45 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **89** (13 mg, 30 %) als weißen Feststoff.

$C_{23}H_{26}N_6O_4 \cdot TFA$: 450.49*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.22 (br. s, 1H, COOH), 10.04 (br. s, 1H, [^{Ch}NH]⁺), 9.46 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.86 (s, 1H, ^{Ch}C²-H), 8.43 (d, J = 7.9 Hz, 1H, ^{Ch}C⁸-H), 8.01 (t, J = 7.9 Hz, 1H, ^{Ch}C⁶-H), 7.82 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.77-7.40 (s, 2H, ^{Ch}C^{5,7}-H), 7.30-7.26 (m, 4H, ^{Phe}C^{2,3,5,6}-H), (m, 1H, NH-CH₂), 7.21-7.17 (m, 1H, ^{Phe}C⁴-H), 6.83 (d, J = 8.6 Hz, 1H, CO-NH-CH), 5.04-5.00 (m, 1H, NH-CH-CH₂), 3.71-3.69 (m, 2H, NH-CH₂), 2.75-2.62 (m, 2H, CH₂-COOH), 2.14 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂-CH₂-CO), 1.72-1.65 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 11.2 min; **ESI-MS** m/z 901.0 [2M+H]⁺, 451.2 [M+H]⁺.

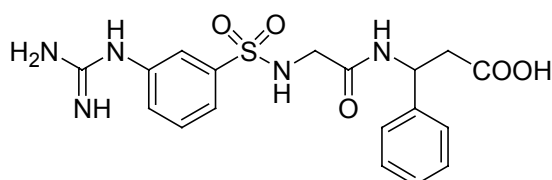


3-(*N*-{*N'*-[(3-Guanidinophenyl)-sulfonyl]-hydrazino}-carbonyl)-amino-3-phenylpropionsäure (**91a**)

Mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-phenylpropionsäure (**50**) belegtes Wang-Harz (30 mg, 0.90 mmol/g, 27 μ mol) ergab nach AAV 3, 23, 25, 26, 28, 10, HPLC-Reinigung (C, 25-40 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **91a** (2 mg, 14 %) als weißen Feststoff.

$C_{17}H_{20}N_6O_5S \cdot TFA$: 420.44*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.23 (br. s, 1H, COOH), 9.98 (br. s, 1H, NH- ^{Ar}C), 9.69 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.05 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.67 (d, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.64 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.60 (t, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^5$ -H), 7.56 (s, 4H, $^{Gua}N_2H_4$), 7.48 (d, J = 8.0 Hz, 1H, $^{Ar}C^4$ -H), 7.28-7.18 (m, 5H, $^{Phe}C^{2-6}$ -H), 7.14-7.12 (m, 1H, NH-CH), 4.97-4.93 (m, 1H, NH-CH), 2.74-2.61 (m, 2H, NH-CH- CH_2); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 11.2 min; **ESI-MS** m/z 879.4 [2M+K] $^+$, 963.3 [2M+Na] $^+$, 841.3 [2M+H] $^+$, 459.2 [M+K] $^+$, 443.3 [M+Na] $^+$, 421.3 [M+H] $^+$.



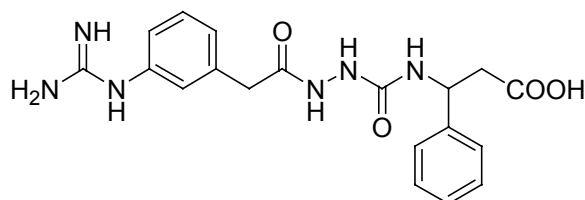
3-{*N*-[(3-Guanidinophenyl)-sulfonyl]-glycyl}-amino-3-phenylpropionsäure (**91b**)

Mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-phenylpropionsäure (**50**) belegtes Wang-Harz (0.2 g, 0.71 mmol/g, 142 μ mol) ergab nach AAV 5, 6, 25, 26, 28, 10, HPLC-Reinigung (B, 20-55 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **91b** (30 mg, 40 %) als weißen Feststoff.

$C_{18}H_{21}N_5O_5S \cdot TFA$: 419.46*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.26 (br. s, 1H, COOH), 9.90 (br. s, 1H, NH- ^{Ar}C), 8.45 (d, J = 8.3 Hz, 1H, NH-CH), 8.06 (t, J = 6.3 Hz, 1H, NH- CH_2 -CO), 7.64-7.54 (m, 7H, $^{Ar}C^{2,5,6}$ -H, $^{Gua}N_2H_4$), 7.43 (td, J = 1.6/7.3 Hz, 1H, $^{Ar}C^4$ -H), 7.31-7.20 (m,

5H, $^{\text{Phe}}\text{C}^{2-6}\text{-H}$), 5.10-5.05 (m, 1H, NH-CH), 3.47 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H, NH-CH₂-CO), 2.70-2.61 (m, 2H, NH-CH-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 11.0$ min; **ESI-MS** m/z 838.9 [2M+H]⁺, 420.2 [M+H]⁺.

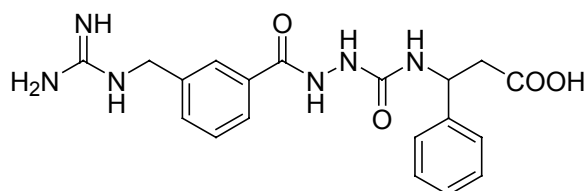


3-(*N*-{*N'*-[2-(3-Guanidinophenyl)-acetyl]-hydrazino}-carbonyl)-amino-3-phenylpropionsäure (**92**)

Mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-phenylpropionsäure (**50**) belegtes TCP-Harz (0.1 g, 0.60 mmol/g, 60 μmol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (2-(*N*-Fmoc)-(3-Aminophenyl)-essigsäure), 28, 9a, HPLC-Reinigung (B, 10-40 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **92** (9 mg, 29 %) als weißen Feststoff.

$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_4 \cdot \text{TFA}$: 398.42 * 114.02 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) $\delta = 12.25$ (s, 1H, COOH), 9.80 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.73 (br s, 1H, NH-^{Ar}C), 7.91 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.42 (br. s, 4H, ^{Gua}N₂H₄), 7.36 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, ^{Ar}C⁵-H), 7.29-7.27 (m, 4H, ^{Phe}C^{2,3,5,6}-H), 7.22-7.19 (m, 2H, ^{Ar}C⁶-H, ^{Phe}C⁴-H), 7.15 (s, 1H, ^{Ar}C²-H), 7.09 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-H), 6.89 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, NH-CH), 5.06-5.01 (m, 1H, NH-CH), 3.45 (s, 2H, CH₂-CO-NH), 2.74-2.64 (m, 2H, CH-CH₂-CO); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 9.7$ min; **ESI-MS** m/z 437.1 [M+K]⁺, 421.2 [M+Na]⁺, 399.2 [M+H]⁺.



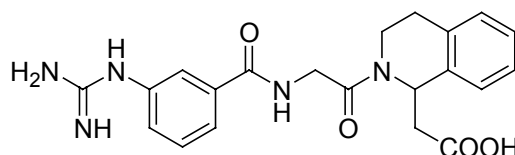
3-{*N*-[*N'*-(3-Guanidinomethylbenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-phenylpropionsäure (**93**)

Mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-phenylpropionsäure (**50**) belegtes TCP-Harz (0.1 g, 0.60 mmol/g, 60 μmol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (3-(*N*-Fmoc)-

Aminomethylbenzoesäure), 28, 9a, HPLC-Reinigung (B, 10-40 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **93** (12 mg, 39 %) als weißen Feststoff.

$C_{19}H_{22}N_6O_4 \cdot TFA$: 398.42*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.23 (s, 1H, COOH), 10.16 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.05 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.94 (br s, 1H, $^{Ar}C^4$ -H), 7.82-7.81 (m, 2H, $^{Ar}C^{2,5}$ -H), 7.50-7.45 (m, 5H, $^{Gua}N_2H_4$, $^{Ar}C^6$ -H), 7.35-7.29 (m, 4H, $^{Phe}C^{2,3,5,6}$ -H), 7.22 (tt, J = 1.6/7.2 Hz, 1H, $^{Phe}C^4$ -H), 7.02-7.00 (m, 2H, NH-CH, NH-CH₂), 5.10-5.05 (m, 1H, NH-CH), 4.42 (d, J = 6.3 Hz, 2H, NH-CH₂), 2.77-2.67 (m, 2H, CH-CH₂-CO); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 9.9 min; **ESI-MS** m/z 437.1 [M+K]⁺, 421.2 [M+Na]⁺, 399.2 [M+H]⁺.

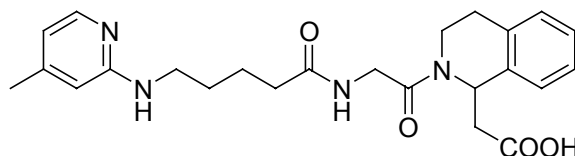


3-Guanidinobenzoyl-glycyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-2-yl-essigsäure (**99a**)

Mit 2-(*N*-Fmoc-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-1-yl)-essigsäure (**97**) belegtes TCP-Harz (0.15 g, 0.45 mmol/g, 68 μ mol) ergab nach AAV 5, 6 (Fmoc-Gly-OH), 24 (**35**), 28, 9a, HPLC-Reinigung (B, 25-54 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **99a** (15 mg, 42 %) als weißen Feststoff.

$C_{21}H_{23}N_5O_4 \cdot TFA$: 409.44*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.26 (br. s, 1H, COOH), 9.72 (s, 1H, NH- ^{Ar}C), 8.66-8.59 (m, 1H, NH-CH₂), 7.78 (d, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.71 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.53 (t, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Ar}C^5$ -H), 7.46 (s, 4H, $^{Gua}N_2H_4$), 7.38 (d, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Ar}C^4$ -H), 7.28-7.15 (m, 4H, $^{Thich}C^{5,6,7,8}$ -H), 5.78-5.75, 5.45-5.42 (m, 1H, N-CH-CH₂), 5.11 (d, J = 17.9 Hz, 1H, $^{Thich}C^1$ -H₂), 4.40-4.33, 4.26-4.16 (m, 2H, NH-CH₂), 3.87-3.82, 3.21-3.15 (m, 2H, CH₂-COOH), 2.98-2.61 (m, 4H, N-CH₂-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 12.2 min; **ESI-MS** m/z 1288.4 [3M-H+Na+K]⁺, 1266.3 [3M+K]⁺, 879.4 [2M-H+Na+K]⁺, 857.3 [2M+K]⁺, 841.3 [2M+Na]⁺, 819.2 [2M+H]⁺, 448.4 [M+K]⁺, 432.3 [M+Na]⁺, 410.3 [M+H]⁺.

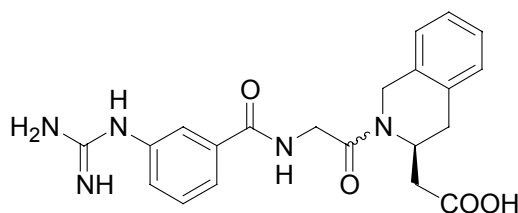


2-[5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl-glycyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-1-yl]-essigsäure (**99b**)

Mit 2-(*N*-Fmoc-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-1-yl)-essigsäure belegtes TCP-Harz (0.15 g, 0.45 mmol/g, 68 μ mol) ergab nach AAV 5, 6 (Fmoc-Gly-OH), 24 (**55**), 9a, HPLC-Reinigung (B, 25-54 % in 30 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **99b** (28 mg, 75 %) als weißen Feststoff.

$C_{24}H_{30}N_4O_4 \cdot TFA$: 438.52*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.89 (br. s, 1H, COOH), 12.46 (br. s, 1H, [^{Py}NH] $^+$), 8.42 (br. s, 1H, NH-CH $_2$), 7.97-7.90 (m, 1H, NH-CH $_2$), 7.77 (d, J = 6.2 Hz, 1H, $^{Py}C^6$ -H), 7.24-7.12 (m, 4H, $^{Thich}C^{5,6,7,8}$ -H), 6.79 (s, 1H, $^{Py}C^3$ -H), 6.67 (d, J = 6.2 Hz, 1H, $^{Py}C^5$ -H), 5.75-5.73 (m, 1H, N-CH-CH $_2$), 4.02 (dd, J = 5.4/16.7 Hz, 1H, NH-HCH-CO), 3.95 (dd, J = 5.4/16.7 Hz, 1H, NH-HCH-CO), 3.76-3.71, 3.17-3.11 (m, 2H, NH-CH $_2$), 2.93-2.58 (m, 4H, N-CH $_2$ -CH $_2$), 2.30 (s, 3H, CH $_3$), 2.20-2.15 (m, 2H, (CH $_2$) $_2$ -CH $_2$ -CO), 1.57-1.54 (m, 4H, (CH $_2$) $_2$ -CH $_2$ -CO); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 13.5 min; **ESI-MS** m/z 1391.4 [3M-H+2K] $^+$, 1375.4 [3M-H+Na+K] $^+$, 937.3 [2M-H+Na+K] $^+$, 915.2 [2M+K] $^+$, 899.2 [2M+Na] $^+$, 477.3 [M+K] $^+$, 461.3 [M+Na] $^+$, 439.3 [M+H] $^+$.

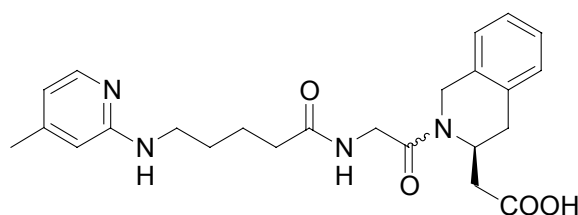


2-(2-Guanidinobenzoyl-glycyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3(S)-yl)-essigsäure (**100a**)

Mit 2-(*N*-Fmoc-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3(S)-yl)-essigsäure (**100**) belegtes TCP-Harz (0.12 g, 0.36 mmol/g, 41 μ mol) ergab nach AAV 5, 6 (Fmoc-Gly-OH), 24 (**35**), 28, 9a, HPLC-Reinigung (B, 27-40 % in 30 min) und Lyophilisieren als Nebenprodukt das TFA-Salz von **100a** (18 mg, 84 %) als weißen Feststoff.

$C_{21}H_{23}N_5O_4 \cdot TFA$: 409.44*114.02 g/mol

¹H-NMR (1.3:1 Verhältnis der Rotationsisomere, * kleinere Rotationsisomer-Signale, 500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.39 (br. s, 1H, COOH), 9.95 (s, 1H, NH-ArC), 8.67 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH-CH₂-CO), 8.63* (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, NH-CH₂-CO), 7.78 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁶-H), 7.72 (s, 1H, ^{Ar}C²-H), 7.58 (s, 4H, ^{Gua}N₂H₄), 7.53 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁵-H), 7.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ^{Ar}C⁴-H), 7.25-7.17 (m, 4H, ^{Thich}C^{5,6,7,8}-H), 5.11 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H, ^{Thich}C¹-H₂), 5.02-5.01* (m, 1H, ^{Thich}C³-H), 4.82* (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, ^{Thich}C¹-H₂), 4.75-4.73 (m, 1H, ^{Thich}C³-H), 4.55* (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, ^{Thich}C¹-H₂), 4.44 (dd, *J* = 5.4/16.4 Hz, 1H, NH-CH₂-CO), 4.29-4.19 (m, 3H, NH-CH₂-CO), 4.10 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H, ^{Thich}C¹-H₂), 3.15 (dd, *J* = 5.0/16.4 Hz, 1H CH₂-COOH), 2.98* (dd, *J* = 5.2/15.8 Hz, 1H, CH₂-COOH), 2.79-2.74 (m, 2H, CH₂-COOH), 2.51-2.41, 2.37-2.33, 2.21-2.16 (m, 4H, ^{Thich}C⁴-H₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 12.3 min; **ESI-MS** *m/z* 1304.4 [3M-H+2K]⁺, 857.3 [2M+K]⁺, 841.3 [2M+Na]⁺, 819.2 [2M+H]⁺, 448.2 [M+K]⁺, 432.2 [M+Na]⁺, 410.2 [M+H]⁺.



