

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften  
(doctor rerum naturalium)

# Peptide und peptidomimetische Verbindungen als Werkzeuge in der Proteomanalyse

Dipl.-Chem. Kai Jenssen  
aus Herford

Bielefeld 2004



1. Gutachter: Prof. Dr. N. Sewald

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Mattay

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 7. 2004



MÖGEST DU IN INTERESSANTEN ZEITEN LEBEN.

Altes chinesisches Sprichwort



Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier ISO 9706.



## Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 2001 bis April 2004 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald in der Arbeitsgruppe „Organische und Bioorganische Chemie“ an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld angefertigt.

Meinem akademischen Lehrer, Herrn Prof. Dr. Norbert Sewald, danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und seine fortwährend wohlwollende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit in Form von steter Diskussionsbereitschaft und zahlreichen wertvollen Anregungen.

Desweiteren gilt mein Dank Frau Dr. Katherina Sewald für ihre stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und ihre wertvollen Anregungen im Verlauf dieser Arbeit.

Für die Spende des Hexafluoraceton-trihydrats danke ich Prof. Dr. K. Burger.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. J. Frey für die vielen wertvollen Ratschläge und die freundliche Atmosphäre, während unserer Gespräche, sowie Herrn Hamad Al-Riyami und Frau Christine Volkmann für die Überlassung von Proteinmaterial.

Im danke den folgenden Damen und Herren, ohne die diese Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen wäre: den Herren G. Lipinski und K. P. Mester für die Aufnahme der NMR-Spektren, dem Herrn Dipl. Ing. E. Westermeier sowie Dr. M. Letzel für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen, ferner Frau B. Michel für die elementaranalytischen Messungen, für die Unterstützung bei EDV-Problemen Herrn Dr. U. Neuert und Herrn R. Beckmann für die Benutzung der Zentrifugen der Arbeitsgruppe BC I.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe OCIII möchte ich für ihre Kollegialität und die freundliche Arbeitsatmosphäre danken, sowie den Herren Thomas Kramer und Nils Hechler für ihre im Rahmen eines Blockpraktikums geleisteten Beiträge. Ebenfalls gilt mein Dank Frau Sonja Krückemeier und Herrn Sascha Sackewitz für präparative Arbeiten, die sie im Rahmen ihrer Ausbildung für diese Arbeit geleistet haben. Für das Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bei Miriam Hagenstein und Olaf Barton bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, die durch ihre unermüdliche Unterstützung und Geduld mein Studium erst ermöglicht hat.

## Publikationen und Beiträge

K. Jenssen, K. Stembera and N. Sewald, „Peptides as Tools for the Discovery and Activity-Profiling of Matrix Metalloproteinases“, *Peptides 2002: Proceedings of the 27th European Peptide Symposium*, **31. August – 6. September 2002**, Sorrent, Italien, Edizioni Ziino, Castellammare di Stabia, 2002, 964.

K. Jenssen, K. Sewald and N. Sewald, „Synthesis of Marimastat and a Marimastat Conjugate for Affinity Chromatography and Surface Plasmon Resonance Studies“, *Bioconj. Chem.* **2004**, *15*, 594–600.

## Posterpräsentationen

K. Jenssen, K. Stembera and N. Sewald, „Peptides as Tools for the Discovery and Activity-Profiling of Matrix Metalloproteinases“, *27th European Peptide Symposium*, **31. August – 6. September 2002**, Sorrent, Italien.

K. Jenssen, K. Stembera and N. Sewald, „Peptides as Tools for the Discovery and Activity-Profiling of Matrix Metalloproteinases“, *6th German Peptide Symposium*, **23. März – 26. März 2003**, Berlin.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theorie</b>	<b>3</b>
2.1	Proteomik . . . . .	3
2.1.1	Funktionelle Proteomik . . . . .	7
2.2	Peptidsynthese . . . . .	12
2.3	Die extrazelluläre Matrix (ECM) . . . . .	16
2.4	Integrine . . . . .	17
2.5	RGD-Peptide . . . . .	20
2.6	Matrixmetalloproteinasen (MMP) . . . . .	20
2.7	ADAMs . . . . .	23
2.8	Der synthetische MMP-Inhibitor Marimastat . . . . .	25
2.9	Hexafluoraceton als Schutzgruppe . . . . .	26
2.10	Strategie zur Immobilisierung eines Hydroxamsäure-Inhibitors . . . . .	28
2.11	Oberflächenplasmonresonanz . . . . .	30
2.12	Photoaffinitätsmarkierung . . . . .	35
2.13	Marker für Sulfhydrylgruppen . . . . .	39
<b>3</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>43</b>
4.1	Synthese von Marimastat <b>7</b> . . . . .	43

4.1.1	Synthese des Marimastat „building-blocks“ . . . . .	43
4.1.2	Darstellung der Vorstufen . . . . .	44
4.1.3	Darstellung von Marimastat <b>7</b> (Methode 1) . . . . .	46
4.1.4	Darstellung von Marimastat <b>7</b> (Methode 2) . . . . .	50
4.1.5	Diskussion . . . . .	52
4.2	Synthese neuer Linkermoleküle . . . . .	53
4.2.1	Verbesserte Synthese von 1-Amino-8-( <i>tert</i> -butyloxycarbonyl- amino)-3,6-dioxaoctan <b>30</b> . . . . .	53
4.2.2	Synthese von 1-Amino-8-(benzyloxycarbonylamino)-3,6-di- oxaoctan <b>32</b> . . . . .	53
4.2.3	Synthese von <i>N</i> -(8- <i>tert</i> -Butyloxycarbonylamino-3,6-dioxa- octan-1-yl)-bernsteinsäureamid <b>32</b> . . . . .	54
4.2.4	Synthese von 1-Azido-8-hydroxy-3,6-dioxaoctan <b>36</b> . . . . .	54
4.2.5	Synthese von 11-Azido-3,6,9-trioxaundecansäure <b>38</b> . . . . .	55
4.3	Synthese des Marimastat-Derivats <b>18</b> . . . . .	56
4.3.1	Darstellung des Marimastat-Derivats <b>18</b> in Lösung (Methode 1) . . . . .	56
4.3.2	Darstellung des Marimastat-Derivats <b>18</b> in Lösung (Methode 2) . . . . .	60
4.3.3	Immobilisierung des Marimastat-Derivates <b>18</b> für SPR-Studien . . . . .	63
4.3.4	Bindung von MMP-2 an Marimastat-Derivat <b>18</b> . . . . .	63
4.3.5	Bindung von ADAM9 an Marimastat-Derivat <b>18</b> . . . . .	69
4.3.6	Diskussion . . . . .	72
4.4	Synthese neuer Proteinsonden für MMPs . . . . .	74
4.4.1	Diskussion . . . . .	81
4.5	Synthese von cyclischen RGD-Peptiden . . . . .	82
4.5.1	Synthese von Lysinderivaten . . . . .	82
4.5.2	Darstellung von RGD-Cyclopeptiden . . . . .	84
4.5.3	SPR-Studien mit Plazentamembranextrakt . . . . .	87
4.5.4	Diskussion . . . . .	91

4.6	Subproteome aus Plazenta . . . . .	92
4.6.1	Plazentapräparation . . . . .	93
4.6.2	Herstellung von Affinitätssäulen . . . . .	94
4.6.3	Affinitätschromatographisches Auffinden von MMPs . . . . .	95
4.6.4	Isolierung von RGD-abhängig bindenden Proteinen . . . . .	97
4.7	Synthese eines Maleinimidderivates . . . . .	98
4.7.1	Diskussion . . . . .	100
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>105</b>
6.1	Allgemeine Arbeitsmethoden . . . . .	105
6.2	Allgemeine Angaben zu den biochemischen Experimenten . . . . .	107
6.2.1	Puffer . . . . .	107
6.2.2	Geräte . . . . .	109
6.3	Synthesen . . . . .	110
6.3.1	Synthese von Marimastat <b>7</b> (Methode 1) . . . . .	110
6.3.2	Synthese von Marimastat <b>7</b> (Methode 2) . . . . .	117
6.3.3	Synthese neuer Linkermoleküle . . . . .	122
6.3.4	Synthese des Marimastat-Derivats <b>18</b> in Lösung (Methode 1) .	127
6.3.5	Synthese des Marimastat-Derivats <b>18</b> in Lösung (Methode 2) .	137
6.4	Synthese eines Photoaffinitätsmarkers . . . . .	144
6.4.1	Darstellung der Vorstufen . . . . .	144
6.4.2	Kuppeln von Dansylchlorid <b>55</b> . . . . .	150
6.4.3	Kuppeln von 7-Diethylamino-coumarin-3-carbonsäure <b>56</b> . . .	154
6.4.4	Kuppeln von 5(6)-Carboxyfluorescein <b>57</b> . . . . .	157
6.4.5	Darstellung der Proteinsonden . . . . .	160
6.5	Synthese von derivatisiertem Maleinimid . . . . .	165
6.6	Peptidsynthese . . . . .	169

6.6.1	Synthese von Lysinderivaten . . . . .	169
6.6.2	Peptidsynthese-Protokoll . . . . .	172
6.6.3	Synthese von cyclischen RGD-Peptiden . . . . .	175
6.6.4	Synthese modifizierter cyclischer RGD-Peptide . . . . .	178
6.7	SPR-Messungen . . . . .	180
6.7.1	Bindung von MMP-2 an das immobilisierte Marimastat- Derivat <b>18</b> . . . . .	180
6.7.2	Bindung von ADAM9 an das immobilisierte Marimastat- Derivat <b>18</b> . . . . .	181
6.7.3	Studien mit Plazentamembranextrakt . . . . .	182
6.8	Plazentapräparation . . . . .	183
6.9	Affinitätschromatographie . . . . .	183
6.9.1	Beladen der Säule . . . . .	183
6.9.2	Auftragen der MMP-Fraktion I-Lösung . . . . .	184
6.9.3	Waschen und Eluieren . . . . .	184
6.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	184
6.10.1	Coomassie Brilliant Blue-Färbung . . . . .	185
6.10.2	Silberfärbung . . . . .	186

## Abkürzungsverzeichnis

2D-PAGE	zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Bn	Benzyl
BnO-NH <sub>2</sub>	O-Benzylhydroxylamin
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure
CI	chemische Ionisation
d	Dublett
D	Dalton
Dansyl	5-Dimethylamino-naphthalin-1-sulfonsäure
DCM	Dichlormethan
Dde	<i>N</i> -(1(4,4-dimethyl-2,6-dioxohexyliden)ethyl)
DIPEA	Ethyl-diisopropylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDC	<i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermis growth factor)

EE	Ethylacetat
EEDQ	2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
Fc	Antikörperfragment mit einer konstanten Sequenz
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
FT	Fourier-Transform
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylumyl]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i> ]pyridin-3-oxid hexafluorphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluorpropan-2-ol
HOBt	1-Hydroxy-1 <i>H</i> -benzotriazol Hydrat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
<sup><i>i</i></sup> Bu	<i>iso</i> -Butyl
<sup><i>i</i></sup> Pr	<i>iso</i> -Propyl
$k_a$	kinetische Assoziationskonstante
$K_A$	Affinitätskonstante (Gleichgewicht)
$k_d$	kinetische Dissoziationskonstante
$K_D$	Dissoziationskonstante (Gleichgewicht)
L1	Zelladhäsionsmolekül 1
LDA	Lithiumdiisopropylamid
m	Multipllett
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption Ionization
MS	Massenspektrometrie
NEM	<i>N</i> -Ethylmaleinimid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin

NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OSu	O-Succinimid
p	primär
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PE	Petrolether
PG	Protecting group (Schutzgruppe)
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PTSA	p-Toluolsulfonsäure
q	Quartett, quartär
$R_{max}$	maximale (theroretisch erreichbare) Response
RP	Reversed-phase
RT	Raumtemperatur
s	Singulett, sekundär
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance)
t	Triplett, tertiär
TBME	<i>tert</i> -Butylmethylether
TBTU	1-[Bis(dimethylamino)methylumyl]-1 <i>H</i> -benzotriazol-3-oxid tetrafluorborat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$ (tumour necrosis factor $\alpha$ )
Trt	Trityl
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1
Z	Benzyloxycarbonyl

<b>Aminosäure</b>	<b>Dreibuchstabencode</b>	<b>Einbuchstabencode</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

# 1 Einleitung

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms hat zu einer Informationsflut an möglichen Genprodukten, zumeist Proteinen, geführt. Für die Mehrheit dieser Proteine ist jedoch die Funktion unbekannt. Eine der größten Herausforderungen der Biowissenschaften ist es deshalb, den Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp eines Organismus zu verstehen. Hierbei stellen sich Fragen nach der Transkriptionsaktivität von Genen, nach der Menge der einzelnen Proteine, ihrer Interaktion und ihrer Aktivität.