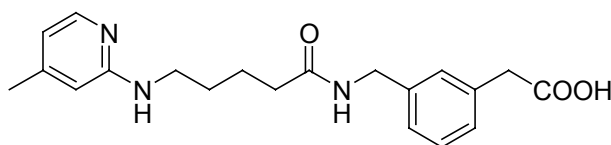
5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl-glycyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3(S)-yl-essigsäure (100b)

Mit 2-(*N*-Fmoc-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3(S)-yl)-essigsäure belegtes TCP-Harz (0.12 g, 0.36 mmol/g, 41 μmol) ergab nach AAV 5, 6 (Fmoc-Gly-OH), 24 (**55**), 8a, HPLC-Reinigung (B, 30-40 % in 30 min) und Lyophilisieren als Nebenprodukt das TFA-Salz von **100b** (10 mg, 44 %) als weißen Feststoff.

C₂₄H₃₀N₄O₄*TFA: 438.52*114.02 g/mol

¹H-NMR (1.3:1 Verhältnis der Rotationsisomere, * kleinere Rotationsisomer-Signale, 500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.35 (br. s, 1H, COOH), 8.46 (br. s, 1H, NH-CH₂), 7.93-7.97 (m, 1H, NH-CH₂-CO), 7.78 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Py}C⁶-H), 7.14-7.22 (m, 4H, ^{Thich}C^{5,6,7,8}-H), 6.81 (s, 1H, ^{Py}C³-H), 6.69 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, ^{Py}C⁵-H), 5.08 (d, *J* = 17.9 Hz, 1H, ^{Thich}C¹-H₂), 5.01-4.97* (m, 1H, ^{Thich}C³-H), 4.71* (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, ^{Thich}C¹-H₂), 4.63-4.59 (m, 1H, ^{Thich}C³-H), 4.47* (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, ^{Thich}C¹-H₂), 4.21

(dd, $J = 5.5/16.7$ Hz, Hz, 1H, NH-CH₂-CO), 4.08-4.04 (m, 3H, NH-CH₂-CO, ^{Thiqu}C¹-H₂), 3.97* (dd, $J = 5.4/16.9$ Hz, 1H, NH-CH₂-CO), 3.27 (m, 2H, NH-CH₂), 3.11 (dd, $J = 5.3/16.2$ Hz, 1H, CH₂-COOH), 2.95* (dd, $J = 5.4/15.7$ Hz, 1H, CH₂-COOH), 2.77-2.62 (m, 2H, CH₂-COOH), 2.44-2.34 (m, 3H, ^{Thich}C⁴-H₂) 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.21-2.12 (m, 3H, ^{Thich}C⁴-H₄, CH₂-CH₂-CO), 1.58 (s, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 13.3 min; **ESI-MS** m/z 1391.6 [3M-H+2K]⁺, 937.5 [2M-H+Na+K]⁺, 915.3 [2M+K]⁺, 899.1 [2M+Na]⁺, 876.9 [2M+H]⁺, 477.3 [M+K]⁺, 461.3 [M+Na]⁺, 439.3 [M+H]⁺.



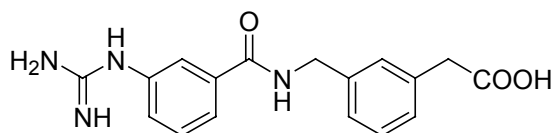
***N*-[5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentanoyl]-2-[3-(aminomethyl)-phenyl]-essigsäure (106)**

m-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-aminomethylphenylelessigsäureethylester (**105**, 2.99 g, 10.91 mmol) wurden in einer 1:1-Mischung aus TFA:CH₂Cl₂ (60 mL) 45 min bei Raumtemperatur entschützt (DC-Kontrolle). Die Lösemittel wurden im Hochvakuum entfernt und zweimal mit Toluol koevaporiert und man erhält *m*-Aminomethylphenylelessigsäureethylester (1.91 g, 91 %) als gelbes Öl.

Anschließend wurde 5-(4-Methylpyridin-2-ylamino)-pentansäure (344 mg, 1.65 mmol) in trockenem DMF (20 mL) unter Zugabe von EDCI·HCl (316 mg, 1.65 mmol) DIPEA (842 µl, 4.95 mmol) und *m*-Aminomethylphenylelessigsäureethylester (290 mg, 1.50 mmol) in trockenem DMF (6 mL) innerhalb von 18 h umgesetzt. Die Lösemittel werden am N₂-Rotationsverdampfer im Hochvakuum entfernt, der Rückstand in H₂O (60 mL) aufgenommen und mit CHCl₃ (4 x 30 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Verseifen des Ethylesters in 1N NaOH (8 mL) und MeOH (1.6 mL) über Nacht, Entfernen von MeOH im Vakuum und Ausfällen der Säure mit 1N HCl ergab das Rohprodukt (1.96 g) als gelben Feststoff. Mittels HPLC-Reinigung (C, 20-30 % in 16 min) und Lyophilisieren wurde das TFA-Salz von **106** (690 mg, 98 %) erhalten.

C₂₀H₂₅N₃O₃*TFA: 355.43*114.02 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.89 (br. s, 1H, COOH), 12.46 (br. s, 1H, [^{Py}NH]⁺), 9.99 (s, 1H, NH-ArC), 8.55 (s, 1H, NH-CH₂), 8.36 (s, 1H, NH-CH₂-^{Phe}C), 7.80 (d, J = 6.3 Hz, 1H, ^{Py}C⁶-H), 7.23 (t, J = 7.5 Hz, 1H, ^{Phe}C⁵-H), 7.11 (s, 3H, ^{Phe}C^{2,4,6}-H), 6.81 (s, 1H, ^{Py}C³-H), 6.67 (d, J = 6.3 Hz, 1H, ^{Py}C⁵-H), 4.23 (d, J = 5.5 Hz, 2H, NH-CH₂-^{Phe}C), 3.29 (s, 2H, CH₂-COOH), 3.28-3.26 (m, 2H, NH-CH₂), 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.18 (t, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂-CO-NH), 1.63-1.53 (m, 4H, (CH₂)₂-CH₂-CO); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 11.3 min; **ESI-MS** m/z 1142.2 [3M-H+2K]⁺, 771.2 [2M-H+Na+K]⁺, 749.1 [2M+K]⁺, 733.0 [2M+Na]⁺, 394.1 [M+K]⁺, 378.3 [M+Na]⁺, 356.2 [M+H]⁺.



***N*-(3-Guanidinobenzoyl)-2-[3-(aminomethyl)-phenyl]-essigsäure (107)**

m-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-aminomethylphenylessigsäureethylester (**105**, 2.99 g, 10.91 mmol) wurden in einer 1:1-Mischung aus TFA:CH₂Cl₂ (60 mL) 45 min bei Raumtemperatur entschützt (DC-Kontrolle). Die Lösemittel wurden im Hochvakuum entfernt und zweimal mit Toluol koevaporiert und man erhält *m*-Aminomethylphenylessigsäureethylester (1.91 g, 91 %) als gelbes Öl.

Anschließend wurde 3-*N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-aminobenzoesäure (391 mg, 1.65 mmol) in trockenem DMF (20 mL) unter Zugabe von EDCI·HCl (316 mg, 1.65 mmol) DIPEA (842 μ l, 4.95 mmol) und *m*-Aminomethylphenylessigsäureethylester (290 mg, 1.50 mmol) in trockenem DMF (6 mL) umgesetzt. Eine pH-Kontrolle ergab pH 8.5, weshalb keine weitere Base zugegeben werden musste. Nach dem Entfernen des Lösemittels wurde in einer 1:1-Mischung aus TFA:CH₂Cl₂ (20 mL) 45 min bei Raumtemperatur die Boc-Schutzgruppe abgespalten und die Reaktionsmischung im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Eine HPLC-Reinigung und Lyophilisieren ergab *N*-(3-Aminobenzoyl)-2-[3-(aminomethyl)-phenyl]-essigsäure.

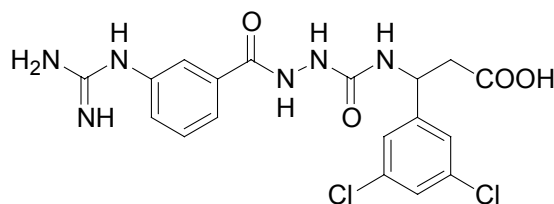
N-(3-Aminobenzoyl)-2-[3-(aminomethyl)-phenyl]-essigsäure (100 mg, 0.32 mmol) und **36** (5 Äq., 496 mg, 1.6 mmol) wurden in trockenem CHCl₃ (2 mL) gelöst und über Nacht unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Entfernen der Lösemittel, HPLC-

Reinigung (B, 15-90 % in 30 min), Lyophilisieren und Abspaltung der Schutzgruppen zuerst mit einer 1:1-Mischung aus TFA:CH₂Cl₂ (20 mL) 30 min bei Raumtemperatur, Entfernen der Lösemittel und anschließend Esterspaltung mit 1N NaOH (5 mL) in MeOH (1 mL) über Nacht, Entfernen der Lösemittel, HPLC-Reinigung (B, 15-90 % in 30 min) und Lyophilisieren ergab das TFA-Salz von **107** (5 mg, 4 %) als farbloses Öl.

C₁₇H₁₈N₆O₄*TFA: 326.35*114.02 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.31 (br. s, 1H, COOH), 9.99 (s, 1H, NH-ArC), 9.09 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH-CH₂), 7.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArC⁶-H), 7.75 (s, 1H, ArC²-H), 7.59 (s, 4H, ^{Gua}N₂H₄), 7.53 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArC⁵-H), 7.37 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArC⁴-H), 7.27-6.97 (m, 4H, ^{Phe}C^{2,4,5,6}-H), 4.42 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, NH-CH₂), 3.32 (s, 2H, CH₂-COOH); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 9.4 min; ESI-MS *m/z* 327.3 [M+H]⁺.

9.5.3 Synthese eines Prodrugs und seiner Referenzverbindung



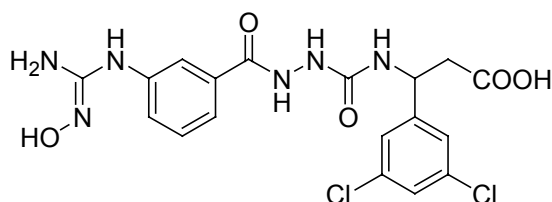
3-{N-[N'-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(3,5-dichlorophenyl)-propionsäure (**49**)

Mit 3-(N-Fmoc)-Amino-3-(3,5-dichlorphenyl)-propionsäure (**52**) belegtes TCP-Harz (175 mg g, 0.63 mmol/g, 0.11 mmol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (**35**), 28, 9a, HPLC-Reinigung (C, 25-37 % in 18 min) und Lyophilisieren das TFA-Salz von **49** (5 mg, 8 %) als weißen Feststoff.

C₁₈H₁₈Cl₂N₆O₄*TFA: 453.28*114.02 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ = 12.07 (br. s, 1H, COOH), 10.21 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.71 (s, 1H, NH-ArC), 8.24 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 7.78 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArC⁶-H), 7.71 (s, 1H, ArC²-H), 7.54 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, ArC⁵-H), 7.46-7.40 (m, 8H, ^{Gua}N₂H₄, ArC⁴-H, ^{Phe}C^{2,4,6}-H), 7.11 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, NH-CH), 5.07-5.02 (m, 1H, NH-CH), 2.81-2.71 (m, 2H, NH-CH-CH₂); HPLC (10-90 % in 30 min) R_t = 13.7 min;

ESI-MS m/z 908.9 $[M^{35Cl}+M^{37Cl}+H]^+$, 906.9 $[M^{35Cl}+M^{35Cl+37Cl}+H]^+$, 904.9 $[2M^{35Cl}+H]^+$, 457.1 $[M^{37Cl}+H]^+$, 455.1 $[M^{35Cl+37Cl}+H]^+$, 453.2 $[M^{35Cl}+H]^+$.



3-{N-[N'-(3-Hydroxyguanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(3,5-dichlorophenyl)-propionsäure (49OH)

0.3 g HL-PHB-TentaGel-Harz wurde nach AAV 2 mit (**52**) (0.18 mmol) belegt und das belegte Harz (354 mg, 0.31 mmol/g) nach AAV 5, 23, 24 (**35**) umgesetzt. Anschließend erfolgte die Reaktion des freien Amins an der Festphase mit Bromcyan (10 Äq.) und Natriumacetat (25 Äq.), in trockenem Methanol (0.2 M bezogen auf BrCN) 20 h bei RT. Die Reaktion wurde durch Waschen mit trockenem Methanol beendet. Abschließend wurde das Harz mit einer 0.2 M Lösung von $H_2NOH \cdot HCl$ in trockenem Ethanol versetzt. Nach 20 h bei 70 °C wurde das Harz mit MeOH (5 x 3 min) und CH_2Cl_2 (5 x 3 min) gewaschen. Die Abspaltung vom Harz nach AAV 10, HPLC-Reinigung (C, 25-45 % in 30 min) und Lyophilisieren ergab das TFA-Salz von **49OH** (10 mg, 16 %) als weißen Feststoff.

$C_{18}H_{18}Cl_2N_6O_5 \cdot TFA$: 469.28*114.02 g/mol

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ = 12.38 (br. s, 1H, COOH), 10.11 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.90 (s, 1H, NH- ^{Ar}C), 8.17 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.06 (s, 1H, N-OH), 7.78 (d, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Ar}C^6$ -H), 7.71 (s, 1H, $^{Ar}C^2$ -H), 7.54 (t, J = 7.8 Hz, 1H, $^{Ar}C^5$ -H), 7.45-7.39 (m, 6H, $^{Gua}NH_2$, $^{Phe}C^{2,4,6}$ -H, $^{Ar}C^4$ -H), 7.12 (d, J = 8.3 Hz, 1H, NH-CH), 5.22 (s, 1H, N-OH), 5.05-5.02 (m, 1H, NH-CH), 2.80-2.71 (m, 2H, NH-CH- CH_2); **HPLC** (10-90 % in 30 min) R_t = 13.8 min; **ESI-MS** m/z 940.9 $[2M^{37Cl+35Cl}+H]^+$, 938.9 $[M^{35Cl}M^{37Cl+35Cl}+H]^+$, 936.9 $[2M^{35Cl}+H]^+$, 473.2 $[M^{37Cl}+H]^+$, 471.1 $[M^{37Cl+35Cl}+H]^+$, 469.1 $[M^{35Cl}+H]^+$.

9.6 Synthese von RGD-Verbindungen für SPFS

N-Boc-Aminohexanal modifiziert nach Inoue *et al.*^[400]

N-Boc-Aminohexanol (435 mg, 2 mmol) und Triethylamin (1.39 mL, 10 mmol, 5 Äq.) wurden in einem 3:1 Gemisch aus CH₂Cl₂:DMSO (40 mL) gelöst und nach Zugabe von Pyridin*SO₃ (1.27 g, 8 mmol, 4 Äq.) 30 min gerührt. Die Reaktion wurde mittels DC verfolgt. Anschließend wurde Ethylacetat (175 mL) zugegeben und mit H₂O (2 x je 100 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen. Trocknen über Na₂SO₄ und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergab *N*-Boc-Aminohexanal (423 mg, 98 %) als farbloses Öl.

C₁₁H₂₁NO₃: 215.29 g/mol

R_f = 0.5 (Hexan:Ethylacetat 1:1; Alkohol = 0.2); ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ = 9.74 (s, 1H, CHO), 4.57 (br. S, 1H, NH), 3.13-3.05 (m, 2H, CH₂-NH), 2.42 (t, J = 7.2 Hz, CH₂-CHO), 1.69-1.23 (m, 6H, CH₂-(CH₂)₃-CH₂), 1.41 (s, 9H, (CH₃)₃).

c(-RADfE-)-Dpr[Ac(6-aminohexancarbaldehydoxim)]-OH (M5A)

TCP-Harz wurde nach AAV 1 mit Fmoc-Dpr[Aoa(Boc)]-OH belegt. Nach AAV 3 wurde die temporäre Schutzgruppe abgespalten und nach AAV 13a *cyclo*(-RADfE-) angebunden. Die Peptide wurden nach AAV 9b vom Harz abgespalten, und HPLC (C, 5-45 % in 30 min) isoliert und lyophilisiert. Es wurde c(-RADfE-)-Dpr(Aoa)-OH (61.8 mg, 89 %) erhalten.

C₃₂H₄₇N₁₁O₁₂*TFA: 777.78*114.02 g/mol

HPLC (10-90 %, 30 min) R_t = 7.4; ESI-MS *m/z* 1555.4 [2M+H]⁺, 816.4 [M+K]⁺, 800.4 [M+Na]⁺, 778.5 [M+H]⁺, 408.9 [(M+K+H)/2]²⁺, 390.0 [(M+2H)/2]²⁺.

Die Umsetzung von c(-RADfE-)-Dpr(Aoa)-OH mit *N*-Boc-Aminohexanal nach AAV 15 und Entschützen des Amins in einem 1:1 Gemisch TFA:CH₂Cl₂ bei 0 °C innerhalb von 3 h ergab die aminofunktionalisierte Verbindung.

C₃₈H₅₈N₁₂O₁₂*TFA: 874.94*228.05 g/mol

HPLC (5-90 %, 30 min) R_t liegt im Spülpeak; ESI-MS *m/z* 897.4 [M+Na]⁺, 875.6 [M+H]⁺, 438.6 [(M+2H)/2]²⁺.

[c(-RGDfE)-Ahx]₂-K-Dpr[Ac(6-aminohexancarbaldehydoxim)]-OH (D1A)

Die Umsetzung von **D1** mit *N*-Boc-Aminohexanal nach AAV 15 und Entschützen des Amins in einem 1:1 Gemisch TFA:CH₂Cl₂ bei 0 °C innerhalb von 3 h ergab die aminofunktionalisierte Verbindung.

C₈₁H₁₂₄N₂₄O₂₃*TFA: 1802.00*342.07 g/mol

HPLC (5-90 %, 30 min) R_t liegt im Spülpeak; **ESI-MS** *m/z* 1801.8 [M+H]⁺, 901.9 [(M+2H)/2]²⁺, 601.6 [(M+3H)/3]³⁺; **MALDI-MS** *m/z* 1801.7 [M+H]⁺.

[c(-RGDfE)-Hegas]₂-K-Dpr[Ac(6-aminohexancarbaldehydoxim)]-OH (D2A)

Die Umsetzung von **D2** mit *N*-Boc-Aminohexanal nach AAV 15 und Entschützen des Amins in einem 1:1 Gemisch TFA:CH₂Cl₂ bei 0 °C innerhalb von 3 h ergab die aminofunktionalisierte Verbindung.

C₉₇H₁₅₆N₂₄O₃₅*TFA: 2218.42*342.07 g/mol

HPLC (5-90 %, 30 min) R_t liegt im Spülpeak; **ESI-MS** *m/z* 1110.1 [(M+2H)]²⁺, 740.6 [(M+3H)/3]³⁺; **MALDI-MS** *m/z* 2217.8 [M+H]⁺.

{[c(-RGDfE)-Ahx]₂-K}₂-K-Dpr[Ac(6-aminohexancarbaldehydoxim)]-OH (T1A)

Die Umsetzung von **T1** mit *N*-Boc-Aminohexanal nach AAV 15 und Entschützen des Amins in einem 1:1 Gemisch TFA:CH₂Cl₂ bei 0 °C innerhalb von 3 h ergab die aminofunktionalisierte Verbindung.

C₁₅₇H₂₃₈N₄₆O₄₃*TFA: 3457.85*570.12 g/mol

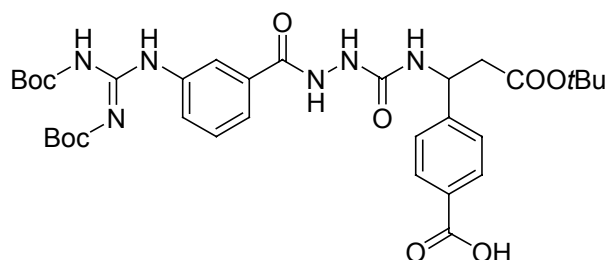
HPLC (5-90 %, 30 min) R_t liegt im Spülpeak; **ESI-MS** *m/z* 1161.0 [(M+Na+2H)/3]³⁺, 1153.7 [(M+3H)/3]³⁺, 865.6 [(M+4H)/4]⁴⁺, 692.8 [(M+5H)/5]⁵⁺; **MALDI-MS** *m/z* 3456.5 [M+H]⁺.

{[c(-RGDfE)-Hegas]₂-K}₂-K-Dpr[Ac(6-aminohexancarbaldehydoxim)]-OH (T2A)

Die Umsetzung von **T2** mit *N*-Boc-Aminohexanal nach AAV 15 und Entschützen des Amins in einem 1:1 Gemisch TFA:CH₂Cl₂ bei 0 °C innerhalb von 3 h ergab die aminofunktionalisierte Verbindung.

C₁₈₉H₃₀₂N₄₆O₆₇*TFA: 4290.69*570.12 g/mol

HPLC (5-90 %, 30 min) R_t liegt im Spülpeak; **ESI-MS** m/z 1073.8 [(M+4H)/4]⁴⁺, 859.4 [(M+5H)/5]⁵⁺; **MALDI-MS** m/z 4288.9 [M+H]⁺.



3-{N-[N'-(3-(N-N'-Bis-Boc)-guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-carboxyphenyl)-propionsäure-*tert*-butylester

4-Carboxybenzaldehyd (4.50 g, 30 mmol) wurde nach AAV 16 (Malonsäure-mono-*tert*-butylester) umgesetzt und ergab 3-Amino-3-(4-carboxyphenyl)-propionsäure-*tert*-butylester (5.17 g, 65 %) als weißen Feststoff.

$C_{14}H_{19}NO_4$: 265.31 g/mol

HPLC (10-80 %, 30 min) R_t = 12.7 min; **ESI-MS** m/z 265.9 [M+H]⁺, 209.9 [M-*t*Bu+2H]⁺.

3-Amino-3-(4-carboxy)-phenylpropionsäure-*tert*-butylester wurde nach AAV 17 innerhalb von 20 h zu einem Öl umgesetzt. Auch nach dem Lyophilisieren aus *tert*-Butanol erhält man 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(4-carboxyphenyl)-propionsäure-*tert*-butylester (0.85 g, 35%) als gelbliches Öl, das im Kühlschrank langsam auskristallisiert.

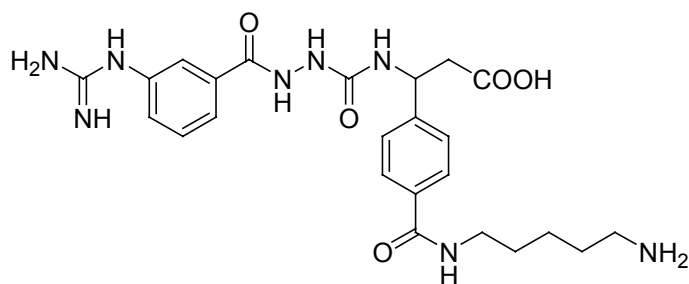
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.22 (s, 1H, COOH), 8.10-7.29 (m, 13H, ^{Fmoc/Phe}C-H, NH-CH), 5.03-4.96 (m, 1H, NH-CH), 4.37-4.18 (m, 3H, CH-CH₂), 2.68 (d, 2H, CH-CH₂), 1.30 (s, 9H, C(CH₃)₃); **HPLC** (10-80 %, 30 min) R_t = 29.0 min; **ESI-MS** m/z 1013.4 [2M+K]⁺, 997.0 [2M+Na]⁺, 975.4 [2M+H]⁺, 510.2 [M+Na]⁺, 487.9 [M+H]⁺.

Mit 3-(*N*-Fmoc)-Amino-3-(4-carboxyphenyl)-propionsäure-*tert*-butylester belegtes TCP-Harz (1.39 g, 0.56 mmol/g, 0.78 mmol) ergab nach AAV 5, 23, 24 (**35**), 28, 8a und Lyophilisieren 3-{N-[N'-(3-(N-N'-Bis-Boc)-guanidinobenzoyl)-hydrazino]-

carbonyl}-amino-3-(4-carboxy-phenyl)-propionsäure-*tert*-butylester (Rohausbeute 178 mg, 34%) als hellgelben Feststoff.

$C_{33}H_{44}N_6O_{10}$: 684.74 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min) $R_t = 23.7$ min; **ESI-MS** m/z 1407.4 $[2M+K]^+$, 1391.2 $[2M+Na]^+$, 1369.2 $[2M+H]^+$, 707.2 $[M+Na]^+$, 685.1 $[M+H]^+$, 585.1 $[M-Boc+2H]^+$, 485.2 $[M-2Boc+3H]^+$, 429.3 $[M-2Boc-tBu+4H]^+$.

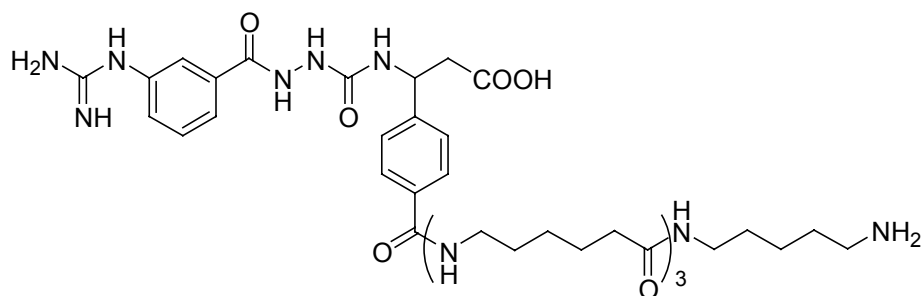


3-{*N*-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-[4-(pentamethyldiamino-carbonyl)-phenyl]-propionsäure

Die Umsetzung von 3-{*N*-[*N'*-(3-(*N*-*N'*-Bis-Boc)-guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-carboxy-phenyl)-propionsäure-*tert*-butylester (30 mg, 43.8 μ mol) nach AAV 13b (1 Äq. *mono*-Boc-1,5-Diaminopentan**n*TosOH, 1.5 Äq. EDCI·HCl, 3 Äq. DIPEA, 2 mL CH_2Cl_2), AAV 11a (ohne TIPS, 3 h), HPLC-Reinigung (B, 5-35 % in 30 min) und Lyophilisieren ergab das TFA-Salz von 3-{*N*-[*N'*-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-[4-(pentamethyldiamino-carbonyl)-phenyl]-propionsäure (8 mg, 25 %) als weißen Feststoff.

$C_{24}H_{32}N_8O_5 \cdot TFA$: 512.56*228.05 g/mol

1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) $\delta = 12.29$ (br. s, 1H, COOH), 10.20 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 10.00 (br. s, 1H, NH- ^{Ar}C), 8.14 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.02 (s, 1H, CO-NH- CH_2), 7.79-7.73 (m, 3H, $^{Ar}C^6-H$, $^{Phe}C^{2,6}-H$), 7.72-7.68 (m, 4H, $^{Ar}C^{2,5}-H$, $^{Phe}C^{3,5}-H$), 7.49-7.45 (m, 5H, $^{Ar}C^4-H$, $^{Gua}N_2H_4$), 7.08 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, NH-CH), 5.09-5.05 (m, 1H, NH-CH), 3.21-3.15 (m, 2H, CO-NH- CH_2), 2.78-2.70 (m, 2H, NH-CH- CH_2), 2.68-2.64 (m, 2H, $(CH_2)_3-CH_2-NH_2$), 1.51-1.19 (m, 6H, $(CH_2)_3$); **HPLC** (10-90 % in 30 min) $R_t = 6.0$ min; **ESI-MS** m/z 535.3 $[M+Na]^+$, 513.3 $[M+H]^+$, 257.3 $[(M+2H)/2]^+$.



3-{N-[N'-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-[4-(pentamethyldiamino-Ahx₃-carbonyl)-phenyl]-propionsäure

Der Aufbau der Ahx-Einheit erfolgte an mit *N*-Fmoc- ϵ -Aminohexansäure belegtem TCP-Harz (150 mg, 0.62 mmol/g, 93 μ mol) nach AAV 3 und 6.

$C_{42}H_{65}N_{11}O_8$: g/mol

Anschließend wurde nach AAV 3, 13b (93 μ mol Säure), 8b und Lyophilisieren das Mimetikum mit den Ahx-Einheiten umgesetzt.

$C_{42}H_{65}N_{11}O_8$: g/mol

Die weitere Umsetzung nach AAV 13b (1.1 Äq. *mono*-Boc-1,5-Diaminopentan**n*TosOH), AAV 11a bei 0 °C in 5 h, HPLC-Reinigung (B, 15-45 % in 30 min) und Lyophilisieren ergab das TFA-Salz von 3-{N-[N'-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-[4-(pentamethyldiamino-Ahx₃-carbonyl)-phenyl]-propionsäure (25.7 mg, 26 %) als weißen Feststoff.

$C_{42}H_{65}N_{11}O_8$ *TFA: 852.03*228.05 g/mol

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 12.34 (br. s, 1H, COOH), 10.21 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 9.82 (br. s, 1H, NH-^{Ar}C), 8.15 (s, 1H, NH-NH-CO-NH), 8.03 (s, 1H, ^{Ar}C-CO-NH-CH₂), 7.80-7.73 (m, 3H, ^{Ar}C⁶-H, ^{Phe}C^{2,6}-H), 7.72-7.67 (m, 4H, ^{Ar}C^{2,5}-H, ^{Phe}C^{3,5}-H), 7.50-7.45 (m, 5H, ^{Ar}C⁴-H, ^{Gua}N₂H₄), 7.11 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, NH-CH), 7.05 (d, *J* = 7.9 Hz, 3H, CO-NH-(CH₂)₅), 5.10-5.06 (m, 1H, NH-CH), 3.22 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H, CO-NH-CH₂-(CH₂)₄), 2.98 (q, *J* = 6.1 Hz, 6H, NH-CH₂-(CH₂)₄), 2.81-2.71 (m, 2H, NH-CH-CH₂), 2.68-2.64 (m, 2H, (CH₂)₄-CH₂-NH₂), 2.13 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, (CH₂)₄-CH₂-CO), 2.03 (t, *J* = 7.8 Hz, 4H, (CH₂)₄-CH₂-CO), 1.51-1.19 (m, 24H, CH₂-(CH₂)₃-CH₂); **HPLC** (10-90 % in 30 min) *R*_t = 9.3 min; **ESI-MS** *m/z* 890.4 [M+K]⁺, 874.5 [M+Na]⁺, 852.5 [M+H]⁺, 446.0 [(M+H+K)/2]²⁺, 427.1 [(M+2H)/2]²⁺.

2-Guanidinoethanoyl-Gly-Lys-OH

203 mg TCP-Harz wurden nach AAV1 mit Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (0.24 mmol) belegt. Die Umsetzung des belegten Harzes (0.63 mmol/g) nach AAV 5, 6 28, 9a und Lyophilisieren ergab das TFA-Salz von 2-Guanidinoethanoyl-Gly-Lys-OH (40.5 mg, 43 %) als farblosen Feststoff.

$C_{11}H_{22}N_6O_4 \cdot TFA$: 302.33*228.05 g/mol

HPLC (10-90 % in 30 min) R_t (Boc-geschützt) = 20.4 min; **ESI-MS** m/z 1231.4 [4M+K]⁺, 1247.4 [4M+Na]⁺, 1209.2 [4M+H]⁺, 983.4 [3M-H+2K]⁺, 967.3 [3M-H+Na+K]⁺, 951.2 [3M-H+2Na]⁺, 945.3 [3M+K]⁺, 929.4 [3M+Na]⁺, 907.2 [3M+H]⁺, 643.3 [2M+K]⁺, 627.3 [2M+Na]⁺, 605.3 [2M+H]⁺, 341.3 [M+K]⁺, 325.3 [M+Na]⁺, 303.2 [M+H]⁺, 286.3 [M-OH+H]⁺.