In Analogie zur *Genomik*, die sich mit der Untersuchung von Genen beschäftigt, hat sich in den letzten Jahren eine neue Disziplin entwickelt, die die Proteinzusammensetzung eines Organismus untersucht. Dabei umfasst sie auch die Charakterisierung, das Expressionsniveau, die post-translationalen Modifizierungen und die Interaktionen mit Bindungspartnern. Das Ziel dieser sogenannten *Proteomik* ist es, eine globale Übersicht über zelluläre Prozesse und die Interaktionsnetzwerke auf Proteinebene zu erhalten.<sup>[1]</sup>

Die Forschung konzentriert sich dabei auf die Gesamtheit der Proteine, die von einem Genom zu einem Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen exprimiert wird, das „Proteom“. Da es sich bei den Proteinen um die Effektormoleküle einer Zelle handelt, bieten sie eine direkte Möglichkeit, die zelluläre Antwort auf bestimmte Ereignisse zu untersuchen. Im Gegensatz hierzu stehen die DNA und RNA, die die Informationsträger darstellen.<sup>[1]</sup>

Die Industrie hatte in den letzten Jahren ein starkes Interesse am Auffinden von pharmazeutischen Leitstrukturen („lead structure“). Die Proteomik kann hier bei der Suche nach neuen Wirkstoffen unterstützen, da die Wirkorte von Medikamenten hauptsächlich Proteine sind. Proteomforschung bei Bakterien und Viren, aber auch beim Menschen kann daher zu besseren und sicheren Wirkstoffen führen, die außerdem in einer kürzeren Zeitspanne erhalten werden.<sup>[2,3]</sup>

Viele Krankheiten beim Menschen hängen unmittelbar mit Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) zusammen. Zu diesen Krankheiten zählen z. B. die multiple Sklerose, die Tumordinvasion und die rheumatische Arthritis, die ihre Ursache in einem fehlregulierten Abbau von Bestandteilen der ECM haben. Daher existiert ein starkes Interesse, die Proteininteraktionen in der ECM zu verstehen. Die erhaltenen Informationen können dann für die Behandlung von Krankheiten genutzt werden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Synthese und Anwendung von chemischen Werkzeugen für die Proteomanalyse. Hierbei soll der Schwerpunkt auf Peptiden und Peptidomimetika liegen, die für die Proteomanalyse von Proteinen der extrazellulären Matrix geeignet sind. Als Modellsysteme sollen breitbandige Liganden für Matrixmetalloproteinasen (Hydroxamsäure-Inhibitoren) und für RGD-abhängig bindende Proteine, wie z. B. Integrine, synthetisiert und getestet werden. Auf dieser Basis sollen vereinfachte Proteome, sogenannte Subproteome, erhalten werden, die sich schneller analysieren lassen sollten.

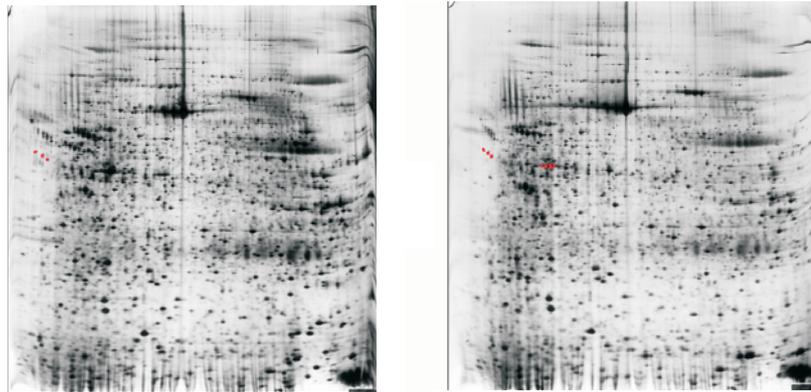
## 2 Theorie

### 2.1 Proteomik

In den letzten Jahren hat sich parallel zur Genomik eine neue Disziplin etabliert, die *Proteomik*.<sup>[4]</sup> Sie untersucht die Proteinzusammensetzung einer Zelle und umfasst dabei die Charakterisierung von Proteineigenschaften. Es soll eine Übersicht über zelluläre Prozesse und die Netzwerke auf Proteinebene erhalten werden. Aus den DNA-Sequenzdaten lassen sich nicht alle Proteine einer Zelle vorhersagen. Eine Schwierigkeit ist in der Tatsache begründet, daß ein Organismus zwar nur ein Genom, aber mehrere Proteome besitzen kann. Die Ursache hierfür ist unter anderem in den posttranslationalen Modifizierungen, wie Phosphorylierungen, Methylierungen, Glykosylierungen und proteolytischen Spaltungen von Proteinen suchen. Ebenso hat auch das Spleißen der mRNA nach der Transkription einen erheblichen Einfluß auf die exprimierten Proteine.<sup>[1,5]</sup>

Das menschliche Genom kodiert für ca. 40000 unterschiedliche Proteine. Von ihnen werden aber nur rund 10000 zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle exprimiert. Das Expressionsmuster bestimmt dabei die eigentliche Funktion einer Zelle. Als ein prominentes Beispiel für die Korrelation Proteom-Phänotyp kann eine Raupe und der daraus hervorgehende Schmetterling angeführt werden, die beide ein gleiches Genom, aber ein völlig anderes Proteom besitzen.<sup>[4]</sup>

Das Proteom ist im Unterschied zum Genom ein hochdynamisches System, das durch kleine Änderungen der Randbedingungen charakteristisch geändert wird. Eine Pro-

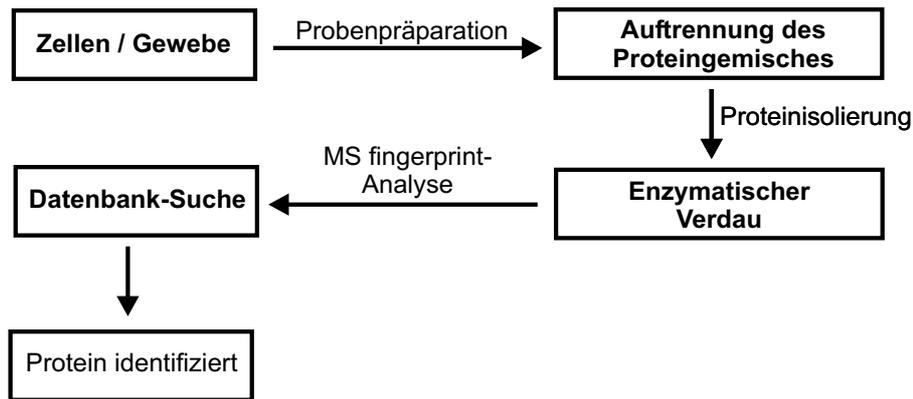


**Abbildung 2.1:** 2D-PAGE (links: Brustcarcinomzellen, rechts: gesunde Brustzellen) (entnommen der Datenbank: Siena-2D-PAGE, Eintrag: BREAST HUMAN P02750.)

teomanalyse ist bedingt durch die hohe Datenmenge nur mit einem differentiellen Ansatz möglich, bei dem zwei oder auch mehrere definierte Zustände miteinander verglichen werden.<sup>[4]</sup> Erschwerend kommt hinzu, daß auf der Proteinebene keine amplifizierende Methode existiert, die der PCR (polymerase chain reaction) auf der Ebene der DNA- bzw. RNA-Analyse vergleichbar wäre.<sup>[1]</sup>

Wird ein Organismus einem Stress ausgesetzt, z.B. in Form von Chemikalien/Medikamenten, so reagiert er, indem er das Expressionsmuster seiner Proteine ändert. Die Veränderungen können mit einer Proteomanalyse verfolgt werden. Dadurch werden wertvolle Einblicke in das Zusammenspiel der Proteine in einem Organismus erhalten. Weiterhin gibt es auch Unterschiede im Expressionsmuster zwischen normalen (gesunden) und pathologisch veränderten Zellen (Abb. 2.1).<sup>[6,7]</sup>

In Abbildung 2.2 ist die klassische Vorgehensweise für eine Proteomanalyse wiedergegeben. Nach einem Zellaufschlußverfahren wird ein Proteingemisch erhalten. Die Proteine können dann mit einem multidimensionalen Trennverfahren separiert werden. Nach einer erfolgreichen Trennung werden die Proteine isoliert und danach durch enzymatischen Verdau, meist durch Zugabe von Trypsin, in kleinere Peptide



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung einer Proteomanalyse.<sup>[1]</sup>

fragmentiert, die dann ohne weitere Auftrennung massenspektrometrisch analysiert werden. Durch den Vergleich der Massen der einzelnen Fragmente mit Datenbanken ist es oft möglich, das Protein direkt zu identifizieren. Falls eine Zuordnung nicht möglich ist, kann durch Elektrosprayionisations-Tandemmassenspektrometrie (ESI-MS/MS) das entsprechende Peptidfragment in kleinere Peptidsequenzen (Peptidsequenztag) fragmentiert werden, wonach in der Regel eine genaue Zuordnung des Proteins möglich ist.<sup>[1,4]</sup>

Wegen der großen Anzahl exprimierter Proteine kommen nur multidimensionale Trennverfahren für Proteine in Betracht. Ein seit ca. 25 Jahren etabliertes Verfahren ist die 2D-Gelelektrophorese (2D-PAGE). Die Proteine werden zunächst in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt und dann in der zweiten Dimension in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) hinsichtlich der Masse getrennt. Die Bindung von SDS an Proteine sorgt für eine Entfaltung und zu einer einheitlichen negativen Ladungsdichte. Die Gele werden dann mit sensitiven Färbereagenzien wie Silber, Coomassie-Blau oder Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt. Diese Methode hat jedoch einige Nachteile. Die konventionellen Färbemethoden sind nicht selektiv und schwer reproduzierbar. Prinzipiell können die Proteine auch vor der 2D-Gelelektrophorese mit Fluoreszenzfarbstoffen kovalent verknüpft werden. Diese Ver-

knüpfung ist jedoch unspezifisch, so daß eine einheitliche Markierung nicht erreicht wird, was eine Quantifizierung der einzelnen Proteine erschwert. Weiterhin zeigen markierte Proteine mitunter ein unterschiedliches Laufverhalten auf dem 2D-Gel, was die Auswertung zusätzlich kompliziert, da nicht sicher gestellt werden kann, daß sämtliche Moleküle eines Proteins angefärbt wurden. Proteine, die nur in einer sehr geringen Kopienzahl ( $< 1000$ /Zelle) in einer Zelle vorkommen, können nach der 2D-PAGE nicht detektiert werden, da sie von den höher konzentrierten Proteinen überlagert werden. Dies ist ein zusätzlicher Grund für die Erschwerung der Quantifizierung von Proteinen.<sup>[4]</sup>

Neuerdings werden für diese Art der Proteomik, der *Expressionsproteomik*, neue Trennverfahren entwickelt, die im Gegensatz zur 2D-PAGE eine vollständig automatisierte Proteomanalyse erlauben. Hier haben in den letzten Jahren multidimensionale chromatographische Verfahren große Fortschritte erzielt. Diese Technologie ist sehr leistungsfähig, aber auch wesentlich kostenintensiver als die 2D-PAGE. Die Systeme verwenden HPLC mit mehreren unterschiedlichen stationären Phasen. So kann die erste Phase eine Affinitätschromatographie-Säule sein, während die zweite aus RP-Kieselgel besteht. Die nach der ersten Dimension erhaltenen Fraktionen, die zumeist noch aus mehreren Proteinen bestehen, werden anschließend in der zweiten Dimension getrennt. Ein an diese Säule angeschlossenes ESI-Massenspektrometer analysiert dann die einzelnen Fraktionen, wobei vorher ein tryptischer Verdau durchgeführt wird, um wiederum Peptidfragmente zu erhalten, mit denen sich Proteine identifizieren lassen. Mit diesen Systemen können Proteome innerhalb von Stunden automatisch analysiert werden, wobei auch Proteine detektiert und quantifiziert werden, die nur in geringer Kopienzahl pro Zelle vorkommen.<sup>[8]</sup>

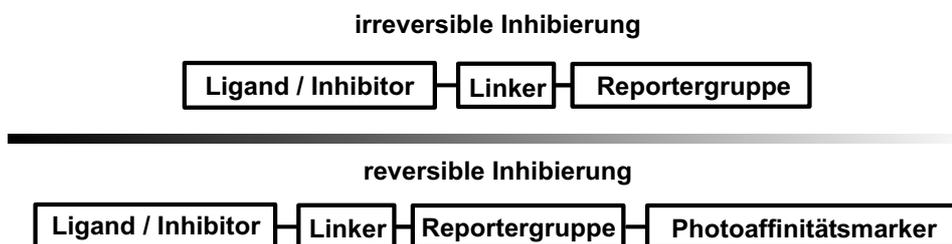
Neben der Expressionsproteomik existiert die *Strukturproteomik*, die es sich zum Ziel gesetzt hat, die 3D-Strukturen von Proteinen im großen Umfang mittels Röntgenstrukturanalyse aufzuklären. Diese 3D-Strukturen sind wiederum sehr wichtig für die

Entwicklung von Wirkstoffen mittels computergestützter „docking“-Experimente.<sup>[3]</sup>

### 2.1.1 Funktionelle Proteomik

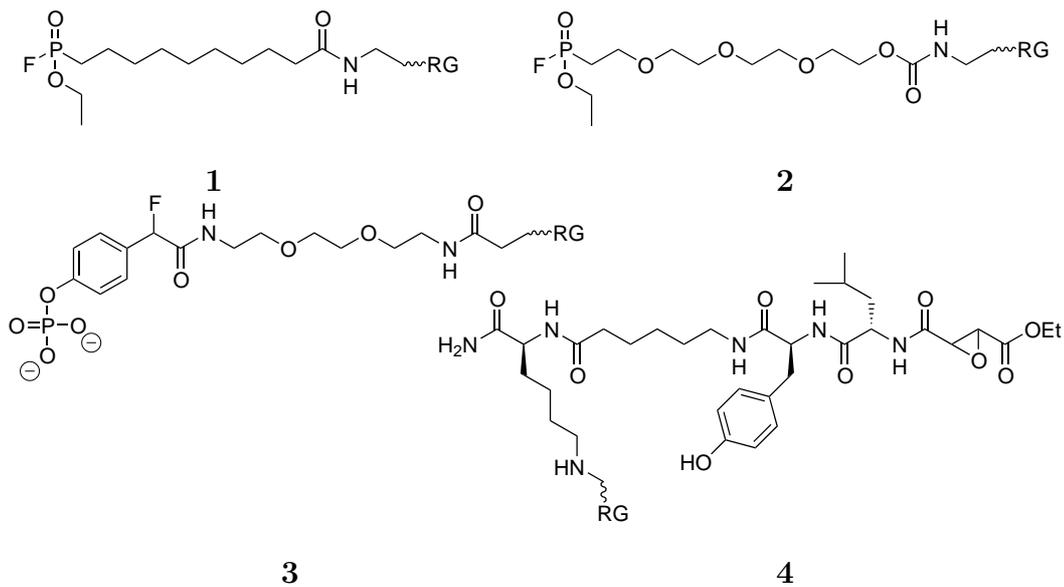
Wegen der immens großen Zahl parallel exprimierter Proteine ist es wünschenswert, Subproteome, also Teile des Proteoms zu analysieren. Diese werden auf der Basis der Proteinfunktion in der funktionellen Proteomik generiert. Die funktionelle Proteomik zielt auf Proteinfamilien mit gemeinsamen Funktionen und Bindungspartnern. Dazu werden z. B. affinitätsbasierte Methoden eingesetzt. Ein bekanntes Protein oder ein bekannter Ligand wird auf einer festen Phase immobilisiert und anschließend mit einem Proteingemisch inkubiert. Die entsprechenden Analyten binden an den immobilisierten Liganden und werden dann eluiert. Die gereinigten Proteine können anschließend mit Hilfe der Proteomanalyse genauer charakterisiert werden.<sup>[3]</sup>

Ein neues Konzept stellt eine mechanismusbasierte bzw. aktivitätsbasierte Methode dar, die im Gegensatz zur Expressionsproteomik zusätzlich eine direkte Aussage über den Aktivitätszustand einzelner Proteinfamilien erlaubt. Durch die Synthese einer entsprechenden aktivitätsbasierten Proteinsonde, die z. B. gegen das aktive Zentrum einer Proteinfamilie gerichtet ist, lassen sich komplexe Proteome vereinfachen. Auf diese Weise kann die Aktivität einer ganzen Proteinfamilie auf einmal untersucht werden.