10 ANHANG

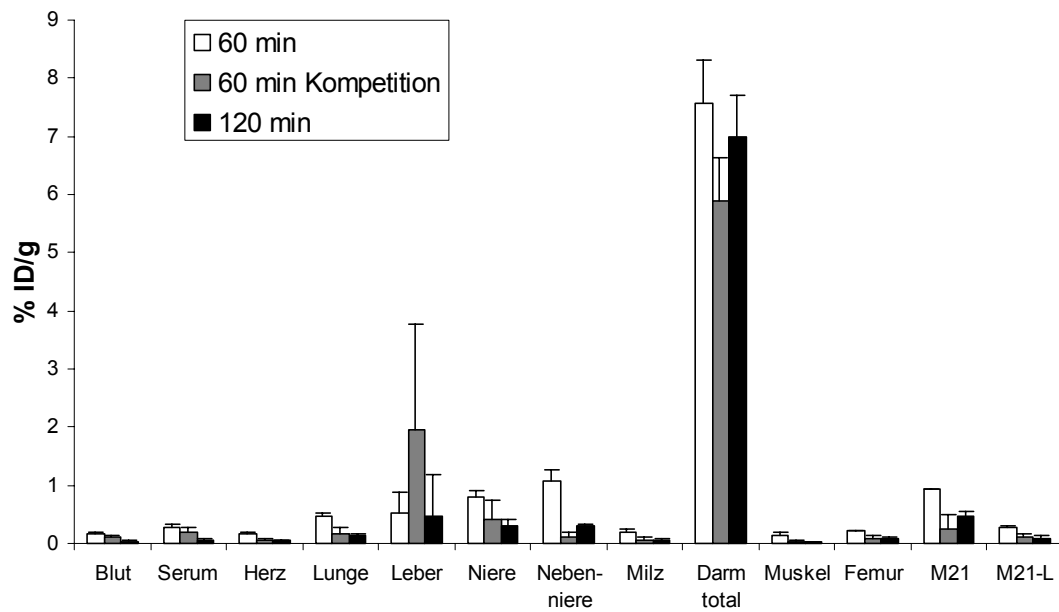


Abb. 10.1: Biodistribution des Monomers $M3^{18}F$.

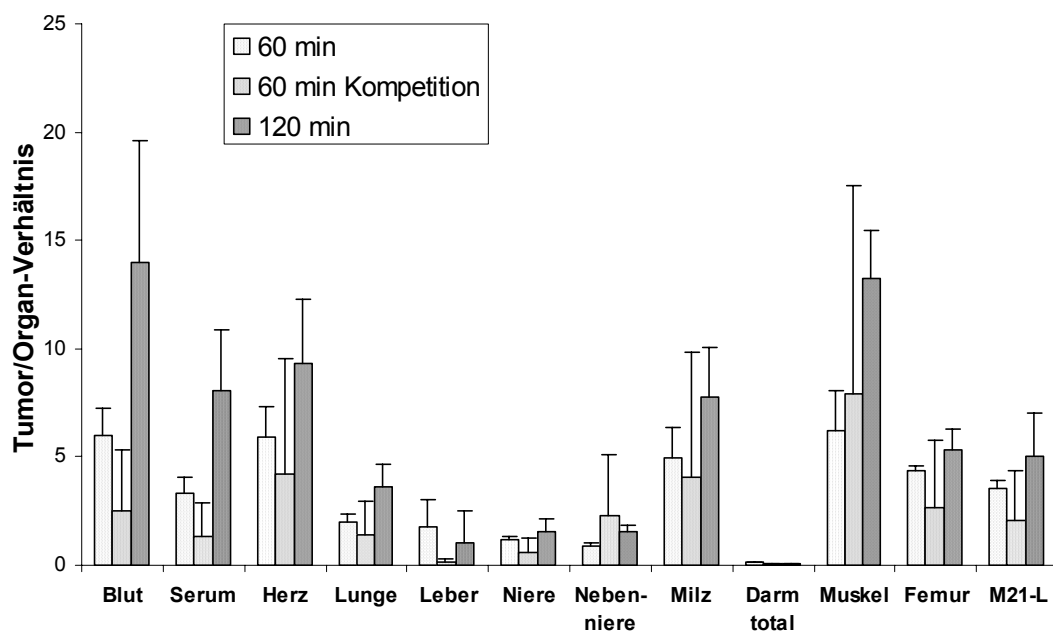


Abb. 10.2: Tumor/Organ-Verhältnisse des Monomers $M3^{18}F$.

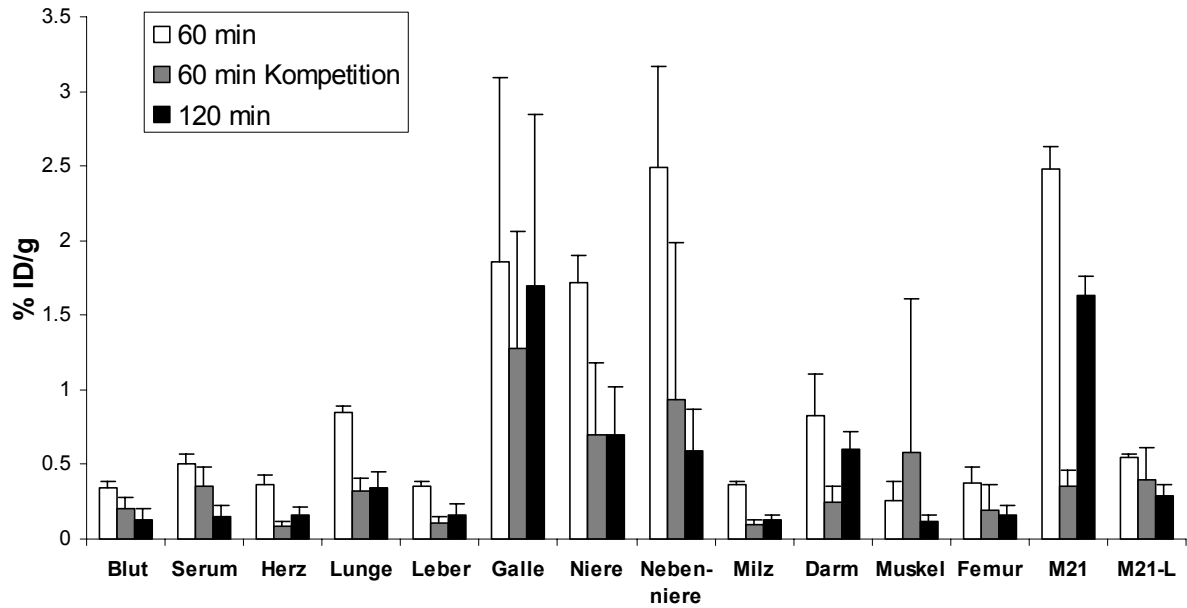


Abb. 10.3: Biodistribution des Dimers $D2^{18}F$.

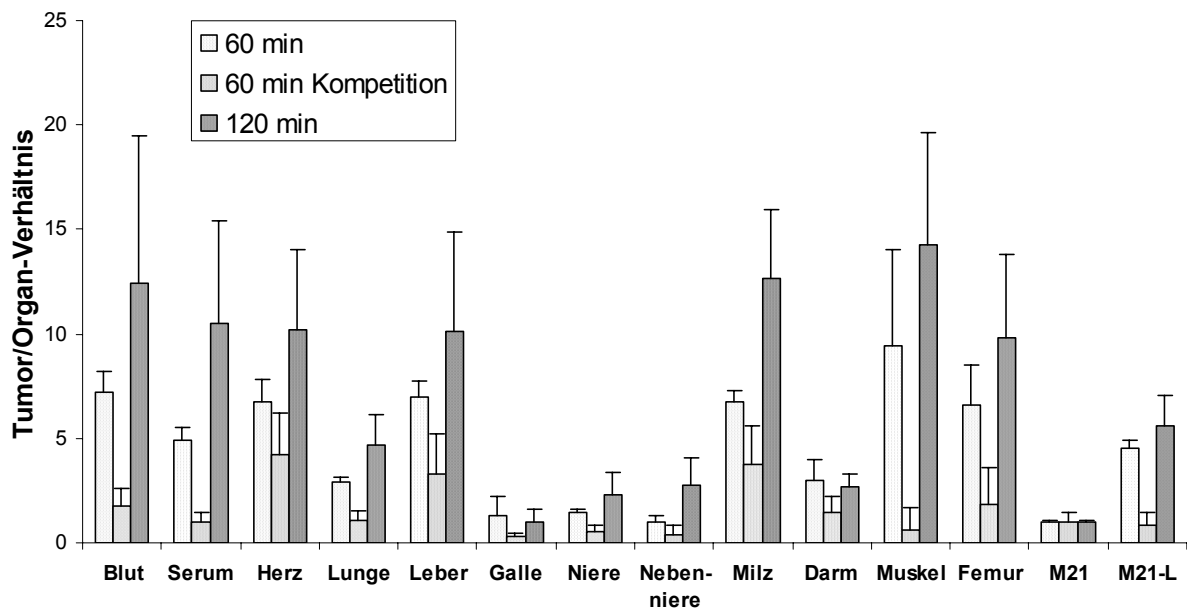


Abb. 10.4: Tumor/Organ-Verhältnisse des Dimers $D2^{18}F$.

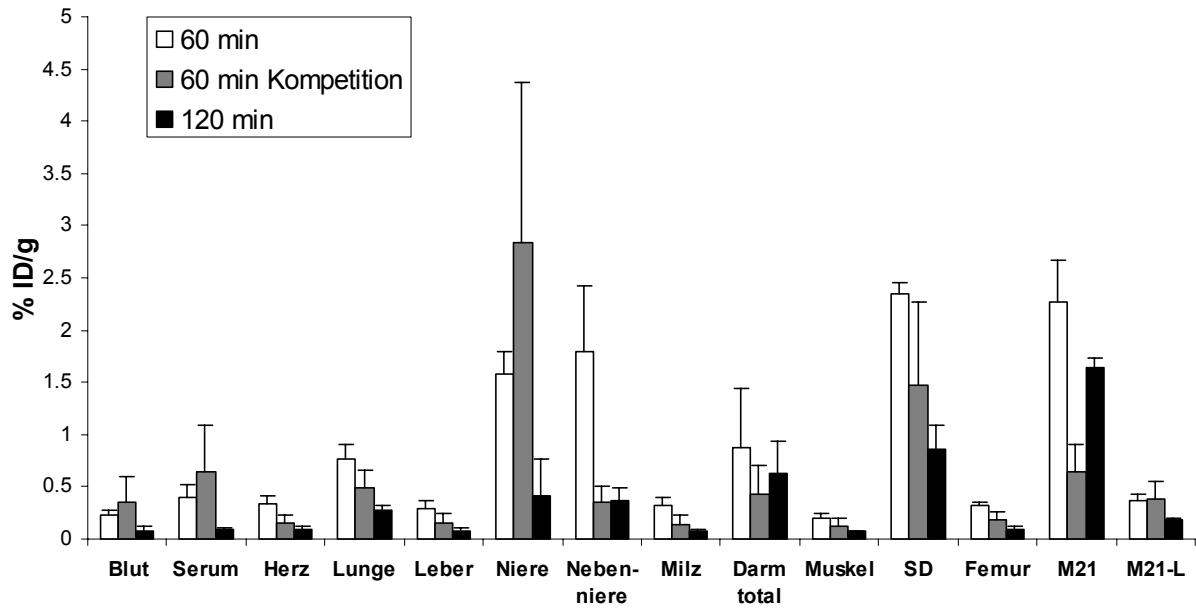


Abb. 10.5: Biodistribution des Tetramers $T2^{18}F$.

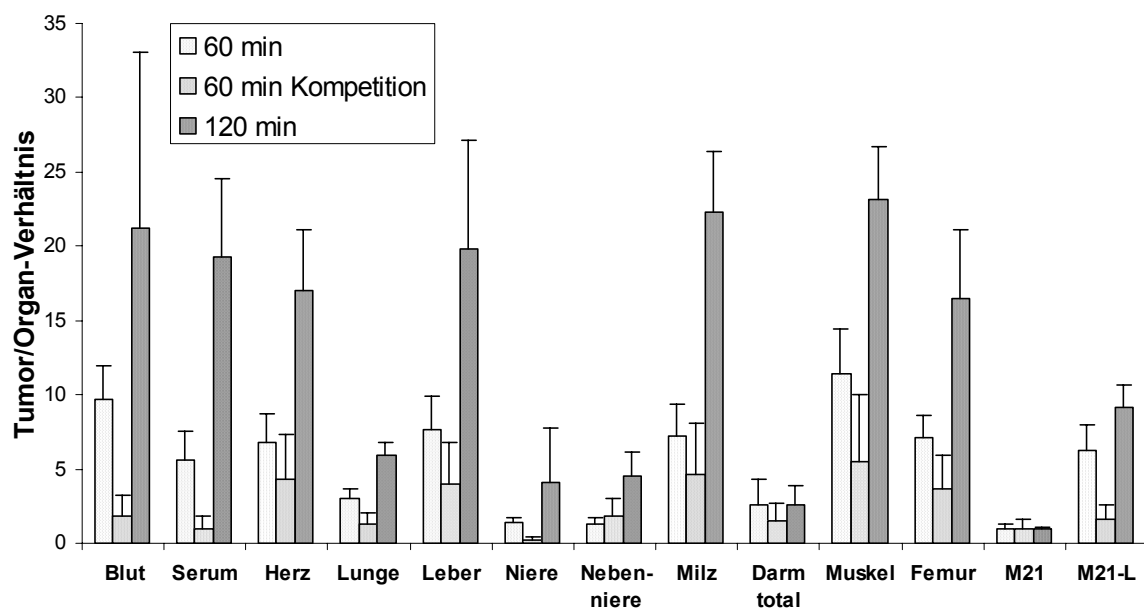


Abb. 10.6: Tumor/Organ-Verhältnisse des Tetramers $T2^{18}F$.

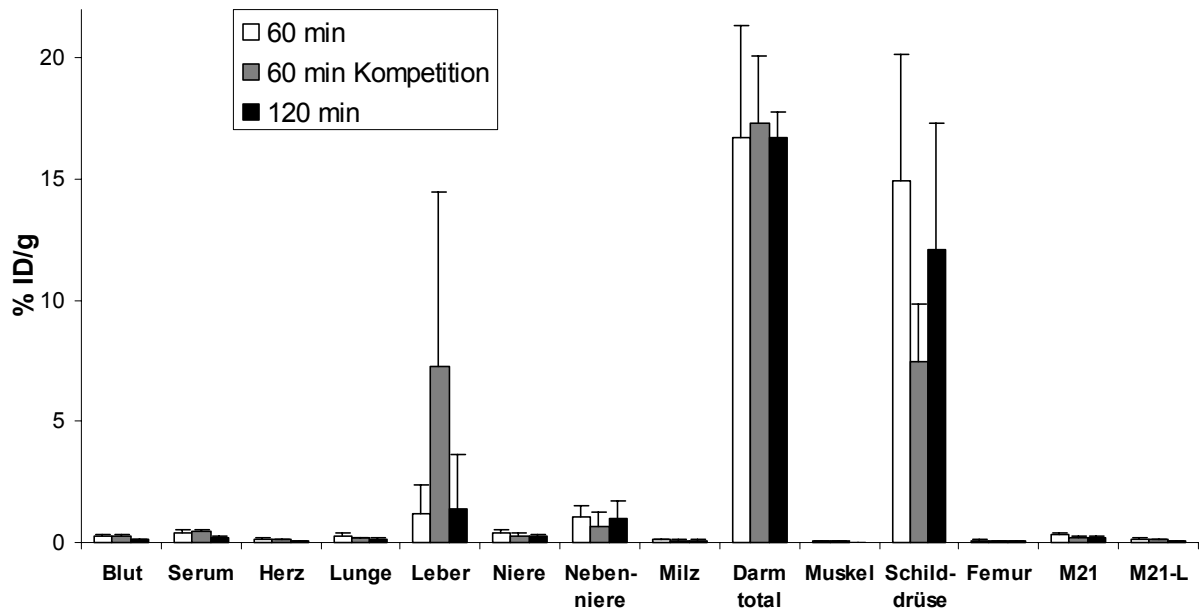


Abb. 10.7: Biodistribution des Monomers $M3^{125}I$.

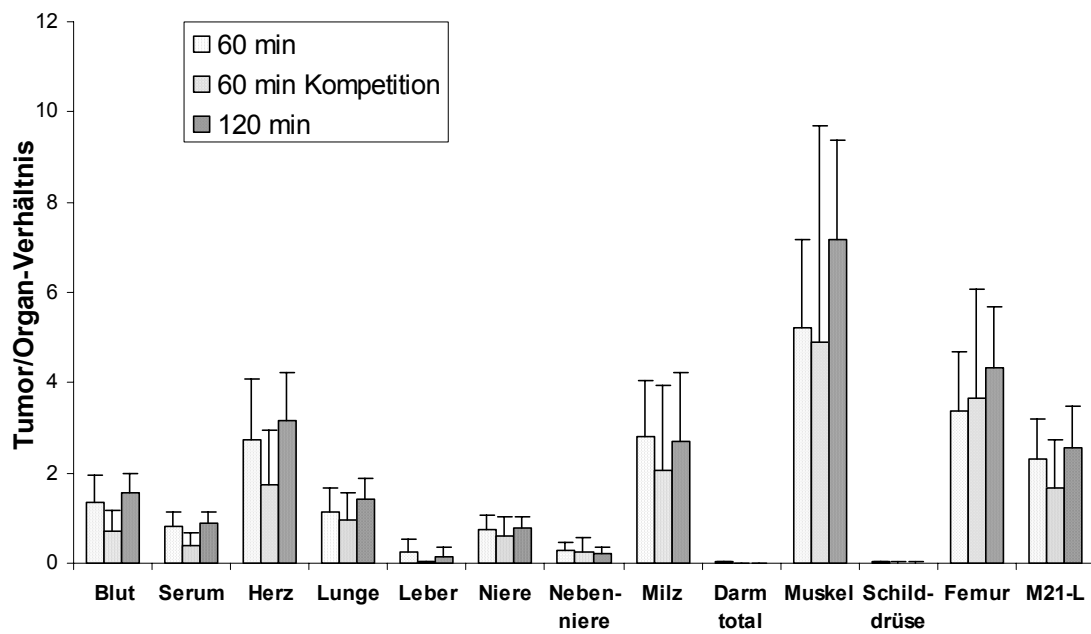


Abb. 10.8: Tumor/Organ-Verhältnisse des Monomers $M3^{125}I$.

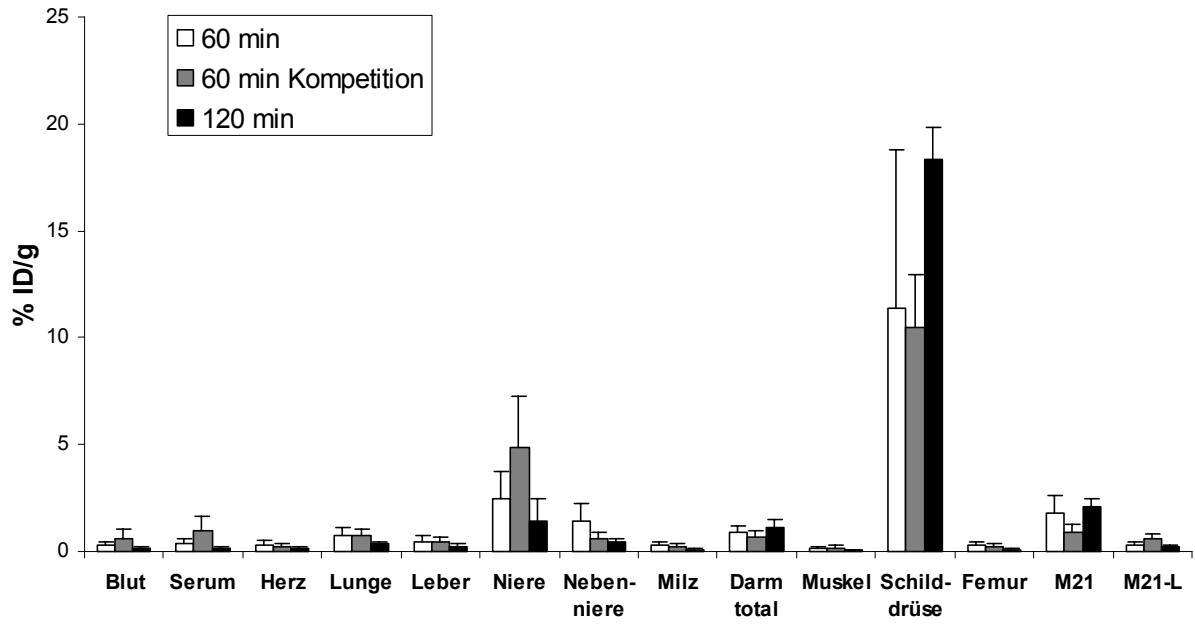


Abb. 10.9: Biodistribution des Tetramers $T2^{125}I$.

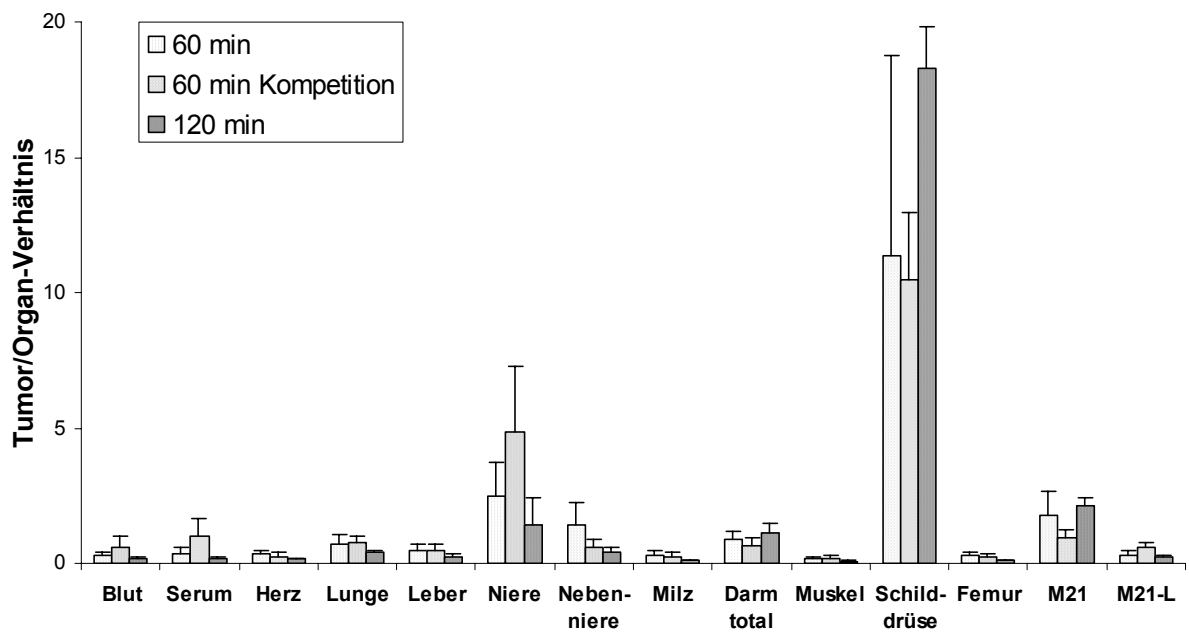


Abb. 10.10: Tumor/Organ-Verhältnisse des Tetramers $T2^{125}I$.

Tab. 10.1: *Inhibierungsverhalten der nicht radioaktiven Konjugate im isolierten Rezeptorassay. Der IC_{50} -Wert wird erst ab einer Inhibierung von 50 % bei einer Peptidkonzentration von 100 nM austitriert und ansonsten in Prozent der Inhibierung bei entsprechender Peptidkonzentration angegeben.*

Peptid	Integrin, IC_{50} [nM]			
	$\alpha v \beta 3$	$\alpha v \beta 5$	$\alpha v \beta 6$	$\alpha IIb \beta 3$
C^G	24	10^4 , 72 %	10^3 , 45 %	10^4 , 48 %
C^A	10^4 , 68 %	10^4 , 11 %	10^4 , 0 %	10^4 , 1 %
M1I	10	10^3 , 42 %	10^3 , 81 %	10^4 , 47 %
M2I	10	10^3 , 32 %	10^3 , 94 %	10^4 , 68 %
M3I	20	10^3 , 58 %	10^3 , 82 %	10^4 , 48 %
M4I	7	10^3 , 53 %	10^3 , 67 %	10^4 , 65 %
D1I	0.9	52	18	1400
D2I	3	210	59	3000
D3F	3.3	10^4 , 94 %	10^3 , 67 %	10^4 , 51 %
D4F	10^4 , 1 %	10^4 , 1 %	10^4 , 0 %	10^4 , 2 %
T1I	0.35	91	15	520
T1F	0.3	10^3 , 88 %	29	10^3 , 50 %
T2I	0.2	580	68	1800
T3F	0.41	10^3 , 66 %	10^3 , 88 %	10^4 , 85 %
T4F	0.75	10^3 , 61 %	10^3 , 84 %	10^4 , 82 %
O1F	0.21	10^3 , 78 %	47	10^3 , 51 %
O2F	0.12	10^3 , 75 %	32	10^4 , 95 %
dF	12	10^4 , 92 %	10^3 , 71 %	10^4 , 50 %
t1F	21	10^4 , 87 %	10^3 , 52 %	10^4 , 66 %
t2F	25	10^4 , 80 %	10^3 , 48 %	10^4 , 45 %

Tab. 10.2: *Inhibierungsverhalten einiger RGD-Mimetika im isolierten Rezeptorassay. Der IC_{50} -Wert wird erst ab einer Inhibierung von 50 % bei einer Peptidkonzentration von 100 nM austitriert und ansonsten in Prozent der Inhibierung bei entsprechender Peptidkonzentration angegeben.*

Verb.	Integrin [nM-Konz., % Inhibierung]			
	$\alpha v \beta 3$	$\alpha v \beta 5$	$\alpha v \beta 6$	$\alpha IIb \beta 3$
68a	10^3 , 62 %	10^4 , 24 %	10^4 , 93 %	10^4 , 7 %
68b	10^4 , 6 %	10^4 , 0 %	10^4 , 10 %	10^4 , 70 %
84	10^4 , 24 %	10^4 , 19 %	10^4 , 1 %	10^4 , 6 %
85	6500	10^4 , 5 %	10^4 , 58 %	10^4 , 8 %
89	10^4 , 18 %	10^4 , 3 %	10^4 , 2 %	10^3 , 58 %
91a	10^4 , 23 %	10^4 , 0 %	10^3 , 2 %	10^4 , 6 %
91b	10^4 , 68 %	10^4 , 11 %	10^4 , 0 %	10^4 , 1 %
92	4100	10^2 , 28 %	10^4 , 32 %	10^4 , 48 %
93	470	10^3 , 55 %	10^3 , 55 %	10^4 , 93 %
106	10^4 , 59 %	10^4 , 1 %	10^4 , 22 %	10^4 , 8 %

11 LITERATUR

- [1] W. A. Weber, N. Avril, M. Schwaiger, *Strahlenther. Onkol.* **1999**, *175*, 356-373.
- [2] M. E. Phelps, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 9226-9233.
- [3] R. Haubner, H.-J. Wester, W. A. Weber, M. Schwaiger, *Q. J. Nucl. Med.* **2003**, *47*, 189-199.
- [4] J. Folkman, Y. Shing, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10931-10934.
- [5] G. Ranieri, G. Gasparini, *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* **2001**, *1*, 241-534.
- [6] M. Cristofanilli, C. Charnsangavej, G. N. Hortobagyi, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 415-426.
- [7] L. A. Liotta, P. S. Steeg, W. G. Stetler-Stevenson, *Cell* **1991**, *64*, 327-336.
- [8] J. Samanen, Z. Jonak, D. Rieman, T. L. Yue, *Curr. Pharm. Des.* **1997**, *3*, 545-584.
- [9] B. Felding-Habermann, B. M. Mueller, C. A. Romerdahl, D. A. Cheresch, *J. Clin. Invest.* **1992**, *89*, 2018-2022.
- [10] J. S. Kerr, A. M. Slee, S. A. Mousa, *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 1271-1279.
- [11] E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697-715.
- [12] R. Haubner, H.-J. Wester, F. Burkhardt, R. Senekowitsch-Schmidtke, W. Weber, S. L. Goodman, H. Kessler, M. Schwaiger, *J. Nucl. Med.* **2001**, *42*, 326-336.
- [13] 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*, 716-731.
- [14] 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*, 1583-1591.
- [15] H. Lundqvist, V. Tolmachev, *Biopolymers* **2002**, *66*, 381-392.
- [16] M. Zhao, M. F. Kircher, L. Joephson, R. Weissleder, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 840-844.
- [17] G. A. G. Sulyok, C. Gibson, S. L. Goodman, G. Hölzemann, M. Wiesner, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1938-1950.
- [18] G. A. G. Sulyok, *Dissertation*, Technische Universität München (München), **2001**.
- [19] S. L. Goodman, G. Hölzemann, G. A. G. Sulyok, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1045-1051.
- [20] J. S. Kerr, A. M. Slee, S. A. Mousa, *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2002**, *11*, 1765-1774.
- [21] G. Hölzemann, *IDrugs* **2001**, *4*, 72-81.
- [22] M. E. Duggan, J. H. Hutchinson, *Exp. Opin. Ther. Patents* **2000**, *10*, 1367-1383.
- [23] G. D. Hartman, M. E. Duggan, *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 1281-1291.
- [24] A. T. Fazleabas, J. J. Kim, *Science* **2003**, *299*, 355-356.
- [25] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science* **1987**, *238*, 491-497.
- [26] S. M. Albelda, C. A. Buck, *FASEB J.* **1990**, *4*, 2868-2880.
- [27] J. Travis, *Science* **1993**, *260*, 906-908.
- [28] H. Kikkawa, M. Kaihou, N. Horaguchi, T. Uchida, H. Imafuku, A. Takiguchi, Y. Yamazaki, C. Koike, R. Kuruto, T. Kakiuchi, H. Tsukada, Y. Takada, N. Matsuura, N. Oku, *Clin. Exp. Metastasis* **2002**, *19*, 717-725.
- [29] E. Noiri, J. Gailit, D. Sheth, H. Magazine, M. Gurrath, G. Muller, H. Kessler, M. S. Goligorsky, *Kidney Int.* **1994**, *46*, 1050-1058.
- [30] D. C. Levin, J. T. Fallon, *Circulation* **1982**, *66*, 316-320.
- [31] M. J. Davies, A. C. Thomas, *Br. Heart J.* **1985**, *53*, 363-373.