**Abbildung 2.3:** Gegenüberstellung aktivitätsbasierter Proteinsonden für die funktionelle Proteomik bei reversibler und irreversibler Ligandenbindung.

Eine entsprechende Sonde muß aus mindestens zwei Teilen aufgebaut sein: einem irreversibel bindenden Liganden, der das aktive Zentrum des Proteins erkennt und einem Linker, an dem weitergehende Derivatisierungen möglich sind, wie z. B. die Verknüpfung mit einer Reportergruppe (Biotin, Fluoreszenzfarbstoffe) oder auch eine Immobilisierung auf einer festen (stationären) Phase für affinitätschromatographische Verwendungen (s. Abb. 2.3).



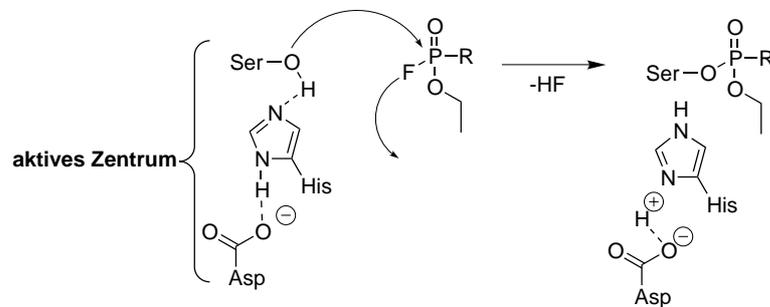
**Abbildung 2.4:** Werkzeuge für die funktionelle Proteomik basierend auf irreversiblen Inhibitoren (RG = Reportergruppe (Biotin oder Fluoreszenzfarbstoff)).<sup>[6, 9, 10]</sup>

Die Anwendbarkeit dieses Konzeptes wurde bereits bewiesen. Abbildung 2.4 zeigt einige aktivitätsbasierte Proteinsonden des irreversibel bindenden Typs, die jeweils spezifisch für eine bestimmte Proteinklasse sind. Sie reagieren mit dem aktiven Zentrum des gesuchten Proteins, wobei eine stabile kovalente Bindung ausgebildet wird.

Die Verbindungen **1** und **2** wurden zum Detektieren von Serinhydrolasen verwendet. Die Serinhydrolasen sind eine große Gruppe von Proteinasen, die für die Spaltung und den Abbau von Proteinen notwendig sind.

Zu ihnen zählen Trypsin, Chymotrypsin und die Elastase. Bei Trypsin und Chymotrypsin handelt es sich um Enzyme, die essentiell für die Verdauung von Proteinmaterial sind.

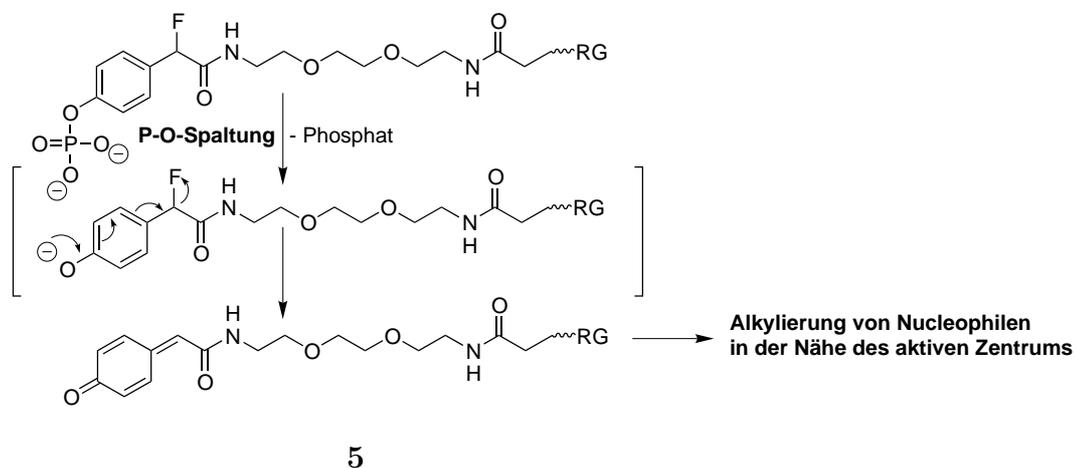
Fluorphosponate reagieren unter Bildung einer kovalenten Bindung mit dem im aktiven Zentrum vorhandenen Serin, das für die katalytische Aktivität dieser Proteinfamilie notwendig ist. Die Fluorphosponate bzw. Fluorphosphate werden auf Grund dieser Reaktion und der daraus resultierenden Giftigkeit zudem als chemische Kampfstoffe eingesetzt. Interessanterweise reagiert nur das Serin im aktiven Zentrum mit dem Suizid-Substrat, während sämtliche anderen Serinreste nicht reagieren. Die bemerkenswerte Reaktivität des Serins resultiert aus der katalytischen Triade Serin-Histidin-Aspartat. Durch den Einfluß des Histidins und des Aspartats erhält der Sauerstoff des Serins eine höhere Nucleophilie, so daß er unter Substitution des Fluorids am Phosphor angreifen kann. Die entstehende kovalente Bindung kann von dem Enzym nicht rückgängig gemacht werden, weshalb die Serinhydrolase mit der Sonde markiert wird (s. Abb. 2.5).



**Abbildung 2.5:** Mechanismus der Reaktion zwischen Fluorphosponaten und dem Serin im aktiven von Serinhydrolasen.<sup>[9]</sup>

Für die Markierung von Protein-Tyrosinphosphatasen wurden Sonden vom Typ der Verbindung **3** eingesetzt. In Abbildung 2.6 ist der zugehörige Mechanismus für die Markierungsreaktion dargestellt. Der Phosphatester wird im aktiven Zentrum der Phosphatase gespalten. Das entstandene Intermediat reagiert sofort unter einer 1,6-

Eliminierung des Fluorids zu dem sehr elektrophilen Chinonderivat **5**. Das Derivat **5** alkyliert daraufhin sehr schnell ein Nucleophil im aktiven Zentrum der Phosphatase, so daß eine kovalente Markierung des Enzyms erreicht wird.

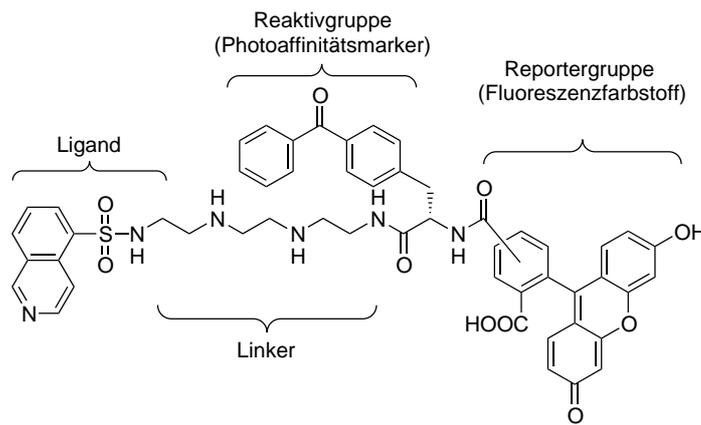


**Abbildung 2.6:** Mechanismus der Markierung von Protein-Tyrosinphosphatasen (RG = Reportergruppe).<sup>[10]</sup>

Greenbaum und Medzihradzky *et al.* konnten mit Verbindungen des Typs **4** Cysteinproteasen erfolgreich detektieren. Die Epoxidgruppe von Verbindung **4** wird von dem Cystein im aktiven Zentrum nucleophil unter Ausbildung einer kovalenten Bindung geöffnet, so daß auf diese Weise eine erfolgreiche Markierungsreaktion stattfindet.<sup>[6]</sup>

Die Markierungen bleiben auch unter den denaturierenden Bedingungen einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erhalten. Die vorgestellten Sonden wurden mit Lysaten aus Zellen getestet, die die entsprechenden Proteine exprimieren. Anschließend wurden Gelelektrophoresen durchgeführt und die Proteine mit Hilfe der in die Sonde eingebauten Reportergruppe identifiziert.<sup>[6, 9–11]</sup>

Leider existieren nicht für sämtliche Proteine irreversibel bindende Liganden/Inhibitoren, so daß auf reversibel bindende zurückgegriffen werden muß. Für solche Proteinsonden muß aber sicher gestellt sein, daß vor der SDS-PAGE eine kova-



6

**Abbildung 2.7:** Proteinsonde mit Reaktivgruppe für reversibel bindende Liganden.<sup>[12]</sup>

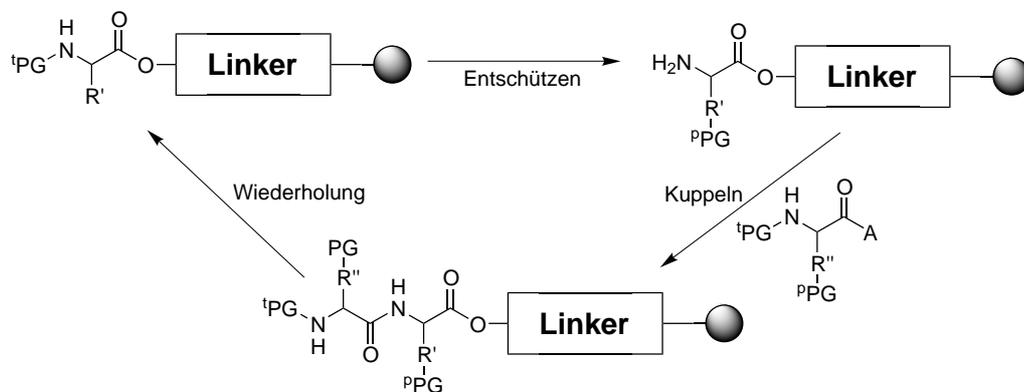
lente Bindung zwischen dem Liganden und dem Protein gebildet wird. Dazu muß eine Reaktivgruppe in die Sonde eingeführt werden. Sewald und Hagenstein *et al.* konnten die Anwendbarkeit von Photoaffinitätsmarkern als Reaktivgruppen mit der Proteinsonde **6** zeigen (Abb. 2.7). Nach der Inkubation der Proteinslösung mit der entsprechenden Sonde wird die Lösung bestrahlt. Dabei wird eine kovalente Bindung zwischen Ligand und Protein ausgebildet, die auch unter den denaturierenden Bedingungen einer SDS-Gelelektrophorese stabil bleibt. Die markierten Proteine können anschließend anhand der Fluoreszenz detektiert werden.<sup>[12]</sup> In Abbildung 2.3 ist der schematische Aufbau solcher aktivitätsbasierter Proteinsonden gezeigt. Bei der neuen Methode handelt es sich um ein modulares Konzept, so daß eine einfache Synthese für Proteinsonden unterschiedlicher Proteinfamilien durchgeführt werden kann.

Die Aufklärung sämtlicher Proteininteraktionen beim Menschen ist eine große Herausforderung. Bei dieser *Interactomics* genannten Disziplin wird geschätzt, daß das menschliche Genom aus etwa 40000 Genen besteht, die ihrerseits Millionen von unterschiedlichen Proteinen produzieren, wenn post-translationale Modifikationen und Mutationen eingerechnet werden. Die Erfahrung bei der Kartierung von Proteininteraktionen zeigt, daß jedes Protein an 5–10 Wechselwirkungen teilnimmt, hochge-

rechnet auf den Menschen müssen folglich Millionen von Interaktionen aufgeklärt werden. Ein besonders interessanter Aspekt bei der Interactomics ist es herauszufinden, welche Proteine miteinander assoziiert vorliegen.<sup>[13,14]</sup>

## 2.2 Peptidsynthese

Peptide und Proteine sind Polyamide aus Aminosäuren und kommen in jeder Zelle vor. Peptide, die aus weniger als etwa einhundert Aminosäuren aufgebaut sind, werden als Polypeptide bezeichnet. Proteine sind dabei Moleküle, die aus einer größeren Anzahl bestehen. Normalerweise werden in lebenden Organismen Proteine aus den 22 unterschiedlichen genetisch codierten  $\alpha$ -Aminosäuren gebildet. Die Aminosäuresequenz wird dabei durch die Sequenz des zugehörigen Nucleobasentriplets der DNA codiert.<sup>[15]</sup> Neben diesen 22 proteinogenen Aminosäuren kommen in der Natur viele andere Aminosäuren, darunter auch D-Aminosäuren, vor.

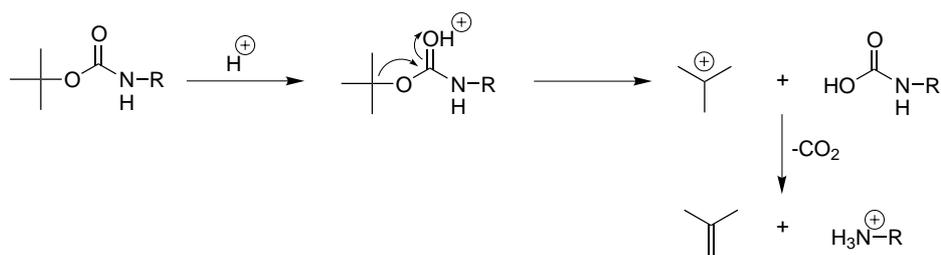


**Abbildung 2.8:** Festphasenpeptidsynthese (A: Aktivierungsreagenz der Carboxylgruppe,  $pPG$ : permanente Schutzgruppe,  $tPG$ : temporäre Schutzgruppe).

Für die Darstellung von Peptiden auf chemischen Wege müssen eine freie Aminogruppe und eine freie Carboxylgruppe miteinander eine Reaktion eingehen. Die Bildung der Peptidbindung erfolgt hierbei durch eine Aktivierung der Carboxylgruppe,

wobei eine Reihe von Methoden zu Verfügung stehen, und darauffolgender Reaktion dieser aktivierten Carbonsäure mit einer freien Aminogruppe. Für eine zielgerichtete Synthese ist es essentiell, daß die entsprechende Carboxyl- bzw. Aminogruppe mit einer Schutzgruppe maskiert ist. Dabei werden die Säuren in der Regel als Ester und die Aminogruppen als Urethanderivate geschützt. Nach erfolgreichem Kupplungsschritt wird dann die Schutzgruppe entfernt, sodass der nächste Kupplungsschritt stattfinden kann.

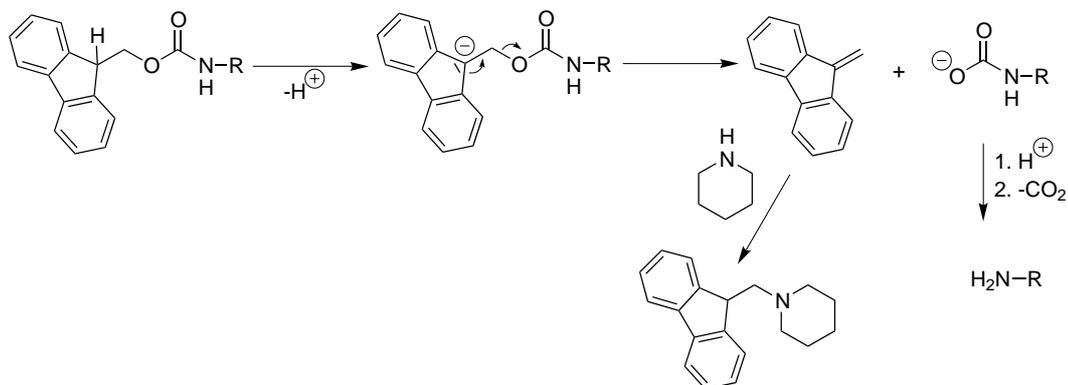
Für die Peptidsynthese wird bevorzugt die Festphasenstrategie verwendet, was mit Blick auf eine automatisierte Darstellung von Peptiden von Vorteil ist. Dieses Prinzip wurde 1963 von Merrifield eingeführt und wird noch heute eingesetzt.<sup>[16]</sup> Hierbei wird die erste Aminosäure über ihre Carboxylgruppe am Harz verankert und nach dem Entfernen der temporären Schutzgruppe folgt der Kupplungsschritt. Auf diese Weise wird dann sukzessiv das gewünschte Peptid synthetisiert (Abb. 2.8). Die überschüssigen Reagenzien werden dabei nach jedem Reaktionsschritt einfach abfiltriert. Das Harz wird dann gewaschen und die Synthese wird fortgeführt. Für eine hohe Effizienz des Kupplungsschrittes kann mit Reagenzüberschuß gearbeitet werden. Sind sämtliche Aminosäuren miteinander verknüpft wird das Produkt vom Harz abgespalten, wobei die permanenten Schutzgruppen eventuell gleichzeitig entfernt werden.



**Abbildung 2.9:** Acidolytische Entfernung der Boc-Schutzgruppe.

Die Verwendung geeigneter Schutzgruppen ist wesentlich für den Erfolg der Synthese. Die Reaktionsbedingungen, die notwendig sind, um die temporäre Schutzgruppe,

die die entsprechende  $\alpha$ -Aminogruppe schützt, zu entfernen, sollten die permanenten Schutzgruppen für die Seitenketten der Aminosäuren nicht beeinflussen. Die Orthogonalität der Schutzgruppen zueinander ist deshalb wichtig. Es werden hauptsächlich zwei Schutzgruppenstrategien angewendet. Bei der Boc/Benzyl-Taktik wird die Boc-Gruppe als temporäre Schutzgruppe eingesetzt, während die Schutzgruppen vom Benzyltyp (Z, Benzylester) als permanente Schutzgruppen dienen.<sup>[16]</sup> Die Boc-Gruppe wird unter sauren Bedingungen, z. B. mit TFA, abgespalten (s. Abb. 2.9) und die Benzylschutzgruppen werden am Ende der Synthese mit wasserfreier HF entfernt, wobei hier auch die Abspaltung des Produktes vom Harz erfolgt. Bei der Fmoc/*tert*-Butyl-Strategie dient die Fmoc-Gruppe als temporäre Schutzgruppe und als permanente Schutzgruppen fungieren Substituenten vom *tert*-Butyl-Typ (Boc, *tert*-Butylester).<sup>[17]</sup> Die Fmoc-Schutzgruppe wird unter basischen Bedingungen typischerweise mit Piperidin, wobei ein Piperidin-Dibenzofulven-Addukt gebildet wird, oder mit DBU, entfernt (s. Abb. 2.10).<sup>[18]</sup>



**Abbildung 2.10:** Baseninduzierte Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin.

Polystyrol, welches mit Divinylbenzol quervernetzt wurde, dient in der Festphasensynthese als polymerer Träger (Harz). Zur Oberflächenvergrößerung liegt es in Form von quellbaren kleinen Kügelchen vor. Die verschiedenen Harze unterscheiden sich hauptsächlich in der Art des Linkers, über den die Verankerung der C-terminalen Aminosäure stattfindet. Dieser bestimmt die Art der Abspaltbedingungen. Beim

Merrifield-Harz wird wasserfreie HF eingesetzt, während bei dem 2-Chlortritylharz entschieden mildere Bedingungen wählbar sind. So erfolgt die Abspaltung schon mit 1 % TFA oder mit einer HFIP-Lösung.<sup>[19]</sup> Mit diesem Harz können geschützte Peptide bzw. Peptidfragmente erhalten werden, die bei der Synthese cyclischer Peptide nach der Fmoc/*tert*-Butyl-Strategie benötigt werden.

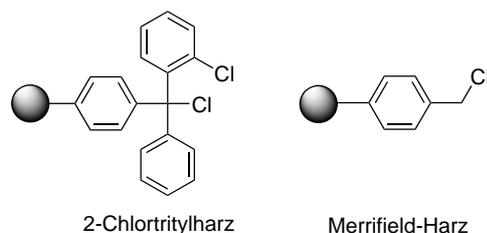


Abbildung 2.11: Beispiele für polymere Träger.

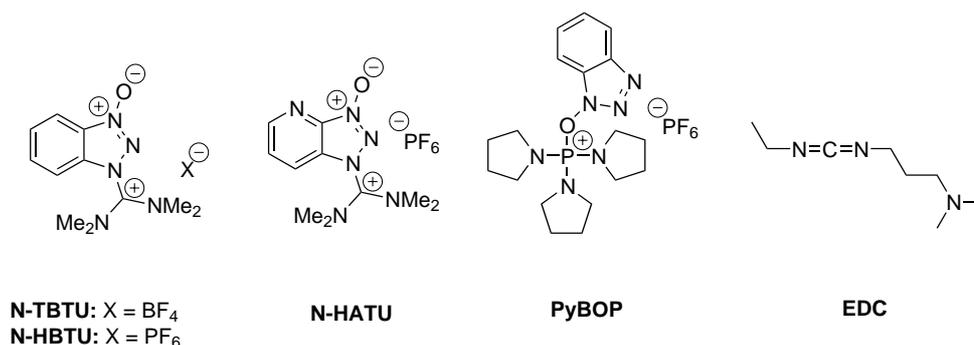


Abbildung 2.12: Beispiele für Kupplungsreagenzien.

Für die Durchführung der Kupplungsreaktion wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt. Die mittlerweile gebräuchlichste Methode ist die Verwendung von nicht-aktivierten Urethan-geschützten Aminosäuren. Die Reaktion wird dabei mit Hilfe eines Kupplungsreagenzes durchgeführt. Zu den wichtigsten Klassen von Kupplungsreagenzien zählen die Uroniumsalze, Phosphoniumsalze und Carbodiimide (Abb. 2.12). Für eine Vielzahl von Peptidsynthesen wird heute mit Carbodiimiden gearbeitet. Um Nebenreaktionen wie Racemisierung zu unterdrücken, werden dem Kupplungsansatz dabei häufig spezielle Additive, wie z. B. HOBt oder NHS, hin-

zugefügt, die die reaktiven Zwischenprodukte in weniger problematische Aktivester überführen. Diese Aktivester können vor der Kupplung mit einer Aminokomponente auch isoliert und gelagert werden. Aufgrund der erhöhten Elektrophilie des Aktivesters im Vergleich zur Carboxylgruppe reagieren Nucleophile, wie Amino- oder auch Hydroxylgruppen, sehr schnell mit ihnen zu den entsprechenden Peptiden oder Depsipeptiden. Die Kupplungsreagenzien vom Uroniumsalz- und Phosphoniumsalz-Typ werden in Kombination mit einem tertiären Amin (z. B. DIPEA) verwendet, da erst die Deprotonierung der Carboxylgruppe die Kupplungsreaktion startet. Ein Zusatz von Aktivesterreagenzien ist meist nicht notwendig, da der Aktivester intermediär bei der Kupplung mit diesen Reagenzien entsteht.

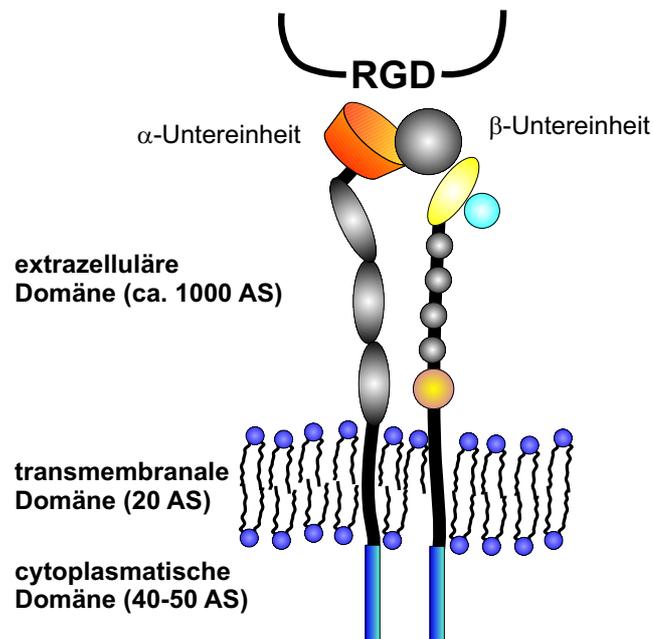
## 2.3 Die extrazelluläre Matrix (ECM)

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist ein komplexes Netzwerk aus Strukturproteinen; hierzu zählen Kollagene, Glykoproteine und Proteoglykane. Diese Bestandteile bauen die Basalmembran und das interstitielle Stroma auf. Die ECM unterliegt als dynamisches System einer ständigen Umstrukturierung. Diese Prozesse sind essentiell für Wachstum, Blutgefäßneubildung (Angiogenese), Embryonalentwicklung und Wundheilung. Sie spielen aber auch eine entscheidende Rolle bei einem fehlregulierten Abbau der Matrixkomponenten, wie sie bei pathologischen Prozessen wie der rheumatoiden Arthritis, der Parodontose und anderen chronischen Entzündungsprozessen beobachtet werden. Eine besondere Bedeutung kommt dem Matrixumbau bei der Tumorinvasion und Metastasierung zu.

Die physiologischen Prozesse unterliegen einer genauen Regulierung und Feinabstimmung. Hier sind mehrere Proteinasen involviert, die in verschiedene Klassen unterteilt werden. Neben Serin-, Aspartyl-, Threonin- und Cysteinproteinasen werden Metalloproteinase gefunden. Als bedeutendste Klasse der Metalloproteinase

sind die Matrixmetalloproteinasen (MMP) zu nennen, da ihre Substrate – die verschiedenen Kollagene – den Hauptbestandteil der ECM bilden.

## 2.4 Integrine



**Abbildung 2.13:** Schematischer Aufbau der Integrine nach der Röntgenkristallstruktur des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins.<sup>[20]</sup>

Integrine sind transmembrane Glykoproteine, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Beide Untereinheiten sind nichtkovalent miteinander zu einem Komplex assoziiert. Die beiden Monomere werden in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten eingeteilt. Insgesamt sind bis heute 16  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten bekannt, die in unterschiedlichen Kombinationen mehr als 24 verschiedene Integrine bilden können.<sup>[21]</sup> Sie bestehen aus einer großen extrazellulären, einer transmembranen und einer kleinen cytoplasmatischen Domäne. Eine Ausnahme bildet hierbei die extrazelluläre Domäne der  $\beta_4$ -Untereinheit, die aufgrund ihrer Größe Kontakt zu dem Keratin-Cytoskelett

aufnehmen kann.<sup>[22]</sup> Für die Ligandenbindung ist bei Integrinen eine globuläre Kopfgruppe, die von den beiden Untereinheiten gebildet wird, verantwortlich. Diese ist durch zwei lange Regionen mit den transmembranen und cytoplasmatischen Domänen verbunden.<sup>[23]</sup> Abb. 2.13 zeigt den schematischen Aufbau eines Integrins.