- [32] F. E. Ali, J. M. Samanen, R. J. Shebuski, 0 341 915 A2, **1989**
- [33] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, **1992**.
- [34] R. J. Gould, *Perspect. Drug Discov. Des.* **1994**, *1*, 537-548.
- [35] N. S. Cook, G. Kottirsch, H.-G. Zerwes, *Drugs of the Future* **1994**, *19*, 135-159.
- [36] M. A. Horton, M. L. Taylor, T. R. Arnett, M. H. Helfrich, *Exp. Cell Res.* **1991**, *195*, 368-375.
- [37] D. T. Denhardt, X. Guo, *FASEB J.* **1993**, *7*, 1475-1482.
- [38] M. Grano, P. Zigrino, S. Colucci, G. Zambonin, L. Trusolino, M. Serra, N. Baldini, A. Teti, P. C. Marchisio, A. Z. Zallone, *Exp. Cell Res.* **1994**, *212*, 209-218.
- [39] M. Chorev, R. Dresnerpollack, Y. Eshel, M. Rosenblatt, *Biopolymers* **1995**, *37*, 367-375.
- [40] G. C. Brown, R. H. Brown, M. M. Brown, *Int. Ophthalmol.* **1987**, *11*, 41-50.
- [41] C. M. Storgard, D. G. Stupack, A. Jonczyk, S. L. Goodman, R. I. Fox, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 47-54.
- [42] M. A. Molitoris, J. Marrs, *Am. J. Med* **1999**, *106*, 583-592.
- [43] D. A. Hamerski, S. A. Santoro, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **1999**, *8*, 9-14.
- [44] M. S. Goligorsky, H. Kessler, V. I. Riomanov, *Nephrol. Dial. Transplant.* **1998**, *13*, 254-263.
- [45] M. Takeichi, *Science* **1991**, *251*, 1451-1455.
- [46] B. Geiger, O. Ayalon, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1992**, *8*, 307-332.
- [47] L. Shapiro, A. M. Fannon, P. D. Kwong, A. Thompson, M. S. Lehmann, G. Grubel, J. F. Legrand, J. Als-Nielsen, D. R. Colman, W. A. Hendrickson, *Nature* **1995**, *374*, 332-337.
- [48] A. F. Williams, A. N. Barclay, *Annu. Rev. Immunol.* **1988**, *6*, 382-405.
- [49] T. Hunkapiller, L. Hood, *Adv. Immunol.* **1989**, *44*, 1-63.
- [50] L. A. Lasky, *J. Cell. Biochem.* **1991**, *45*, 139-146.
- [51] L. A. Lasky, *Science* **1992**, *258*, 964-969.
- [52] R. O. Hynes, *Cell* **1987**, *48*, 549-554.
- [53] R. O. Hynes, *Cell* **1992**, *69*, 11-25.
- [54] S. K. Akiyama, K. Nagata, K. M. Yamada, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1031*, 91-110.
- [55] J. A. Eble, in *Integrin-Ligand Interaction* (Hrsg.: J. A. Eble, K. Kühn), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, S. 1-40.
- [56] K. E. Gottschalk, R. Günther, H. Kessler, *Chembiochem* **2002**, *5*, 470-473.
- [57] K.-E. Gottschalk, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3767-3774.
- [58] C. H. Damsky, M. Bernfield, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1990**, *2*, 813-814.
- [59] W. A. Clark, J. S. Brugge, *Science* **1995**, *268*, 233-239.
- [60] F. G. Giancotti, E. Ruoslahti, *Science* **1999**, *285*, 1028-1032.
- [61] A. Howe, A. E. Aplin, S. K. Alahari, R. L. Juliano, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *10*, 220-231.
- [62] R. O. Hynes, *Cell* **2002**, *110*, 673-687.
- [63] K. M. Yamada, B. Geiger, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 76-85.
- [64] M. A. Arnaout, S. L. Goodman, J. P. Xiong, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 641-651.
- [65] S. Dedhar, *Curr. Opin. Hematol.* **1999**, *6*, 37-43.
- [66] D. J. Irvine, K.-A. Hue, A. M. Mayes, L. G. Griffith, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 120-132.
- [67] A. Zanetti, G. Conforti, S. Hess, I. Martin-Padura, E. Ghibaudi, K. T. Preissner, E. Dejana, *Blood* **1994**, *84*, 1116-1123.
- [68] T. Hato, N. Pampori, S. J. Shattil, *J. Cell Biol.* **1998**, *141*, 1685-1695.
- [69] N. Tawil, P. Wilson, S. Carbonetto, *J. Cell Biol.* **1993**, *120*, 261-271.

- [70] B. B. Whitlock, S. Gardai, V. Fadok, D. Bratton, P. M. Henson, *J. Cell Biol.* **2000**, *151*, 1305-1320.
- [71] M. J. Humphries, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 311-340.
- [72] V. W. Englemann, M. S. Kellogg, T. E. Rogers, *Ann. Rep. Med. Chem.* **1996**, 191-200.
- [73] C. M. Isacke, M. A. Horton, in *The Adhesion Molecule FactsBook*, ed. 2, Academic Press, San Diego, **2000**, S. 149-211.
- [74] M. Pfaff, in *Integrin-Ligand Interaction* (Hrsg.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, S. 101-121.
- [75] T. A. Springer, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 802-813.
- [76] J. Bella, H. M. Berman, *Structure* **2000**, *8*, R121-R126.
- [77] J.-O. Lee, P. Rieu, M. A. Arnaout, R. C. Liddington, *Cell* **1995**, *80*, 631-638.
- [78] S. Suzuki, Y. Naitho, *EMBO J.* **1990**, *9*, 757-763.
- [79] J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2002**, *296*, 151-155.
- [80] B. P. Feuston, J. C. Culberson, M. E. Duggan, G. D. Hartman, C.-T. Leu, S. B. Rodan, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5640-5648.
- [81] D. J. Rees, E. S. Ades, S. J. Singer, R. O. Hynes, *Nature* **1990**, *347*, 685-689.
- [82] A. P. Gilmore, K. Burridge, *Nature* **1995**, *373*, 197.
- [83] R. P. Johnson, S. W. Craig, *Nature* **1995**, *373*, 261-264.
- [84] C. A. Otey, F. M. Pavalko, K. Burridge, *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 721-729.
- [85] R. Briesewitz, M. R. Epstein, E. E. Marcantonio, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 2989-2996.
- [86] J. S. Bennett, M. A. Kolodziej, G. Vilaire, M. Poncz, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 3580-3585.
- [87] N. Dana, D. M. Fathallah, M. A. Arnaout, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 3106-3110.
- [88] C. A. Buck, A. F. Horwitz, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1987**, *3*, 179-205.
- [89] D. Cox, T. Aoki, J. Seki, Y. Motoyama, K. Yoshida, *Med. Res. Rev.* **1994**, *14*, 195-228.
- [90] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Cell* **1986**, *44*, 517-518.
- [91] T. A. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 65-72.
- [92] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50-54.
- [93] M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911-921.
- [94] G. Müller, M. Gurrath, H. Kessler, R. Timpl, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 326-328.
- [95] M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. T. J. Engel, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20233-20238.
- [96] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461-7472.
- [97] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *109*, 1440-1456.
- [98] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385-4415.
- [99] J.-P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2001**, *294*, 339-345.
- [100] R. K. Sinha, R. S. Tuan, *Bone* **1996**, *18*, 451-457.
- [101] F. Balzac, A. M. Belkin, V. E. Kotliansky, Y. V. Balabanov, F. Altruda, L. Silengo, G. Tarone, *J. Cell Biol.* **1993**, *121*, 171-178.
- [102] K. Venstrom, L. Reichardt, *Mol. Biol. Cell* **1995**, *6*, 419-431.
- [103] J. M. Breuss, N. Gillett, L. Lu, D. Sheppard, R. Pytela, *J. Histochem. Cytochem.* **1993**, *41*, 1521-1527.

- [104] M. Agrez, A. Chen, R. I. Cone, R. Pytela, D. Sheppard, *J. Cell Biol.* **1994**, *127*, 547-556.
- [105] V. L. Gates, J. E. Carey, J. A. Siegel, M. S. Kaminski, R. L. Wahl, *J. Nucl. Med.* **1998**, *39*, 1230-1236.
- [106] P. Ertl, B. Rohde, P. Selzer, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3714-3717.
- [107] R. Lahana, *Drug Discov. Today* **1999**, *4*, 447-448.
- [108] I. F. Tannock, D. Rotin, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4373-4384.
- [109] C. Hansch, P. P. Maloney, T. Fujita, R. M. Muir, *Nature* **1962**, *194*, 178-180.
- [110] O. H. Chan, B. H. Stewart, *Drug Discov. Today* **1996**, *1*, 461-473.
- [111] H. Le Breton, E. F. Plow, E. J. Topol, *J. Am. Coll. Cardiol.* **1996**, *28*, 1643-1651.
- [112] S. A. Mousa, *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 190-199.
- [113] P. A. D'Amore, R. W. Thompson, *Annu. Rev. Physiol.* **1987**, *49*, 453-464.
- [114] J. Folkman, *Nat. Med.* **1995**, *1*, 27-31.
- [115] B. Felding-Habermann, E. Fransvea, T. E. O'Toole, L. Manzuk, B. Faha, M. Hensler, *Clin. Exp. Metastasis* **2002**, *19*, 427-436.
- [116] C. L. Gladson, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1991**, *88*, 1924-1932.
- [117] J. F. Marshall, S. A. Nesbitt, M. H. Helfrich, M. A. Horton, K. Polakova, I. R. Hart, *Int. J. Cancer* **1991**, *49*, 924-931.
- [118] R. M. Lafrenie, S. Gallo, T. J. Podor, M. R. Buchanan, F. W. Orr, *Eur. J. Cancer* **1994**, *14*, 2151-2218.
- [119] J. I. Jones, M. E. Doerr, D. R. Clemmons, *Prog. Growth Factor Res.* **1995**, *6*, 319-327.
- [120] H. Rabb, E. Barroso-Vicens, R. Adams, J. Pow-Sang, G. Ramirez, *Am. J. Nephrol.* **1996**, *16*, 402-408.
- [121] A. M. Montgomery, R. A. Reisfeld, D. A. Cheresh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 8856-8860.
- [122] R. E. B. Seftor, E. A. Seftor, K. R. Gehlsen, W. G. Stetler-Stevenson, P. D. Brown, E. Ruoslahti, M. J. C. Hendrix, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 1557-1561.
- [123] J. Nip, P. Brodt, *Cancer Metastasis Rev.* **1995**, *14*, 241-252.
- [124] J. Folkman, M. Klagsbrun, *Science* **1987**, *235*, 442-447.
- [125] S. Aznavoorian, M. L. Stracke, J. Parsons, J. McClanahan, L. A. Liotta, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3247-3254.
- [126] P. C. Brooks, R. A. Clark, D. A. Cheresh, *Science* **1994**, *264*, 569-571.
- [127] L. Capro, in *Hormone - Die chemischen Boten des Körpers*, Spektrum der Wissenschaften, Heidelberg, **1985**, S. 129-140.
- [128] H. W. Minne, *Pharm. in uns. Zeit* **1991**, *20*, 109-114.
- [129] D. M. Burns, J. M. Forstrom, K. E. Friday, G. A. Howard, B. A. Roos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 9519-9523.
- [130] M. A. Horton, *Bone* **1995**, *17*, 51S-53S.
- [131] D. Goltzman, *Nature Rev.* **2002**, *1*, 784-796.
- [132] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30-33.
- [133] W. H. Miller, D. P. Alberts, P. K. Bhatnagar, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 22-26.
- [134] A. M. Badger, S. Blake, R. Kapadia, S. Sarkar, J. Levin, B. A. Swift, S. J. Hoffman, G. B. Stroup, W. H. Miller, M. Gowen, M. W. Lark, *Arthritis. Rheum.* **2001**, *44*, 128-137.
- [135] R. Haubner, *Dissertation*, Technische Universität München (Garching), **1995**.
- [136] L. Marinelli, A. Lavecchia, K. E. Gottschalk, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4393-4404.
- [137] P. C. Brooks, A. M. P. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. H. Hu, G. Klier, D. A. Cheresh, *Cell* **1994**, *79*, 1157-1164.
- [138] R. O. Hynes, *Nat. Med.* **2002**, *8*, 918-921.

- [139] M. J. Humphries, P. A. McEwan, S. J. Barton, P. A. Buckley, J. Bella, A. P. Mould, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 313-320.
- [140] M. W. Lark, G. B. Stroup, R. A. Dodds, R. Kapadia, S. J. Hoffman, S. M. Hwang, I. E. James, B. Lechowska, X. Liang, D. J. Rieman, K. L. Salyers, K. Ward, B. R. Smith, W. H. Miller, W. F. Huffman, M. Gowen, *J. Bone Miner. Res.* **2001**, *16*, 319-327.
- [141] G. Shankar, T. R. Gadek, D. J. Burdick, I. Davison, W. T. Mason, M. A. Horton, *Exp. Cell Res.* **1995**, *219*, 364-371.
- [142] J. E. Fisher, M. P. Caulfield, M. Sato, H. A. Quartuccio, R. J. Gould, V. M. Garsky, G. A. Rodan, M. Rosenblatt, *Endocrinology* **1993**, *132*, 1411-1413.
- [143] M. W. Lark, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *291*, 612-617.
- [144] M. Kantlehner, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 587-590.
- [145] M. Kantlehner, P. Schaffner, D. Finsinger, J. Meyer, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, G. Hölzemann, S. L. Goodman, H. Kessler, *Chembiochem* **2000**, *1*, 107-114.
- [146] Z. Schwartz, K. Kieswetter, D. D. Dean, B. D. Boyan, *J. Periodontal Res.* **1997**, *32*, 166-171.
- [147] G. W. Plant, S. Woerly, A. R. Harvey, *Exp. Neurol.* **1997**, *143*, 287-299.
- [148] H. J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign*, Spektrum Verlag, Heidelberg, **1996**.
- [149] R. B. Silverman, *Medizinische Chemie*, VCH, Weinheim, **1995**.
- [150] R. W. Spencer, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *61*, 61-67.
- [151] H. Kubinyi, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 665-668.
- [152] W. P. Walters, A. Murcko, M. A. Murcko, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *3*, 384-387.
- [153] G. A. Sawada, C. L. Barsuhn, B. S. Lutzke, M. E. Houghton, G. E. Padbury, N. F. H. Ho, T. J. Raub, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *288*, 1317-1326.
- [154] C. Hansch, T. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1616-1626.
- [155] A. K. Ghose, G. M. Crippen, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1987**, *27*, 21-35.
- [156] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
- [157] M. A. Navia, P. R. Chaturvedi, *Drug Discov. Today* **1996**, *1*, 179-189.
- [158] D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615-2623.
- [159] A. Albert, *Selective Toxicity*, Chapman & Hall, London, **1951**.
- [160] A. Albert, *Nature* **1958**, *182*, 421-423.
- [161] C. G. Wermut, in *Drug Metabolism and Drug Design: Quo Vadis?* (Hrsg.: M. von Briot, W. Caurels, R. Roncucci), Sanofi-Clin-Midi, Montpellier, **1983**, S. 253.
- [162] P. Worms, H. Depoortere, A. Durand, P. L. Morselli, K. G. Lloyd, G. Bartholini, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1982**, *220*, 660-671.
- [163] N. Bodor, M. E. Brewster, *Pharmacol. Ther.* **1983**, *19*, 337-386.
- [164] E. Pop, W. M. Wu, N. Bodor, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1789-1795.
- [165] F. Kratz, U. Beyer, M. T. Schutte, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **1999**, *16*, 245-288.
- [166] E. Jahde, M. F. Rajewsky, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 1505-1512.
- [167] A. J. Thistlethwaite, D. B. Leeper, D. J. Moylan, R. E. Nerlinger, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1985**, *11*, 1647-1652.
- [168] T. Volk, E. Jahde, H. P. Fortmeyer, K. H. Glusenkamp, M. F. Rajewsky, *B. J. Cancer* **1993**, *68*, 492-500.
- [169] L. E. Gerweck, K. Seetharaman, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 1194-1198.
- [170] P. W. Vaupel, *Klin. Padiat.* **1997**, *209*, 243-249.
- [171] M. Rudin, R. Weissleder, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 123-131.
- [172] R. Weissleder, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 11-18.