Jedes Integrin scheint dabei eine eigene, spezifische Funktion zu haben. Studien an entsprechenden „knock-out“ Mäusen zeigen phänotypisch pathologische Fehlentwicklungen bzw. Krankheiten. So treten z.B. bei Unterdrückung der Expression entsprechender  $\alpha$ -Untereinheiten Defekte in der Leukozytenbildung und -funktion auf.<sup>[24]</sup> Desweiteren spielt die vermehrte Expression einiger Integrine eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Metastasierung von Tumorzellen. So wurde gezeigt, daß das Integrin  $\alpha_5\beta_1$  eine maßgebliche Rolle bei der Metastasenentwicklung von Nieren- und Ovarientumoren spielt.<sup>[25]</sup> Dieses Integrin scheint auch bei der Entstehung von diversen pathologischen Entzündungsprozessen beteiligt zu sein.<sup>[26]</sup>

Metastasierende Zellen wandern oft über die Blutgefäße in andere Gewebe ein. Dazu müssen sich die einzelnen Tumorzellen aus dem Tumorverband lösen und in die Blutgefäße einwandern. Hierbei scheint das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  eine Schlüsselrolle zu spielen. Es ist bekannt, daß die aktivierte Form der Matrixmetalloproteinase MMP-2 an dieses Integrin bindet. Die gebundene MMP wird dann gegen Bestandteile der ECM wirksam. Das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  nutzt also die Matrixmetalloproteinase, um sich einen Weg in das umliegende Gewebe zu schneiden.<sup>[27]</sup>

Die Integrine zeigen in ihrer Ligandenbindung starke Unterschiede. Einige binden nur einen oder wenige Liganden, während andere Affinität zu einem breiteren Spektrum aufweisen. Darüber hinaus tritt eine große Variationsbreite auf, weshalb eine Klassifizierung der Integrine hinsichtlich ihrer Bindungspartner schwierig ist.<sup>[28]</sup> In Tabelle 2.1 sind einige Integrine mit ihren entsprechenden Liganden aufgeführt.

Durch Zusammenfassen ist eine Subklassifizierung basierend auf den  $\beta$ -Untereinheiten möglich. Die Unterfamilien, die bisher am häufigsten untersucht worden sind,

Tabelle 2.1: Einige Integrine und ihre Liganden.<sup>[29,30]</sup>

Integrin	Liganden	Erkennungssequenz
$\alpha_1\beta_1$	Kollagene, Laminin	RGD
$\alpha_2\beta_1$	Kollagene, Laminin	YYGDLR, FYFDLR, RGD
$\alpha_4\beta_1$	Fibronectin, VCAM-1	LDV, IDS, RGD
$\alpha_5\beta_1$	Fibronectin, L1	RGD
$\alpha_8\beta_1$	Fibronectin, Vitronectin, Tenascin	RGD
$\alpha_v\beta_1$	Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen L1, Kollagene, Laminin, Osteopontin	RGD
$\alpha_v\beta_3$	Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen L1, von Willebrand Faktor, Osteopontin	RGD, RLD, KRLDGS
$\alpha_v\beta_6$	Fibronectin, Vitronectin	RGD

stellen die  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_3$ - und  $\beta_7$ -Integrine dar. Dabei wird die  $\beta_1$ -Unterfamilie auch als VLA-Integrine (very late activated antigens) bezeichnet und sorgt überwiegend für Zell-Matrix-Interaktionen. Die Integrine der  $\beta_2$ -Unterfamilie, die hauptsächlich von Leukozyten exprimiert werden, sind in Zell-Zell-Interaktionen involviert. Integrine, die verschiedene adhäsive Prozesse ausüben, gehören zur  $\beta_3$ -Unterfamilie und werden auch als Cytoadhäsions-Integrine bezeichnet, ebenso wie die  $\beta_7$ -Integrine, die Wechselwirkungen ausschließlich zwischen Zellen vermitteln. Die zahlreichen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen sorgen für eine feste Verankerung der Zellen im Gewebeverband.<sup>[31]</sup> Ebenso üben sie einen regulatorischen Effekt auf die Zelldifferenzierung, Zellteilung, Zellwanderung und Zelltod aus. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur bidirektionalen Signalübertragung sind sie wichtige Werkzeuge der Zellen zum Abstimmen von intra- und extrazellulären Prozessen.<sup>[32]</sup>

Durch die Bindung eines Liganden an ein entsprechendes Integrin werden Signalübertragungswege gestartet, die für die Aktivierung von Tyrosin- und Serin/Threonin-Kinasen, für die Erhöhung der Calcium-Ionen-Konzentration und die verstärkte

Bildung von Phosphatidyl-Inositol-, „messenger“ Substanzen sorgen. Die genauen einzelnen Mechanismen sind dabei noch ungeklärt.

## 2.5 RGD-Peptide

Die Triade RGD (Arg-Gly-Asp) dient vielen Integrinen als eine primäre Erkennungssequenz für Proteine der extrazellulären Matrix. Peptide, welche diese Sequenz enthalten, können somit die Liganden dieser Integrine nachahmen und daher an diese binden. Lineare RGD-Peptide zeigen eine niedrige Affinität zu vielen Integrinen, jedoch führt eine Kopf-Schwanz-Cyclisierung bei Penta- und Hexapeptiden zu einer konformationellen Einschränkung, so daß die Bindungsfähigkeit zu einigen Integrinen erhöht wird. Bei entsprechender Auswahl der Aminosäuren, die die RGD-Sequenz flankieren, können Peptide synthetisiert werden, die selektiv an bestimmte Integrine bzw. Integringruppen binden und somit inhibieren.<sup>[33-35]</sup>

Aufgrund der Tatsache, daß RGD-Peptide selektive Antagonisten für Integrine sind, werden sie bzw. von ihnen abgeleitete Peptidomimetika hinsichtlich ihrer medizinischen Relevanz erforscht. So wird z. B. das Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , das sehr häufig von Tumorzellen exprimiert wird und eine Schlüsselrolle in dem Mechanismus des invasiven Tumorwachstums besitzt, von dem Peptid c(RGDfV) gut inhibiert.<sup>[33,36,37]</sup> Weiterhin werden cRGD-Peptide oder von ihnen abgeleitete Peptidomimetika als Inhibitoren für die Angiogenese bei Tumorerkrankungen und bei der Osteoporose eingesetzt.<sup>[38,39]</sup>

## 2.6 Matrixmetalloproteinasen (MMP)

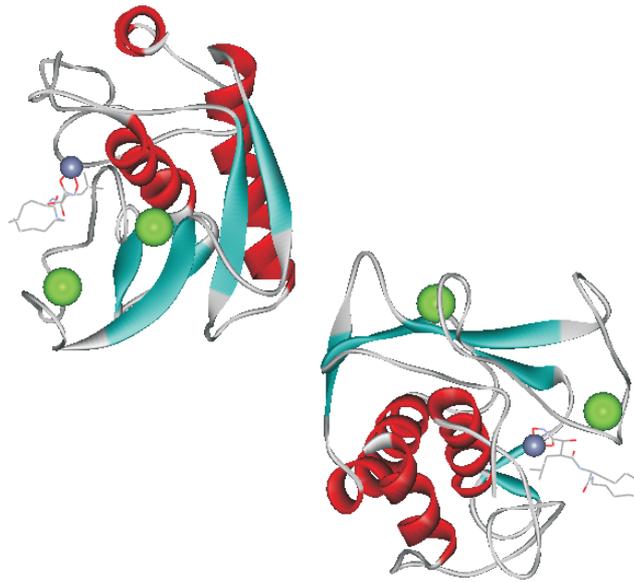
Die Matrixmetalloproteinasen sind Endopeptidasen, die in ihrem aktiven Zentrum ein Zink(II)-ion besitzen, welches essentiell für den Katalysemechanismus ist.<sup>[41]</sup> Ihr

**Tabelle 2.2:** Klassifizierung einiger humaner Matrixmetalloproteinasen.<sup>[40]</sup>

<b>Kollagenasen</b>	Fibroblasten Kollagenase	MMP-1
	neutrophile Kollagenase	MMP-8
	Kollagenase-3	MMP-13
<b>Gelatinasen</b>	Gelatinase A (72 kDa)	MMP-2
	Gelatinase B (92 kDa)	MMP-9
<b>Stromelysine</b>	Stromelysin-1	MMP-3
	Stromelysin-2	MMP-10
	Stromelysin-3	MMP-11
	Metalloelastase	MMP-12
	Matrilysin	MMP-7
<b>membranständige MMPs</b>	MT1-MMP	MMP-14
	MT2-MMP	MMP-15
	MT3-MMP	MMP-16
	MT4-MMP	MMP-17

Wirkungsbereich ist die extrazelluläre Matrix. Bei den MMP handelt es sich um sekretorische Enzyme, die Peptidbindungen innerhalb einer Polypeptidkette hydrolysieren. Bis heute sind 21 Mitglieder der MMP-Familie beim Menschen identifiziert und charakterisiert worden (Tab. 2.2). Neben den MMPs sind in den letzten Jahren weitere Metalloproteinasen entdeckt worden. Zu ihnen gehören unter anderem die ADAMs (Kap. 2.7), die über eine zusätzliche Disintegrin-Domäne verfügen.<sup>[42]</sup>

Die meisten MMPs werden als inaktive Proform (Zymogene) in den extrazellulären Raum sezerniert, wo sie dann entsprechend aktiviert werden. *In vitro* erfolgt eine Aktivierung unter anderem durch chaotrope Reagenzien (Natriumthiocyanat, NaSCN), durch Detergentien (SDS) oder durch Quecksilber- und Schwefelverbindungen.<sup>[43]</sup> Dieser Aktivierungsmechanismus wird als „cysteine-switch“ bezeichnet (Abb. 2.15). Dabei wird die Bindung eines Cysteins zum Zinkion gelöst, was eine



**Abbildung 2.14:** Röntgenstrukturanalyse der neutrophilen Kollagenase, als Inhibitor/Enzym-Komplex kristallisiert. Bei dem Inhibitor handelt es sich um 3-Formyl-2-hydroxy-5-methyl-*N*-hydroxy-hexansäureamid (Brookhaven Databank: 1KBC).

Veränderung der Tertiärstruktur zur Folge hat. Anschließend lagert sich ein Wassermolekül an das Zinkion an. Diese voraktivierte MMP gelangt nach einer autokatalytischen Spaltung der Prodomäne zu ihrer katalytisch aktiven Form. Die Aktivierung durch Proteinasen wie Plasmin, Trypsin und Kallikrein verläuft ähnlich. Durch die Spaltung werden Strukturänderungen verursacht, die das katalytische Zentrum öffnen, so dass nach Anlagerung eines Wassermoleküls die Prodomäne autokatalytisch abgespalten wird.<sup>[44, 45]</sup>

Der fehlregulierte Abbau der ECM-Komponenten, der zu pathologischen Prozessen führt, wird auf ein Ungleichgewicht zwischen den endogenen „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMP) und den MMPs zurückgeführt. Die Ursache für dieses Ungleichgewicht kann sowohl in der Überexpression von Matrixmetalloproteinasen liegen, die zu erhöhten MMP-Konzentrationen in der ECM führt, als auch auf eine

TIMP-Über- bzw. TIMP-Unterexpression zurückzuführen sein.<sup>[46,47]</sup>

Aufgrund dieser Tatsache wurden MMP-Inhibitoren in letzter Zeit genauer untersucht, da sich hier neue therapeutische Ansätze zur Behandlung von Krankheiten verprochen wurden, die mit einer Veränderung der ECM einhergehen. Die MMPs spielen außerdem eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese, die für das Tumorstadium eine wichtige Voraussetzung darstellt.<sup>[48]</sup> Könnte diese verhindert werden, so würde das Wachstum des Tumors begrenzt und eventuell rückgängig gemacht werden.

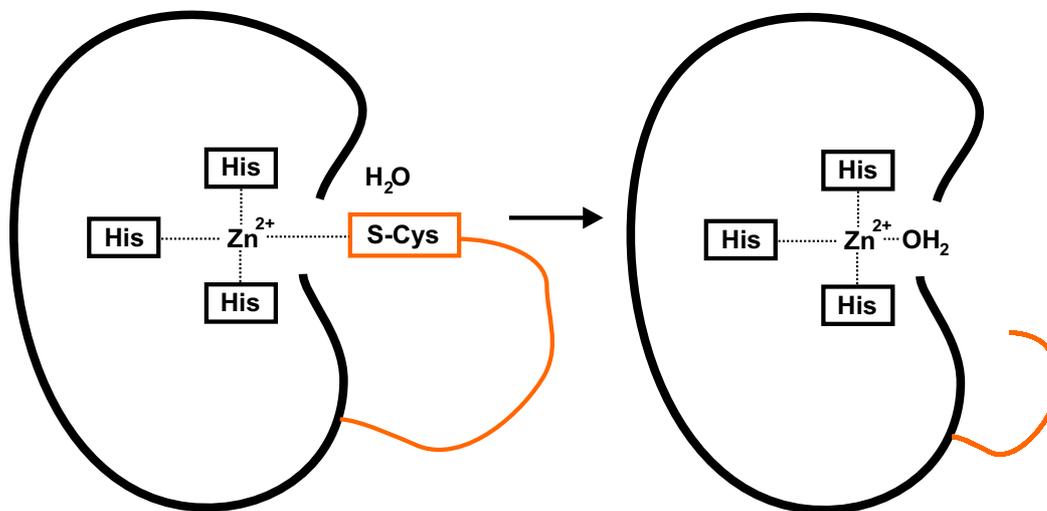


Abbildung 2.15: Aktivierungsmechanismus von MMPs.<sup>[43]</sup>

## 2.7 ADAMs

ADAM bedeutet „A Disintegrin and Metalloprotease“. Bisher sind 34 Mitglieder der ADAM-Familie bekannt. Sie treten als membranverankerte Glykoproteine an der Zelloberfläche auf und bestehen aus einer komplexen Domänenstruktur, die eine Metalloproteinase-, eine Disintegrin-, eine cysteinreiche Domäne, sowie einen transmembranen und cytoplasmatischen Teil beinhaltet (Tab. 2.3).<sup>[49]</sup>