- [173] T. C. Meeker, J. Lowder, D. G. Maloney, R. A. Miller, K. Thielemans, R. Warnke, R. Levy, *Blood* **1985**, *65*, 1349-1363.
- [174] S. J. DeNardo, G. L. DeNardo, L. F. O'Grady, E. Hu, V. M. Sytsma, S. L. Mills, N. B. Levy, D. J. Macey, C. H. Miller, A. L. Epstein, *Int. J. Cancer Suppl.* **1988**, *3*, 96-101.
- [175] O. W. Press, J. F. Eary, F. R. Appelbaum, P. J. Martin, W. B. Nelp, S. Glenn, D. R. Fisher, B. Porter, D. C. Matthews, T. Gooley et al., *Lancet* **1995**, *346*, 336-340.
- [176] A. E. Frankel, D. FitzGerald, C. Siegall, O. W. Press, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 926-932.
- [177] G. A. Wiseman, C. A. White, T. E. Witzig, L. I. Gordon, C. Emmanouilides, A. Raubitschek, N. Janakiraman, J. Gutheil, R. J. Schilder, S. Spies, D. H. Silverman, A. J. Grillo-Lopez, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 3281s-3286s.
- [178] G. A. Wiseman, L. I. Gordon, P. S. Multani, T. E. Witzig, S. Spies, N. L. Bartlett, R. J. Schilder, J. L. Murray, M. Saleh, R. S. Allen, A. J. Grillo-Lopez, C. A. White, *Blood* **2002**, *99*, 4336-4342.
- [179] O. H. Aina, T. C. Sroka, M. L. Chen, K. S. Lam, *Biopolymers* **2002**, *66*, 184-199.
- [180] R. E. Weiner, M. L. Thakur, *Semin. Nucl. Med.* **2001**, *31*, 296-311.
- [181] R. E. Weiner, M. L. Thakur, *Appl. Radiat. Isot.* **2002**, *57*, 749-763.
- [182] L. O. Johansson, A. Bjornerud, H. K. Ahlstrom, D. L. Ladd, D. K. Fujii, *J. Magn. Reson. Imaging* **2001**, *13*, 615-618.
- [183] S. Aime, W. Dastru, S. G. Crich, E. Gianolio, V. Mainero, *Biopolymers* **2002**, *66*, 419-428.
- [184] V. Ntziachristos, C. H. Tung, C. Bremer, R. Weissleder, *Nat. Med.* **2002**, *8*, 757-760.
- [185] W. A. Weber, R. Haubner, E. Vabulienė, B. Kuhnast, H.-J. Wester, M. Schwaiger, *Q. J. Nucl. Med.* **2001**, *45*, 179-182.
- [186] S. Zitzmann, V. Ehemann, M. Schwab, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 5139-5143.
- [187] R. Weissleder, V. Ntziachristos, *Nat. Med.* **2003**, *9*, 123-128.
- [188] G. Audi, O. Bersillon, J. Blachot, A. H. Wapstra, *Nucl. Phys. A* **1995**, *624*, 1pp.
- [189] B. M. Tashtoush, A. A. Traboulsi, L. Dittert, A. A. Hussain, *Anal. Biochem.* **2001**, *288*, 16-21.
- [190] R. Haubner, H.-J. Wester, U. Reuning, R. Senekowitsch-Schmidtke, B. Diefenbach, H. Kessler, G. Stocklin, M. Schwaiger, *J. Nucl. Med.* **1999**, *40*, 1061-1071.
- [191] W. H. Oldendorf, *Am. J. Physiol.* **1973**, *224*, 967-969.
- [192] A. A. Wilson, R. F. Dannals, H. T. Ravert, J. J. Frost, H. N. Wagner Jr., *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1057-1062.
- [193] M. R. Zalutsky, M. A. Noska, E. V. Colapinto, P. K. Garg, D. D. Bigner, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 5543-5549.
- [194] G. Vaidyanathan, D. J. Affleck, J. Li, P. Welsh, M. R. Zalutsky, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 428-438.
- [195] A. J. Fischman, N. M. Alpert, R. H. Rubin, *Clin. Pharmacokinet.* **2002**, *41*, 581-602.
- [196] F. Brady, S. K. Luthra, G. D. Brown, S. Osman, E. Aboagye, A. Saleem, P. M. Price, *Curr. Pharm. Des.* **2001**, *7*, 1863-1892.
- [197] C. Halldin, B. Gulyas, L. Farde, *Curr. Pharm. Des.* **2001**, *7*, 1907-1929.
- [198] A. J. Fischman, A. A. Bonab, J. W. Babich, N. M. Alpert, S. L. Rauch, D. R. Elmaleh, T. M. Shoup, S. A. Williams, R. H. Rubin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *279*, 939-947.
- [199] E. O. Aboagye, S. K. Luthra, F. Brady, K. Poole, H. Anderson, T. Jones, A. Boobis, S. S. Burtles, *B. J. Cancer* **2002**, *86*, 1052-1056.
- [200] R. E. Gibson, H. D. Burns, T. G. Hamill, W. S. Eng, B. E. Francis, C. Ryan, *Curr. Pharm. Des.* **2000**, *6*, 973-989.
- [201] H.-J. Wester, K. Hamacher, G. Stöcklin, *Nucl. Med. Biol.* **1996**, *23*, 365-372.

- [202] E. Livni, A. J. Fischman, S. Ray, I. Sinclair, D. R. Elmaleh, N. M. Alpert, S. Weiss, J. A. Correia, D. Webb, R. Dahl, W. Robeson, D. Margouleff, R. Liss, H. W. Strauss, R. H. Rubin, *Nucl. Med. Biol.* **1992**, *19*, 191-199.
- [203] M. Ogawa, K. Hatano, S. Oishi, Y. Kawasumi, N. Fujii, M. Kawaguchi, R. Doi, M. Imamura, M. Yamamoto, K. Ajito, T. Mukai, H. Saji, K. Ito, *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30*, 1-9.
- [204] D. S. Wilbur, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 433-470.
- [205] R. Haubner, H.-J. Wester, W. A. Weber, C. Mang, S. I. Ziegler, S. L. Goodman, R. Senekowitsch-Schmidtke, H. Kessler, M. Schwaiger, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1781-1785.
- [206] R. Haubner, G. Thumshirn, W. A. Weber, M. Herz, W. Linke, C. Bodenstein, H.-J. Wester, H. Kessler, M. Schwaiger, *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *im Druck*.
- [207] G. Gasparini, P. C. Brooks, E. Biganzoli, P. B. Vermeulen, E. Bonoldi, L. Y. Doirix, G. Ranieri, R. Miceli, D. A. Cheresch, *Clin. Cancer Res.* **1998**, *4*, 2625-2634.
- [208] R. Haubner, *persönliche Mitteilung*, **2003**
- [209] R. Haubner, H.-J. Wester, W. A. Weber, W. Linke, C. Bodenstein, H. Kessler, e. al., *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **2001**, *44(Suppl)*, S157-S159.
- [210] R. Haubner, B. Kuhnast, H.-J. Wester, W. A. Weber, R. Huber, R. Senekowitsch-Schmidtke, S. I. Ziegler, S. L. Goodman, H. Kessler, M. Schwaiger, *J. Nucl. Med.* **2002**, *43(Suppl)*, 322.
- [211] M. Bock, F. Bruchertseifer, R. Haubner, R. Senekowitsch-Schmidtke, H. Kessler, M. Schwaiger, H.-J. Wester, *J. Nucl. Med.* **2000**, *41*, 41P.
- [212] R. Haubner, F. Bruchertseifer, M. Bock, H. Kessler, M. Schwaiger, H.-J. Wester, *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *eingereicht*.
- [213] P. M. Van Hagen, W. A. Breeman, H. F. Bernard, M. Schaar, C. M. Mooji, A. Srinivasan, M. A. Schmidt, E. P. Krenning, M. de Jong, *Int. J. Cancer* **2000**, *90*, 186-198.
- [214] Z. F. Su, G. Liu, S. Gupta, Z. Zhu, M. Rusckowski, D. J. Hnatowich, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 561-570.
- [215] M. Janssen, W. J. Oyen, L. F. Massuger, C. Frielink, I. Dijkgraaf, D. S. Edwards, M. Radjopadhye, F. H. Corstens, O. C. Boerman, *Cancer Biother. Radiopharm.* **2002**, *17*, 641-646.
- [216] M. L. Janssen, W. J. Oyen, I. Dijkgraaf, L. F. Massuger, C. Frielink, D. S. Edwards, M. Rajopadhye, H. Boonstra, F. H. Corstens, O. C. Boerman, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 6146-6151.
- [217] R. Haubner, G. A. G. Sulyok, W. Weber, W. Linke, C. Bodenstein, H.-J. Wester, H. Kessler, M. Schwaiger, *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, *28(Suppl)*, 1175.
- [218] G. B. Sivolapenko, D. Skarlos, D. Pectasides, E. Stathopoulou, A. Milonakis, G. Sirmalis, A. Stuttle, N. S. Courtenay-Luck, K. Konstantinides, A. A. Epenetos, *Eur. J. Nucl. Med.* **1998**, *25*, 1383-1389.
- [219] J. L. Fauchere, A. D. Morris, C. Thurieau, S. Simonet, T. J. Verbeuren, N. Kieffer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1993**, *42*, 440-444.
- [220] M. Bock, R. Haubner, R. Senekowitsch-Schmidtke, H. Kessler, G. Stöcklin, M. Schwaiger, H.-J. Wester, *Nucl. Med.* **1999**, *38 (Suppl)*, A44.
- [221] C. Bousquet, E. Puente, L. Buscail, N. Vasyse, C. Susini, *Chemotherapy* **2001**, *47*, 30-39.
- [222] S. Froidevaux, A. N. Eberle, *Biopolymers* **2002**, *66*, 161-183.
- [223] M. De Jong, P. M. Van Hagen, W. A. Breeman, H. F. Bernard, M. Schaar, A. Van Gameren, A. Srinivasan, M. Schmidt, J. E. Bugaj, E. P. Krenning, *J. Nucl. Med.* **2000**, *41(Suppl)*, 1030.

- [224] S. Liu, E. Cheung, M. C. Ziegler, M. Rajopadhye, D. S. Edwards, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 559-568.
- [225] S. Liu, D. S. Edwards, M. C. Ziegler, J. M. Harris, S. J. Hemingway, J. A. Barrett, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 624-629.
- [226] M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2755-2794.
- [227] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.
- [228] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 696-703.
- [229] L. L. Kiessling, N. L. Pohl, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 71-77.
- [230] H. Kessler, A. Schudok, M. Haupt, K. Ziegler, M. Frimmer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1988**, *32*, 183-193.
- [231] S. Borman, *Chem. Eng. News* **2000**, 48-53.
- [232] J. E. Gestwicki, L. L. Kiessling, *Nature* **2002**, *415*, 81-84.
- [233] J. R. Cochran, L. J. Stern, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 683-696.
- [234] E. K. Woller, M. J. Cloninger, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 7-10.
- [235] M. Kanai, K. H. Mortell, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9931-9932.
- [236] N. Horan, L. Yan, H. Isobe, G. M. Whitesides, D. Kahne, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 11782-11786.
- [237] G. Maheshwari, G. Brown, D. A. Lauffenburger, A. Wells, L. G. Griffith, *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 1677-1686.
- [238] J. R. Allen, C. R. Harris, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1890-1897.
- [239] C. W. Cairo, J. E. Gestwicki, M. Kanai, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1615-1619.
- [240] 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*, 271-278.
- [241] 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*, 5964-5974.
- [242] 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*, 3264-3269.
- [243] R. Duncan, F. Spreafico, *Clin. Pharmacokinet.* **1994**, *27*, 290-306.
- [244] C. Garcia-Echeverria, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8933-8934.
- [245] G. Barany, N. Kneib-Cordonier, D. G. Mullen, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, *30*, 705-739.
- [246] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161-214.
- [247] L. A. Carpino, D. Sadat-Aalae, H. G. Chao, R. H. DeSelms, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9651-9652.
- [248] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409.
- [249] J.-N. Bertho, A. Loffet, C. Pinel, F. Reuther, G. Sennyey, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1303-1306.
- [250] L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, M. Bienert, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 268-274.
- [251] J. M. Humphrey, A. R. Chamberlin, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243-2266.
- [252] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683.
- [253] L. P. Miranda, P. F. Alewood, *Biopolymers (Peptide Science)* **2000**, *55*, 217-226.
- [254] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 2559-2556.
- [255] N. A. Solé, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5399-5403.

- [256] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2739-2742.
- [257] M. Kurth, A. Pelegrin, K. Rose, R. E. Offord, S. Pochon, J. P. Mach, F. Buchegger, *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 1255-1261.
- [258] J. E. Ryser, R. M. L. Jones, R. Egeli, A. Pelegrin, K. Rose, A. M. Kurt, M. Perin, P. E. Broquet, P. Ambrosetti, I. Fisch, S. Pochon, A. Donath, J. P. Mach, R. E. Offord, *J. Nucl. Med.* **1992**, 33, 1766-1773.
- [259] F. Wahl, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6861-6864.
- [260] Y. M. Zhao, S. B. H. Kent, B. T. Chait, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, 94, 1629-1633.
- [261] D. Forget, D. Boturyn, E. Defrancq, J. Lhomme, P. Dumy, *Chem.-Eur. J.* **2001**, 7, 3976-3984.
- [262] E. Trevisiol, A. Renard, E. Defrancq, J. Lhomme, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8687-8690.
- [263] K. Sadler, J. P. Tam, *J. Biotechnol.* **2002**, 90, 195-229.
- [264] D. A. Tomalia, H. Baker, J. R. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polym. J.* **1985**, 17, 117-132.
- [265] G. R. Newkome, Z.-Q. Yao, G. R. Baker, V. K. Gupta, *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 2003-2004.
- [266] C. Hawker, J. M. J. Fréchet, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1010-1013.
- [267] M. Jayaraman, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12996-12997.
- [268] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, G. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927-1930.
- [269] E. Hoffmann, A. G. Beck-Sickinger, G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 585-590.
- [270] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 2024-2033.
- [271] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1973**, 106, 3626-3635.
- [272] S. F. Brady, S. L. Varda, R. M. Freidinger, D. A. Schwenk, M. Mendlowski, F. W. Holly, D. F. Veber, *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 3101-3105.
- [273] T. Shiori, K. Ninomiya, S.-I. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 90, 6203-6205.
- [274] J. M. Villalgordo, A. Linden, H. Heimgartner, *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 213-219.
- [275] J. M. Villalgordo, A. Enderli, A. Linden, H. Heimgartner, *Helv. Chim. Acta* **1995**, 78, 1983-1998.
- [276] E. Bellis, T. Markidis, G. Kokotos, *Synthesis* **2002**, 10, 1359-1364.
- [277] Y. Kim, F. W. Zeng, S. C. Zimmerman, *Chem.-Eur. J.* **1999**, 5, 2133-2138.
- [278] S. J. E. Mulders, A. J. Brouwer, P. G. J. van der Meer, M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 631-634.
- [279] U. Hersel, *Dissertation*, Technische Universität München (Garching), **2003**.
- [280] S. J. E. Mulders, A. J. Brouwer, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3085-3088.
- [281] S. R. Chhabra, B. Hothi, D. J. Evans, P. D. White, B. W. Bycroft, W. C. Chan, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1603-1606.
- [282] J. Katajisto, T. Karskela, P. Heinonen, H. Lonnberg, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 7995-8001.
- [283] D. N. Posnett, H. McGrath, J. P. Tam, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 1719-1725.
- [284] J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, 85, 5409-5413.
- [285] R. D. Glick, P. L. Toogood, D. C. Wiley, J. J. Skehel, J. R. Knowles, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 23660-23669.
- [286] P. Veprek, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **1999**, 5, 5-23.
- [287] P. Veprek, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **1999**, 5, 203-220.
- [288] B. W. Bycroft, W. C. Chan, S. R. Chhabra, N. D. Hone, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 778-779.