**Tabelle 2.3:** Die ADAM-Domänen und ihre bekannten Funktionen.<sup>[50]</sup>

Domäne	Funktion
Prodomäne	blockiert Proteinaseaktivität
Metalloproteinase	Proteinaseaktivität
Disintegrin	Zelladhäsion
Cysteinreiche	Zelladhäsion
EGF-ähnliche	stimuliert Membranfusion
cytoplasmatischer Teil	bindet Proteinkinase C

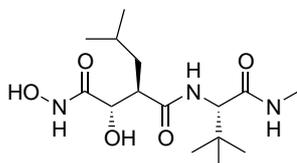
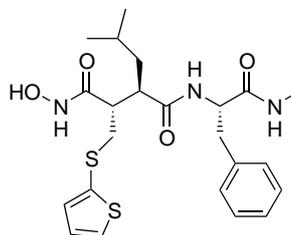
Die ADAMs bilden eine große Gruppe, die sowohl als Zelladhäsionsmoleküle als auch als Proteinase fungieren.<sup>[51]</sup> Die Fähigkeiten, eine wichtige Rolle in Reifungsprozessen von Spermien, bei der Myogenese, bei der Neurogenese sowie bei Zelladhäsions- und Zellfusionsprozessen zu übernehmen, machen sie derzeit zu einem interessanten Forschungsgegenstand, wobei die einzelnen Mechanismen noch ungeklärt sind. Die Metalloproteinase-Domäne gliedert sie in die Superfamilie der zinkabhängigen Proteasen ein (Metzincine). Die Hälfte der ADAMs enthält im katalytischen Zentrum der Metalloproteinase-Domäne ein konserviertes Sequenzmotiv, das auch bei den MT-MMPs auftaucht. Die ADAMs werden ähnlich den MMPs als inaktive Proformen sezerniert. Sie werden ebenfalls über den „cystein-switch“-Mechanismus aktiviert.<sup>[52]</sup>

Im Gegensatz zu den MMPs, insbesondere den MT-MMPs, die von den bisher vier bekannten TIMPs gleichermaßen gehemmt werden, ist eine Inhibierung der proteolytischen Aktivität der ADAMs selektiv; z. B. wird ADAM12 nur von TIMP-3 gehemmt.<sup>[49]</sup> Von ADAM8 und ADAM9 ist bekannt, daß sie nicht von den TIMPs, jedoch von synthetischen Inhibitoren des Hydroxamat-Typs gehemmt werden.<sup>[49]</sup> Marimastat **7** und Batimastat **8** (s. Seite 25) sind deshalb häufig eingesetzte Verbindungen für Untersuchungen an diesen ADAMs.

ADAM9 zeigt eine Substratspezifität, die vergleichbar ist mit der von MMPs. So schneidet es ein von TNF- $\alpha$  abgeleitetes Peptid an ähnlichen Stellen wie MMP-9.<sup>[52-54]</sup>

ADAMs können an Integrine binden. Von humanem ADAM15 ist bekannt, daß es eine RGD-Sequenz innerhalb des Integrinbindungsmotivs enthält. In Experimenten wurde gezeigt, daß sie an die Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_5\beta_1$  bindet.<sup>[55,56]</sup>

## 2.8 Der synthetische MMP-Inhibitor Marimastat

**7****8**

Synthetische MMP-Inhibitoren, wie z. B. Hydroxamsäure-Inhibitoren, sind kleine Moleküle ( $M < 600$  g/mol), die spezifisch mit dem katalytischen Zentrum der MMPs wechselwirken und auf diese Weise inhibieren. Diese MMP-Inhibitoren werden für Studien zur Behandlung von malignen Tumoren eingesetzt. Ziel ist es hierbei, das Tumorstadium einzuschränken, indem zum einen das invasive Wachstum gestoppt bzw. gebremst wird, während zum anderen die vom Tumor induzierte Angiogenese (Neubildung von Blutgefäßen) unterbunden wird, so daß er in seiner Größe begrenzt bleibt oder idealerweise abstirbt.

Die Verwendung von Breitband-Inhibitoren wie Marimastat **7** (British Biotech BB-2516) und Batimastat **8** (British Biotech BB-94), die unspezifisch im nanomolaren Bereich inhibieren (s. Tab. 2.4), führt aber leider auch zur Inhibition der MMPs, die für die normale Gewebeum- und Gewebeneubildung notwendig sind. In klinischen

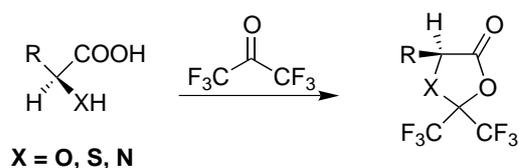
**Tabelle 2.4:** IC<sub>50</sub>-Werte für Marimastat **7** und Batimastat **8** gegen einige MMPs.<sup>[57,58]</sup>

	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-8	MMP-9	MMP-14
Marimastat <b>7</b>	5 nM	6 nM	200 nM	2 nM	3 nM	2 nM
Batimastat <b>8</b>	10 nM	4 nM	20 nM	10 nM	1 nM	3 nM

Studien klagten Probanden deshalb über starke Muskelschmerzen; in einigen Fällen erlitten die Versuchspersonen auch den Tod. Die klinischen Studien an **8** wurden sowohl aus diesem Grund, als auch wegen seiner geringen Wasserlöslichkeit, was eine orale Medikation unmöglich macht, abgebrochen. Das wesentlich besser lösliche **7** wurde hingegen noch eine längere Zeit in klinischen Studien an einigen malignen Tumorerkrankungen in Nordamerika eingesetzt.<sup>[40]</sup>

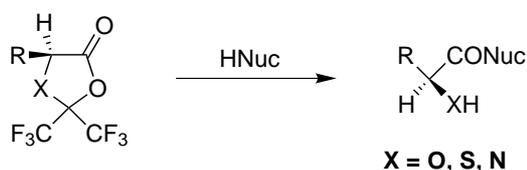
## 2.9 Hexafluoraceton als Schutzgruppe

$\alpha$ -funktionelle Carbonsäuren reagieren mit Hexafluoraceton unter Bildung eines Fünfringheterozyklus. Das Hexafluoraceton reagiert dabei so schnell, daß die Reaktion unter milden Bedingungen geführt werden kann. Dabei entstehen 1,3-Dioxolan-5-one in guten Ausbeuten. Diese Produkte zeichnen sich durch eine hohe thermische Stabilität aus, was bei der Aufreinigung und Handhabung von Vorteil ist.<sup>[59]</sup>



Die Schutzgruppe kann durch Hydrolyse bzw. durch Reaktion mit einem beliebigen Nucleophil wieder abgespalten werden. Durch geeignete Wahl dieser Nucleophils kann unter gleichzeitiger Abspaltung des Hexafluoracetons eine Derivatisierung erreicht werden. Je höher die Nucleophilie des angreifenden Reagenzes, desto milder können

die Reaktionsbedingungen gewählt werden. Beispielsweise können Aminolysen schon bei Raumtemperatur durchgeführt werden, während Hydrolysen bzw. Alkoholysen erst bei höherer Temperatur erzielt werden. Dabei kann die Abspaltung mit der  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie verfolgt werden. Die Derivate chiraler Aminosäuren enthalten diastereotope  $\text{CF}_3$ -Gruppen, die als zwei Quartetts erscheinen. Dagegen zeigt das freigesetzte Hexafluoracetonhydrat nur ein hochfeldverschobenes Singulett. Somit läßt sich eine Vielzahl von neuen Verbindungen bequem synthetisieren.<sup>[60,61]</sup>

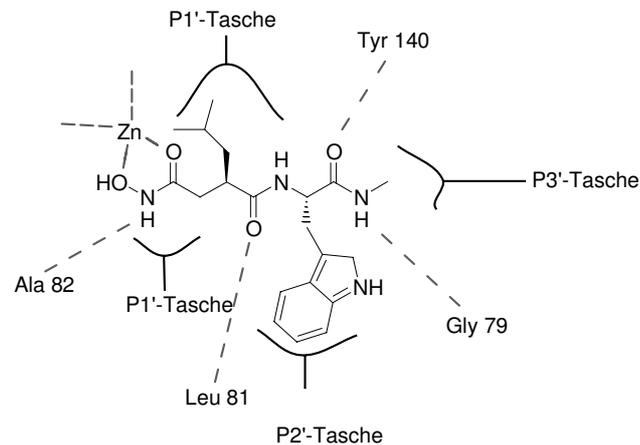


Als Schutzgruppenreagenz bietet Hexafluoraceton folgende Vorteile:

- Hexafluoraceton ist ein zweizähniges Schutzgruppenreagenz, der Schutz der Carboxylgruppe und der  $\alpha$ -ständigen Funktion gelingt in einem Schritt.
- Der Schutz ist selektiv für die  $\alpha$ -Position, damit bleiben weitere im Molekül vorhandenen Funktionen intakt.
- Durch das Vorhandensein des elektronenziehenden Effektes der Trifluormethylgruppen ist der Lactonring aktiviert. Damit gelingt die Abspaltung der Schutzgruppe unter milden Bedingungen.
- Die Abspaltung erfolgte in allen bisher untersuchten Beispielen racemisierungsfrei.

## 2.10 Strategie zur Immobilisierung eines Hydroxamsäure-Inhibitors

Um einen Hydroxamsäure-Inhibitor immobilisieren zu können, muß dieser an einer Stelle mit einem Linker versehen werden. Eine solche Veränderung darf aber nicht mit einer Verschlechterung der Bindungsaffinität des Inhibitors einhergehen. Daher bedarf es einer eingehenderen Beschäftigung mit den Bindungs- und Strukturmodellen von Inhibitor/MMP-Komplexen. Es gilt zu verstehen, wie eine MMP durch einen Inhibitor gehemmt wird, d. h. wie die räumliche Anordnung des Inhibitors im aktiven Zentrum erfolgt.

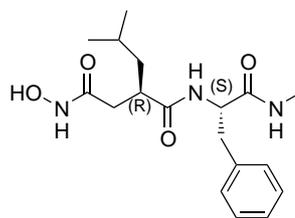
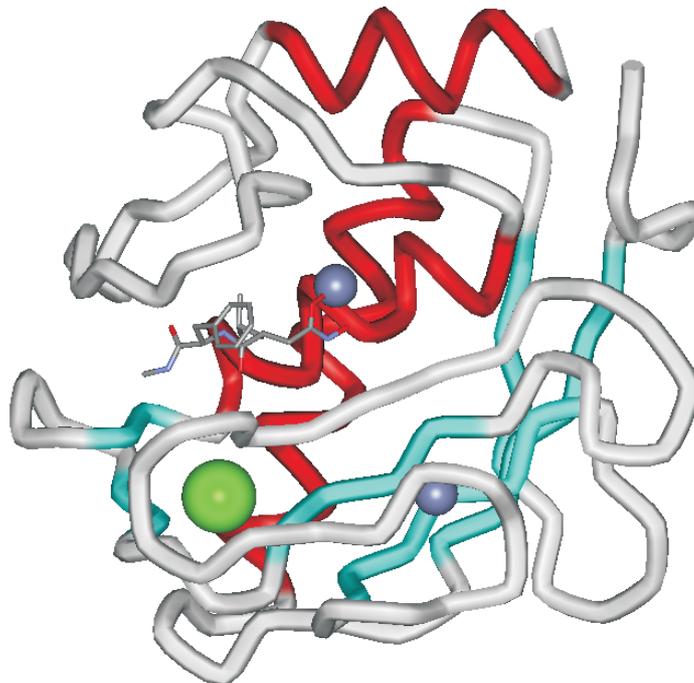


**Abbildung 2.16:** Schematischer Ausschnitt aus dem aktiven Zentrum einer Kollagenase aus Fibroblasten mit den Bindungsstellen des gezeigten Inhibitors.<sup>[48]</sup>

Bei diesen Inhibitoren handelt es sich um pseudopeptidische (peptidomimetische) Substratanaloga. In Abb. 2.16 ist ein vorhergesagtes Bindungsmodell wiedergegeben. Dieses wurde aus Röntgenstrukturdaten und „Modelling“-berechnungen erhalten.<sup>[48]</sup> Es zeigt, wie die Bindungswechselwirkungen in einer MMP beispielhaft zu verstehen sind.

## 2.10 Strategie zur Immobilisierung eines Hydroxamsäure-Inhibitors 29

Für eine gute Wechselwirkung und damit gute Inhibierung der MMP hat sich herausgestellt, daß die P1'- und P2'-Seitentaschen mit großen sperrigen und hydrophoben Substituenten ausgefüllt werden müssen. Die Hydroxamsäuregruppe koordiniert dabei an das Zn(II)-ion.<sup>[48,62,63]</sup>



9

**Abbildung 2.17:** Neutrophile Kollagenase im Komplex mit Inhibitor 9 (Brookhaven datbank: 1MNC).

Da noch keine Röntgenstrukturdaten eines MMP/Marimastat-Komplexes zur Verfügung stehen, sind Röntgenstrukturen von Komplexen mit strukturell homologen Inhibitoren verglichen worden. Dabei zeigen sich signifikante Übereinstimmungen bei den Strukturen der MMP/Inhibitor Komplexe. Die einzelnen Hydroxamsäure-Inhibitoren verhalten sich also bei ihren hydrophoben Bindungen sowie bei den Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen analog zueinander.

Es liegt nahe, daß die Bindung über gleiche bzw. ähnliche Wechselwirkungen erfolgt und die räumlichen Positionen der Inhibitoren sich gleichen, sofern die Inhibitoren ebenfalls strukturell vergleichbar sind.<sup>[48,62]</sup>

In Abb. 2.17 ist das Modell aus der Röntgenstrukturanalyse eines dem Marimastat **7** strukturell sehr ähnlichen Inhibitors **9** gezeigt. Bei der Betrachtung fällt auf, daß der „C-terminale“-Bereich des Inhibitors, die *N*-Methylamidgruppe, frei zugänglich ist. Eine Funktionalisierung, die an dieser Position durchgeführt wird, sollte die Bindungsaffinität des Inhibitors zu einer MMP nicht negativ beeinflussen.

## 2.11 Oberflächenplasmonresonanz

Sensoren, die auf der Basis von Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance, SPR) arbeiten, erfreuen sich wegen ihrer hohen Empfindlichkeit und einfachen Bauweise einer zunehmenden Beliebtheit.<sup>[64]</sup> In den letzten Jahren wurde diese Technologie besonders weit entwickelt. Mit SPR lassen sich Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen über eine Änderung des Brechungsindex messen.<sup>[65]</sup> Die Änderungen können bei einer Genauigkeit von  $10^{-5}$  mit einer zeitlichen Auflösung von wenigen Sekunden noch gemessen werden. Bedingt durch die Funktionsweise des Oberflächenplasmonresonanzeffekts ist der detektierbare Bereich auf einen Abstand von ca. 200 nm zur Oberfläche begrenzt. Damit ist die SPR ein probates Mittel, um Bindungen an Oberflächen zu messen. Die Hauptanwendungsgebiete der SPR

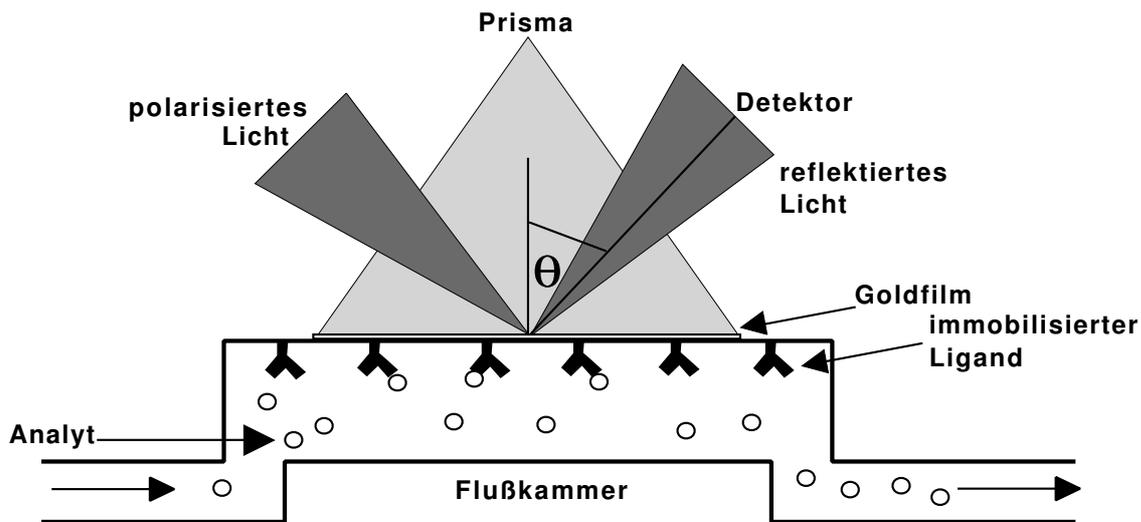


Abbildung 2.18: Schematischer Aufbau eines Oberflächenplasmonresonanzsystems.

sind die Detektion und Identifikation von biologischen Analyten und die biophysikalische Analyse von biomolekularen Interaktionen. In Tabelle 2.5 sind die derzeitigen Anwendungsgebiete der SPR zusammengefasst.

Tabelle 2.5: Anwendungsgebiete von SPR-Biosensoren.<sup>[66]</sup>

qualitative Methoden	quantitative Methode
Ligandenfischen	Affinitäten
Spezifität von Interaktionen	Kinetik einer Interaktion
„Screening“	Bindungsmechanismen
Leitstruktur-Optimierung	
Epitop-Mapping	Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationskonstanten

Die Bindung von Molekülen auf einer Oberfläche eines SPR-Sensors kann in Echtzeit verfolgt werden, wenn der Brechungsindex des Adsorbens deutlich verschieden von der umgebenden Lösung ist. Für einen selektiven chemischen bzw. biochemischen Sensor muß die Oberfläche mit selektiven Rezeptoren (Liganden) für die entspre-

chenden Moleküle versehen werden.<sup>[64-68]</sup> Durch SPR-Interaktionsstudien zwischen immobilisierten Liganden und zugehörigen Analyten werden wertvolle Informationen über die Wechselwirkungen dieser beiden Bindungspartner erhalten.

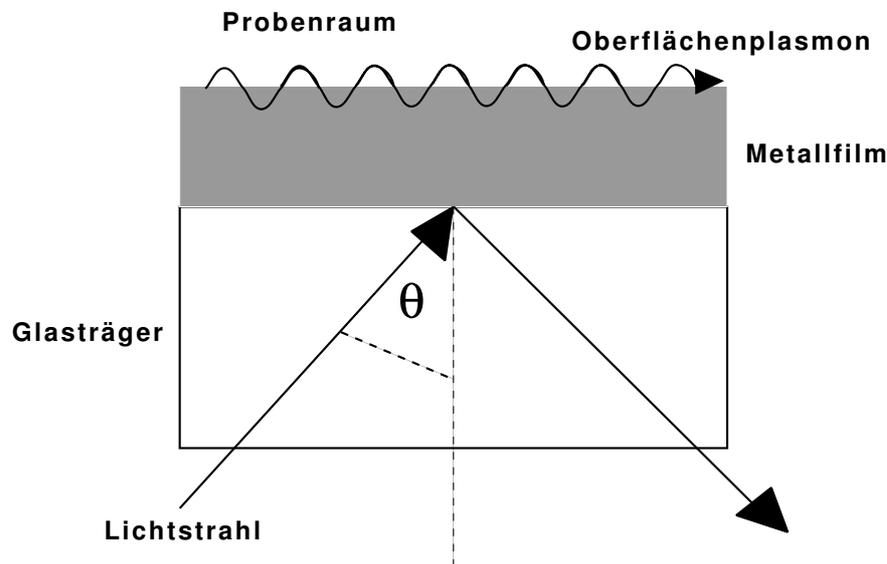


Abbildung 2.19: Prinzip der SPR-Sensoren.

In Abbildung 2.19 ist das der SPR zugrundeliegende Prinzip gezeigt. Der SPR-Sensor besteht aus einem optisch transparenten Substrat (Glassträger), das mit einer dünnen (ca. 50 nm) Edelmetallschicht beschichtet ist. Die flüssige Phase, die sich im Probenraum befindet, ist im Kontakt mit der Metalloberfläche. Oft ist die Metalloberfläche beschichtet, so daß die Immobilisierung der Interaktionspartner nicht zwingenderweise direkt am Metall stattfinden muß. Wird die Oberfläche mit linear polarisiertem Licht bei totaler Reflexion bestrahlt, so findet ein Energietransfer von den Photonen zu den freien Elektronen des Metalls statt, die daraufhin mit einer Oszillation beginnen. Dabei wird ein elektromagnetisches Feld (Oberflächenplasmonwelle) erzeugt, das in ein dielektrisches Medium auf der Metalloberfläche propagiert. Ein Teil der Energie des eingestrahlt Lichtes geht bei der Entstehung des Oberflächenplasmons verloren, was eine Änderung des Reflexionswinkels  $\theta$  verursacht. Dieser Effekt wird Oberflächenplasmonresonanz genannt.<sup>[64]</sup> Beim Entstehen

der Oberflächenplasmonwelle ändert sich der Winkel des reflektierten Lichtes aufgrund des Energietransfers. Aus der Lösung kann nun eine Bindung stattfinden. Eine Massenzunahme auf der Oberfläche des Sensors verursacht eine korrespondierende Zunahme des Brechungsindex. Dadurch wird der Winkel für die Totalreflexion  $\theta$  verändert, der notwendig ist, um die Oberflächenplasmonresonanz zu verursachen.

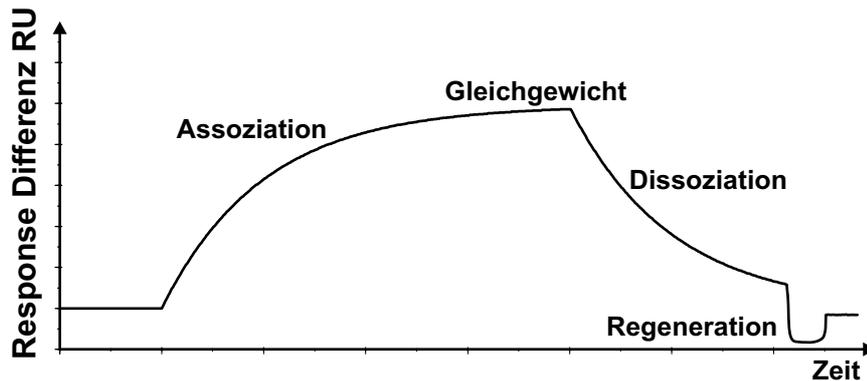


Abbildung 2.20: Beispielsensorgramm.

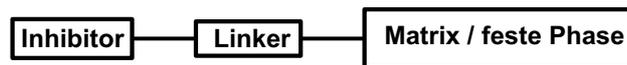
In Abbildung 2.20 ist ein typisches Sensorgramm gezeigt. In diesem ist die „response difference“, die als „response unit (RU)“ angegeben wird, gegen die Zeit aufgetragen. Die Response Differenz gibt die relative Änderung im Brechungswinkel  $\theta$  an. Das derzeit kleinste messbare Signal ist eine Änderung von 1 RU, welches einer Bindung von  $1 \text{ pg/mm}^2$  entspricht. Die untere Detektionsgrenze liegt bei ca. 200 D, wobei die Geräte bis zu einer unteren Konzentrationsgrenze von  $10^{-11} \text{ mol/l}$  sensitiv sind.

Vor Zugabe der Probe sollte die Basislinie möglichst konstant bleiben. Wird nun die zu analysierende Lösung hinzugefügt, so steigt die „response“ an, wenn eine Bindung stattfindet. Dies geschieht bis zum Erreichen eines Gleichgewichtes. Handelt es sich um eine schwache Bindung, so erfolgt nach Beendigung der Zugabe der Lösung eine langsame Dissoziation, die als abfallende Kurve zu erkennen ist. Fällt die „response“ nicht auf das Niveau der Basislinie zurück, so muß vor der nächsten Messung der Sensor regeneriert bzw. erneuert werden.

Die Vorzüge der SPR-Biosensoren lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Bindungsreaktionen können in Echtzeit verfolgt werden.
- Es können direkte Aussagen über die Stabilität von Komplexen gemacht werden.
- Die Messungen können automatisiert werden, was eine höhere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bedeutet.
- Die Menge, die für eine Analyse benötigt wird, beträgt nur ca. 1  $\mu\text{g}$ .
- Kinetische Studien können durchgeführt werden.
- Praktisch alle Biomoleküle können mit SPR-Messungen analysiert werden.

#### Affinitätschromatographie / BIAcore "microrecover"

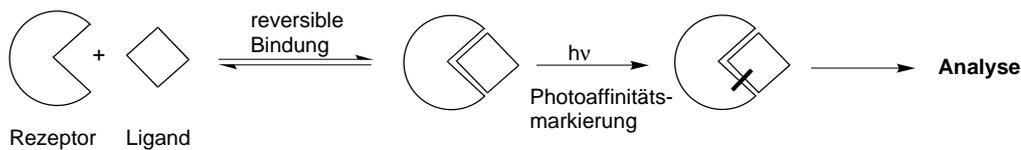


**Abbildung 2.21:** Schematische Darstellung für die Anwendung eines immobilisierten Inhibitors.

SPR-Studien sind hinsichtlich ihres Einsatzes für die funktionelle Proteomik überprüft worden, da direkte Aussagen über die Bindung von Proteinen untereinander erhalten werden, womit wiederum ein Einblick in die Proteinnetzwerke eines Organismus möglich wird. Bei der Verwendung von immobilisierten reversibel bindenden Liganden/Inhibitoren werden „micro-recover“-Experimente möglich. Hierbei handelt es sich um eine Affinitätschromatographie in einem kleineren Maßstab, bei der sämtliche Prozesse in Echtzeit verfolgt werden können (Abb. 2.21). Nachdem das entsprechende Protein aus der Lösung an den immobilisierten Liganden gebunden hat, wird eine Elution durchgeführt, wobei anschließend das aufgefangene Eluat massenspektrometrischen Untersuchungen zugänglich ist. Ziel solcher Untersuchungen ist es z. B. durch Verwendung eines unspezifischen, breitbandigen Liganden für

eine bestimmte Proteinfamilie bisher unentdeckte Proteine dieser Familie zu finden. Auf diese Weise ließen sich zahlreiche Proteine einer Proteinklasse isolieren und dann charakterisieren.