- [289] S. C. G. Biagini, S. E. Gibso, S. P. Keen, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, *16*, 2485-2499.
- [290] M. Mammen, E. I. Shakhnovich, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3168-3175.
- [291] G. Loidl, H. J. Musiol, M. Groll, R. Huber, L. Moroder, *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 36-46.
- [292] G. D. Glick, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4701-4703.
- [293] F. J. Dekker, N. J. de Mol, J. van Ameijde, M. J. E. Fischer, R. Ruijtenbeek, F. A. M. Redegeld, R. M. J. Liskamp, *Chembiochem* **2002**, *3*, 238-242.
- [294] J. Y. Wong, T. L. Kuhl, J. N. Israelachvili, N. Mullah, S. Zalipsky, *Science* **1997**, *275*, 820-822.
- [295] G. Thumshirn, U. Hersel, S. L. Goodman, H. Kessler, *Chem.-Eur. J.* **2003**, *9*, 2717-2725.
- [296] Y. Yoshida, Sakakura, Y., Aso, N., Okada, S., Tanabe, Y., *Tetrahedron* **1999**, *55*, 2183-2192.
- [297] M. Ito, K. Koyakumar, T. Ohta, H. Takaya, *Synthesis* **1995**, *4*, 376-378.
- [298] D. Boumrah, M. M. Campbell, S. Fenner, R. G. Kinsman, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6977-6992.
- [299] M. Kantlehner, *Dissertation*, Technische Universität München (Garching), **2000**.
- [300] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
- [301] L. E. Canne, A. R. Ferré-D'Amaré, S. K. Burley, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*.
- [302] G. Thumshirn, U. Hersel, T. Poethko, F. Rau, R. Haubner, M. Schwaiger, H.-J. Wester, H. Kessler, *Biopolymers* **2003**, *71*, P477.
- [303] T. Poethko, G. Thumshirn, U. Hersel, F. Rau, R. Haubner, M. Schwaiger, H. Kessler, H.-J. Wester, *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *im Druck*.
- [304] T. Poethko, M. Schottelius, G. Thumshirn, U. Hersel, M. Herz, G. Henriksen, H. Kessler, M. Schwaiger, H.-J. Wester, *J. Nucl. Med.* **2003**, *eingereicht*.
- [305] D. A. Cheresh, R. C. Spiro, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17703-17711.
- [306] A. J. Schraa, R. J. Kok, A. D. Berendsen, H. E. Moorlag, E. J. Bos, D. K. Meijer, L. F. de Leij, G. Molema, *J. Control. Release* **2002**, *83*, 241-251.
- [307] R. P. Harbottle, R. G. Cooper, S. L. Hart, A. Ladhoff, T. McKay, A. M. Knight, E. Wagner, A. D. Miller, C. Coutelle, *Hum. Gene Ther.* **1998**, *9*, 1037-1047.
- [308] S. Castel, R. Pagan, F. Mitjans, J. Piulats, S. Goodman, A. Jonczyk, F. Huber, S. Vilaro, M. Reina, *Lab. Invest.* **2001**, *81*, 1615-1626.
- [309] R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 347-360.
- [310] J. M. Harris, R. B. Chess, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 214-221.
- [311] R. B. Greenwald, J. Yang, H. Zhao, C. D. Conover, S. Lee, D. Filpula, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 395-403.
- [312] R. Duncan, S. Gac-Breton, R. Keane, R. Musila, Y. N. Sat, R. Satchi, F. Searle, *J. Control. Release* **2001**, *74*, 135-146.
- [313] R. B. Greenwald, A. Pendri, C. D. Conover, H. Zhao, Y. H. Choe, A. Martinez, K. Shum, S. Y. Guan, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3657-3667.
- [314] P. Bailon, W. Berthold, *Pharm. Sci. Technol. Today* **1998**, *1*, 352-356.
- [315] C. Gibson, *Dissertation*, Technische Universität München (Garching), **2000**.
- [316] C. Gibson, G. A. G. Sulyok, D. Hahn, S. L. Goodman, G. Hölzemann, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 169-173.
- [317] C. Dahmen, *Dissertation*, Technische Universität München (Garching), **2003**.
- [318] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639-1662.
- [319] G. M. Morris, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *AutoDock*, 3.0 beta ed., **1993**.
- [320] *SYBYL Molecular Modeling System*, TRIPOS Assoc., 6.9 ed., St. Louis, MO.

- [321] R. Haubner, *persönliche Mitteilung*, München, **2001**.
- [322] K. C. Lee, T. S. Kang, B. H. Woo, J. T. Lee, H. S. Lee, P. P. DeLuca, *J. Chromatogr. B* **1997**, *694*, 31-37.
- [323] E. S. Kozlowski, G. Johnson, D. D. Dischino, S. I. Dworetzky, C. G. Boissard, V. K. Gribkoff, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, *48*, 194-199.
- [324] A. Clerico, G. Iervasi, C. Manfredi, S. Salvadori, M. Marastoni, M. G. Delchicca, D. Giannessi, S. Delry, M. G. Andreassi, L. Sabatino, M. R. Iascone, A. Biagini, L. Donato, *Eur. J. Nucl. Med.* **1995**, *22*, 997-1004.
- [325] J. Barluenga, *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 431-436.
- [326] G. Arsequell, G. Espuna, G. Valencia, J. Barluenga, R. P. Carlon, J. M. Gonzalez, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7279-7282.
- [327] J. Ezquerro, C. Pedregal, C. Lamas, J. Barluenga, M. Perez, M. A. GarciaMartin, J. M. Gonzalez, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5804-5812.
- [328] J. Barluenga, J. M. Gonzalez, M. A. Garciamartin, P. J. Campos, G. Asensio, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2058-2060.
- [329] J. Barluenga, J. M. Gonzalez, M. A. Garciamartin, P. J. Campos, G. Asensio, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 1016-1017.
- [330] J. Barluenga, J. M. Gonzalez, P. J. Campos, G. Asensio, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, *24*, 319-320.
- [331] M. J. Crossley, M. L. Fisher, J. F. Potter, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, *9*, 2363-2369.
- [332] D. Gottschling, *Dissertation*, Technische Universität München (Garching), **2001**.
- [333] Y. Wu, G. R. Matsueda, M. Bernatowicz, *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 2055-3060.
- [334] R. F. Borch, M. D. Bernstein, H. D. Durst, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2897-2904.
- [335] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1-28.
- [336] C. Gibson, S. L. Goodman, D. Hahn, G. Hölzemann, H. Kessler, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7388-7394.
- [337] J. Gante, *Synthesis* **1989**, 405-413.
- [338] W. H. Miller, R. M. Keenan, R. N. Willette, M. W. Lark, *Drug Discov. Today* **2000**, *5*, 397-408.
- [339] C. Henry, N. Moitessier, Y. Chapleur, *Mini Rev. Med. Chem.* **2002**, *2*, 531-542.
- [340] J. W. Corbett, N. R. Graciani, S. A. Mousa, W. F. De Grado, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1371-1376.
- [341] I. I. Singer, S. Scott, D. W. Kawka, D. M. Kazazis, J. Gailit, E. Ruoslahti, *J. Cell Biol.* **1988**, *106*, 2171-2182.
- [342] W. H. Miller, W. E. Bondinell, R. D. Cousins, K. F. Erhard, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1807-1812.
- [343] A. Kling, G. Backfisch, J. Delzer, H. Geneste, C. Graef, W. Hornberger, U. E. W. Lange, A. Lauterbach, W. Seitz, T. Subkowski, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1319-1341.
- [344] F. Perron-Sierra, D. Saint Dizier, M. Bertrand, A. Genton, G. C. Tucker, P. Casara, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3291-3296.
- [345] A. Peyman, J.-F. Gourvest, T. R. Gadek, J. Knolle, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2996-2999.
- [346] K. C. Nicolaou, J. I. Trujillo, B. Jandeleit, K. Chibale, M. Rosenfeld, B. Diefenbach, D. A. Cheresh, S. L. Goodman, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1185-1208.
- [347] M. E. Duggan, L. T. Duong, J. E. Fisher, T. G. Hamill, W. F. Hoffman, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3736-3745.
- [348] W. H. Miller, P. J. Manley, R. D. Cousins, K. F. Erhard, D. A. Heerding, C. Kwon, S. T. Ross, J. M. Samanen, D. T. Takata, I. N. Uzinskas, C. C. K. Yuan, R. C. Haltiwanger, C. J. Gress, M. W. Lark, S. M. Hwang, I. E. James, D. J. Rieman, R. N.

- Willette, T. L. Yue, L. M. Azzarano, K. L. Salyers, B. R. Smith, K. W. Ward, K. O. Johanson, W. F. Huffman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1483-1486.
- [349] A. L. Rockwell, M. Rafalski, W. J. Pitts, D. G. Batt, J. J. Petraitis, W. F. DeGrado, S. Mousa, P. K. Jadhav, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 937-942.
- [350] w. J. Pitts, J. Wityak, J. M. Smallheer, A. E. Tobin, J. W. Jetter, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 27-40.
- [351] S. A. Mousa, W. Lorelli, S. Mohamed, D. G. Batt, P. K. Jadhav, T. M. Reilly, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1999**, *33*, 641-646.
- [352] D. G. Batt, J. J. Petraitis, G. C. Houghton, D. P. Modi, G. A. Cain, M. H. Corjay, S. A. Mousa, P. J. Bouchard, M. S. Forsythe, P. P. Harlow, F. A. Barbera, S. M. Spitz, R. R. Wexler, P. K. Jadhav, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 41-58.
- [353] A. Peyman, V. Wehner, J. Knolle, H. U. Stilz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 179-182.
- [354] A. Peyman, K. H. Scheunemann, D. W. Will, J. Knolle, V. Wehner, G. Breipohl, H. U. Stilz, D. Carniato, J. M. Ruxer, J. F. Gourvest, M. Auberval, B. Doucet, R. Baron, M. Gaillard, T. R. Gadek, S. Bodary, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2011-2015.
- [355] M. Bubenik, K. Meerovitch, F. Bergeron, G. Attardo, L. Chan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 503-506.
- [356] K. Urbahns, M. Harter, M. Albers, D. Schmidt, B. Stelte-Ludwig, U. Bruggemeier, A. Vaupel, C. Gerdes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 205-208.
- [357] K. Urbahns, M. Harter, A. Vaupel, M. Albers, D. Schmidt, U. Bruggemeier, B. Stelte-Ludwig, C. Gerdes, F. Tsujishita, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1071-1074.
- [358] R. S. Meissner, J. J. Perkins, L. T. Duong, G. D. Hartman, W. F. Hoffman, J. R. Huff, N. C. Ihle, C. T. Leu, R. M. Nagy, A. Naylor-Olsen, G. A. Rodan, S. B. Rodan, D. B. Whitman, G. A. Wesolowski, M. E. Duggan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 25-29.
- [359] R. M. J. Liskamp, D. B. A. De Bont, K. M. Sliedregt-Bol, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1043-1047.
- [360] R. M. Keenan, W. H. Miller, L. S. Barton, W. E. Bondinell, R. D. Cousins, D. F. Eppley, S. M. Hwang, C. Kwon, M. A. Lago, T. T. Nguyen, B. R. Smith, I. N. Uzinskas, C. C. K. Yuan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1801-1806.
- [361] B. Clement, *Drug Metab. Rev.* **2002**, *34*, 565-579.
- [362] B. Clement, K. Lopian, *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31*, 645-651.
- [363] B. Clement, PCT/DE 94/00756, **1994**
- [364] B. Eriksson, D. Bergqvist, P. Kalebo, O. E. Dahl, S. Lindbratt, A. Bylock, L. Frison, U. G. Eriksson, L. Welin, D. Gustafsson, *Lancet* **2002**, *360*, 1441-1447.
- [365] C. P. Carron, D. M. Meyer, J. A. Pegg, V. W. Engleman, M. A. Nickols, S. L. Settle, W. F. Westlin, P. G. Ruminski, G. A. Nickols, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1930-1935.
- [366] R. M. Scarborough, *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 971-981.
- [367] H. V. Meyers, G. J. Dilley, T. L. Durgin, T. S. Powers, N. A. Winssinger, H. Zhu, M. R. Pavia, *Mol. Divers.* **1995**, *1*, 13-20.
- [368] A. E. Adang, H. Lucas, A. P. de Man, R. A. Engh, P. D. Grootenhuis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3603-3608.
- [369] R. N. Misra, Y. F. Kelly, B. R. Brown, D. G. M. Roberts, S. Chong, S. M. Seiler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2165-2170.
- [370] A. Albert, E. P. Serjeant, *Ionization constants of acids and bases*, Methuen & Co Ltd., London, **1962**.
- [371] A. Gopalsamy, H. Yang, J. W. Ellingboe, K. L. Kees, J. Yoon, R. Murrills, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *10*, 1715-1718.
- [372] D. J. Brown, P. Waring, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1974**, 204-208.

- [373] S. C. Shilcrat, M. K. Mokhallalati, J. M. D. Fortunak, L. N. Pridgen, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8449-8454.
- [374] B. G. Shearer, J. A. Oplinger, S. Lee, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 179-182.
- [375] G. D. Searle & Co., WO 9708145, **1997**
- [376] J. Sheu, M. B. Smith, T. R. Oeschger, J. Satchel, *Org. Prep. Proced. Int.* **1992**, *24*, 147-157.
- [377] H. Schönowsky, B. Sachse, *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.* **1982**, *37*, 907-911.
- [378] D. M. W. van den Ham, G. F. S. Harrison, A. Spaans, D. Vandermeer, *Recl. Trav. Chim. Pays Bas* **1975**, *94*, 168-173.
- [379] C. Gibson, H. Kessler, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1725-1728.
- [380] J. Gante, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1780-1802.
- [381] C. Gennari, H. P. Nestler, B. Salom, W. C. Still, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1892-1893.
- [382] J. Wermuth, *Dissertation*, Technische Universität München (Garching), **1996**.
- [383] J. S. Schmitt, *Dissertation*, Technische Universität München (Garching), **1998**.
- [384] R. Gretler, E. Askitoglu, H. Kuhne, M. Hesse, *Helv. Chim. Acta* **1978**, *61*, 1730-1755.
- [385] J. C. Pelletier, M. P. Cava, *Synthesis* **1987**, 474-477.
- [386] H. G. O. Becker et al., in *Organikum, Vol. 19.*, Barth, Dt. Verl. der Wiss., Leipzig, Berlin, Heidelberg, **1993**, S. 420.
- [387] P. Vanderelst, D. Gondol, C. Wynants, D. Tourwe, G. Vanbinst, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, *29*, 331-346.
- [388] A. Renodon-Cornière, S. Dijols, C. Perollier, D. Lefevre-Groboillot, J.-L. Boucher, R. Attias, M.-A. Sari, D. Stuehr, D. Mansuy, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 944-954.
- [389] M. Xian, N. Fujiwara, Z. Wen, T. Cai, S. Kazuma, A. J. Janczuk, X. Tang, V. V. Teylianotikov, Y. Zhang, X. Chen, Y. Miyamoto, N. Taniguchi, P. G. Wang, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3049-3055.
- [390] G. C. Wallace, J. M. Fukuto, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1746-1748.
- [391] D. M. Bailey, C. G. Degrazia, H. E. Lape, R. Frering, D. Fort, T. Skulan, *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 151-156.
- [392] B. Clement, *persönliche Mitteilung*, **2003**
- [393] H. Kessler, S. Seip, *Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Applications for Chemist and Biochemists*, VCH Publishers, New York, **1994**.
- [394] B. Blankemeyer-Menge, M. Nimtz, R. Frank, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1701-1704.
- [395] G. Cardillo, L. Gentilucci, A. Tolomelli, C. Tomasini, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2351-2353.
- [396] C.-D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E. O. Lundell, J. D. Haug, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1980**, *15*, 59-66.
- [397] J. Perregaard, E. K. Moltzen, E. Meier, C. Sánchez, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1998-2008.
- [398] S. Jackson, W. Degrado, A. Dwivedi, A. Parthasarathy, A. Higley, J. Krywko, A. Rockwell, J. Markwalder, G. Wells, R. Wexler, S. Mousa, R. Harlow, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3220-3230.
- [399] S. Nagashima, S. Akamatsu, E. Kawaminami, S. Kawazoe, T. Ogami, Y. Matsumoto, M. Okada, K.-I. Suzuki, S.-I. Tsukamoto, *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1420-1432.
- [400] M. Inoue, M. Sasaki, K. Tachibana, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9416-9429.