## 2.12 Photoaffinitätsmarkierung

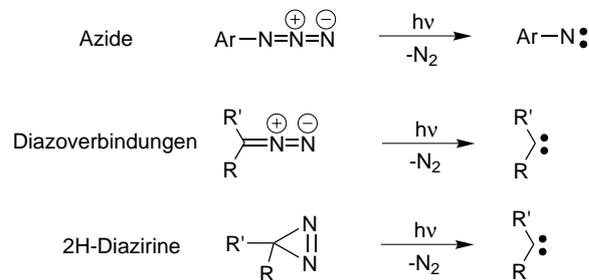


**Abbildung 2.22:** Grundprinzip der Photoaffinitätsmarkierung.

Die Photoaffinitätsmarkierung ist eine Methode, die für die Identifizierung und Lokalisierung von makromolekularen Rezeptoren eingesetzt werden kann. In Abbildung 2.22 ist schematisch das Grundprinzip gezeigt. Für die Photoaffinitätsmarkierung wird ein lichtaktivierbares Analogon eines natürlichen Liganden benötigt. Nach Inkubation des Liganden mit dem Rezeptor, üblicherweise einem Protein, wird beim Bestrahlen eine reaktive Molekülspezies gebildet, die dann irreversibel an die Bindungsstelle des Rezeptors bindet (Abb. 2.22). Ist der Ligand zusätzlich mit einer Reportergruppe (radioaktiver Marker oder Farbstoff) versehen, so läßt sich nach Denaturierung eine Analyse des markierten Proteins durchführen. Wird das Protein einem Trypsin-Verdau mit anschließender Sequenzanalyse unterworfen, so kann, wenn der Ligand am aktiven Zentrum bindet, eine Aussage darüber gemacht werden, welches Fragment das aktive Zentrum beinhaltet.<sup>[69]</sup>

Die Kombination der Photoaffinitätsmarkierung mit reversibel bindenden Liganden eröffnet eine neue Möglichkeit für die funktionelle Proteomanalyse. Ein Gewebs-homogenisat wird dabei mit einer entsprechenden Sonde, die zusätzlich über eine Reportergruppe verfügen sollte, inkubiert und anschließend bestrahlt, wobei eine

kovalente Bindung zwischen dem Liganden und dem Zielprotein entsteht. Dieses präparierte Homogenisat kann mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt werden. Die von der Sonde erkannten Proteine lassen sich dann über die Reportergruppe auffinden und analysieren. Bei der Verwendung von nicht vorfraktionierten Gewebshomogenisaten muß aber beachtet werden, daß es vor der Bestrahlung zu unspezifischen Wechselwirkungen kommen kann, so daß auch Proteine markiert werden, die keine Rezeptoren für den entsprechenden Liganden sind. Daher sollte vorher eine Fraktionierung des Homogenisats stattfinden, z. B. mit Ionenaustausch- oder Affinitätschromatographie.<sup>[70]</sup>



**Abbildung 2.23:** Typische Verbindungen als Vorstufen für reaktive Spezies bei der Photoaffinitätsmarkierung.

In Abb. 2.23 sind einige häufig benutzte photoreaktive Gruppen wiedergegeben. Diese Verbindungen setzen beim Bestrahlen Stickstoff frei, so daß Carbene oder Nitrene als reaktive Spezies entstehen, die dann mit einem entsprechenden Rezeptor eine kovalente Bindung eingehen. Die Beliebtheit dieser Verbindungen beruht aber mehr auf ihrer chemischen Stabilität im Dunkeln und ihrer relativ einfachen Synthese als auf ihren intrinsischen photochemischen Eigenschaften. Die „aktivierten“ Zwischenprodukte reagieren bei Photoaffinitätsmarkierungsexperimenten unterschiedlich, so finden z. B. unspezifische Einschubreaktionen mit einer beliebigen Aminosäure oder mit dem Lösungsmittel statt. Weiterhin bleiben die aktivierten Spezies solange reaktiv bis sie entweder vollständig abreagiert sind oder ein Radikalfänger zugesetzt worden ist. Diese relativ langen Reaktionszeiten führen dann vermehrt zu einer un-

spezifischen Markierung von Proteinen.<sup>[69]</sup>

Für eine erfolgreiche Markierung müssen daher folgende Bedingungen erfüllt sein:

- Um unspezifische Markierungen weitgehend auszuschliessen, sollte der Ligandüberschuß möglichst klein sein.
- Der reaktive Übergangszustand sollte möglichst kurzlebig sein.
- Es sollten vorgereinigte Proteine verwendet werden.

An den Photoaffinitätsmarker werden für den sinnvollen, präparativen Einsatz hohe Anforderungen gestellt:<sup>[70]</sup>

- Generell sollte die photoreaktive Gruppe eine hohe Stabilität bei normalem Tageslicht aufweisen.
- Der photochemisch angeregte Zustand sollte kurzlebiger sein als die Dissoziation des Komplexes Rezeptor/Ligand.
- Die Photochemie sollte nur ein kovalentes Addukt liefern.
- Die Aktivierungswellenlänge sollte größer sein, als die Absorptionswellenlänge des Proteins ( $> 300$  nm).
- Die aktivierte Spezies sollte nur mit C-H-Gruppen oder aber nucleophilen X-H-Bindungen reagieren.

Das letzte Kriterium ist entscheidend für den Erhalt von stabilen kovalenten Bindungen. Dadurch sollen Reaktionen mit dem wäßrigen Solvens oder anderen unspezifischen Gruppen vermieden werden.

Als eine ideale photoreaktive Gruppe hat sich Benzophenon herausgestellt. Die Aktivierung mit Licht ist reversibel. Sobald die Bestrahlung bei 350 nm beendet wird,

relaxiert die aktivierte Spezies in den nicht-aktiven Grundzustand zurück, ein Zusatz von Radikalfängern ist also nicht notwendig. Es werden von der aktiven Spezies nur C-H-Bindungen markiert, die sich in relativ kurzer Distanz zum Carbonylsauerstoff befinden. Benzophenon ist sehr stabil gegenüber den gängigsten protischen Solventien. Der diradikalische Tripletzustand hat aber nur eine kurze Lebensdauer in Gegenwart von protischen Solventien, so daß die Markierung bevorzugt im Proteininneren erfolgt.<sup>[71]</sup>

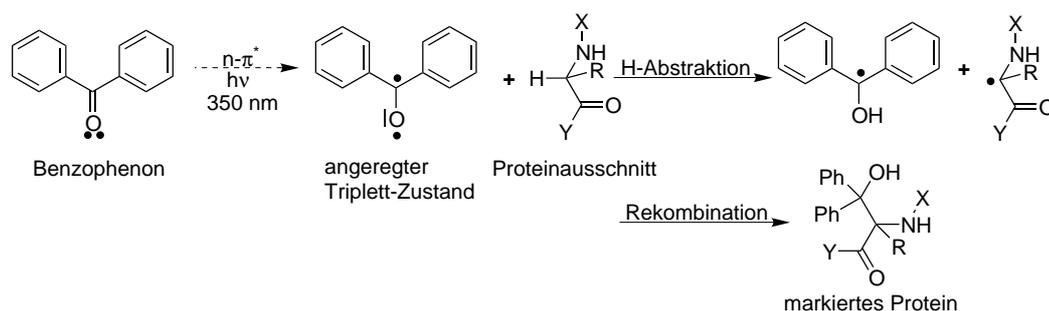


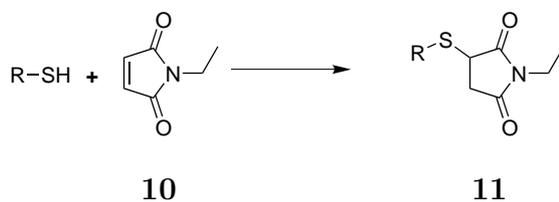
Abbildung 2.24: Photochemie des Benzophenonchromophors.<sup>[71]</sup>

Die Photochemie des Benzophenonchromophors ist in Abb. 2.24 wiedergegeben. Nach der Absorption entsteht ein diradikalischer Triplet-Zustand. In diesem reagiert das elektrophile n-Orbital mit einer schwachen  $\sigma$ -CH-Bindung des Proteins, wobei ein Wasserstoffatom abstrahiert wird, damit das n-Orbital vollständig besetzt ist. Das Ketyl und das Alkyradikal bilden anschließend eine neue C-C-Bindung, wobei ein Benzpinakol-Derivat entsteht.<sup>[71]</sup>

## 2.13 Marker für Sulphydrylgruppen

Viele Proteine enthalten essentielle Sulphydrylgruppen. Durch elektrophile Reagenzien lassen sich diese modifizieren und inhibieren. Ein beliebtes Reagenz für solche Experimente ist *N*-Ethylmaleimid (NEM) **10**, da es sowohl eine gute Wasserlöslichkeit als auch eine hohe Membranpermeabilität besitzt. So zeigen Untersuchungen von Sharp und Beechey *et al.* daß das Phosphattransportprotein in den mitochondrialen Membranen durch den Einsatz von NEM-Derivaten gehemmt werden kann. Aufgrund seiner Reaktivität wird NEM auch oft als Pufferzusatz in der Biochemie verwendet, da es mit dem Cystein in dem aktiven Zentrum der Cysteinproteasen reagiert, wodurch diese dann inhibiert werden können.<sup>[72,73]</sup> Abbildung 2.25 zeigt die Reaktion von NEM **10** mit einer Sulphydrylgruppe zum Addukt **11**.

Aufgrund seiner Fähigkeit, selektiv an Sulhydrylgruppen zu binden, sind Wirkstoffe/Inhibitoren mit Maleinimid derivatisiert worden. Diese Verbindungen wurden benutzt, um eine kovalente Verknüpfung des Wirkstoffs an seinem Wirkort zu erreichen, wovon sich eine längere Wirkdauer des Medikamentes versprochen wurde.<sup>[74]</sup>



**Abbildung 2.25:** Reaktion von NEM **10** mit einer Sulhydrylgruppe.



### 3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen derivatisierbare (immobilisierbare) Liganden für eine aktivitätsbasierte Markierung oder Isolierung von Proteinen synthetisiert werden. Damit können auf einer mechanistischen Basis familienspezifisch Subproteome generiert werden. Es ist entscheidend, daß die neuen Konstrukte über gleiche bzw. ähnliche Bindungseigenschaften/Aktivitäten wie die Ausgangsverbindungen verfügen. Zur Kontrolle sollen SPR-Studien hinsichtlich der Bindungseigenschaften durchgeführt werden. Die Oberflächenplasmonresonanz (SPR) ist eine Methode, die direkte Aussagen sowohl über die Aktivität als auch über die Funktion ausgewählter Peptide bzw. Proteine machen kann. Sie setzt allerdings voraus, daß ein geeigneter Ligand auf dem „Sensorchip“ immobilisiert ist.

Marimastat **7** (British Biotech Ltd.) ist ein Inhibitor für MMPs mit einem sehr breiten Wirkspektrum (Seite 25). Eine neue, optimierte Synthese soll ausgearbeitet werden, die es zusätzlich erlaubt, **7** mit einem geeigneten Linkermolekül für eine Immobilisierung an einer festen Phase zu versehen. Die Bindungseigenschaften des neuen Konstruktes sollen anhand von SPR-Studien überprüft werden. Über Affinitätschromatographie sollten sich im Idealfall neue, noch nicht entdeckte Metalloproteinasen entdecken lassen.

Für ein zweites Modellsystem soll ein derivatisiertes cyclisches RGD-Peptid synthetisiert werden, das ebenfalls über einen Linker an eine feste Phase immobilisiert werden kann. Von cyclischen RGD-Peptiden ist bekannt, daß sie eine hohe Affinität zu bestimmten Integrinen besitzen. Es gilt zu klären, ob in der Weise derivatisierte,

cyclische RGD-Peptide für die affinitätschromatographische Isolierung von RGD-abhängig bindenden Proteinen in Betracht kommen.

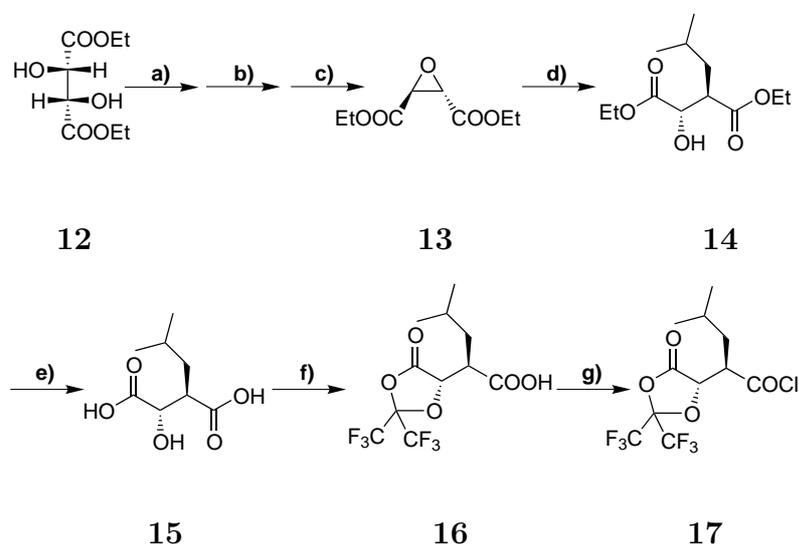
Die Probleme der unzureichenden räumlichen Auflösung der Proteine nach einer 2D-PAGE können durch funktionsbedingte Markierung einer Proteinfamilie mit Reportergruppen (Fluoreszenzfarbstoffe, Biotin, radioaktive Marker) gelöst werden. Es ist möglich, selektiv Proteine mit einem spezifischen Liganden vorher kovalent zu verknüpfen. Handelt es sich bei dem Liganden um einen irreversiblen Inhibitor, der eine stabile, kovalente Bindung zum aktiven Zentrum des Proteins ausbildet, so wird lediglich eine Reportergruppe am Liganden benötigt. Mit der Einführung einer Reaktivgruppe (z. B. Photoaffinitätsmarker) kann eine kovalente Bindung auch bei reversibel bindenden Liganden geknüpft werden. Die Tauglichkeit dieses Konzeptes wurde von Sewald und Hagenstein *et al.* an Markierungsexperimenten von Proteinkinasen gezeigt.<sup>[12]</sup>

Für die Detektion von MMPs auf einer 2D-PAGE sollen im Rahmen dieser Arbeit analoge Proteinsonden dargestellt werden. Dazu soll als reversibel bindender Ligand wiederum Marimastat **7** genutzt werden, das über einen Linker an einen Photoaffinitätsmarker und an eine Reportergruppe geknüpft wird. Nach der 2D-PAGE sollten sich dann Proteine des entsprechenden Typs mit Hilfe der Reportergruppe identifizieren und im Idealfall auch quantifizieren lassen.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

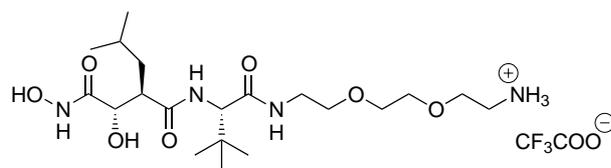
### 4.1 Synthese von Marimastat 7

#### 4.1.1 Synthese des Marimastat „building-blocks“



**Abbildung 4.1:** a) 33 % HBr/AcOH, RT, 4.5 h, 66 %; b) 33 % HBr/AcOH, EtOH, 70 °C, 4 h, 82 %; c) NaOEt, EtOH, 0 °C, 1 h, 79 %; d) Isobutylmagnesiumbromid, CuCN, Et<sub>2</sub>O, -30 °C, 1 h, 46 %; e) NaOH, 1,4-Dioxan/H<sub>2</sub>O, RT, 16 h, 90 %; f) Hexafluoracetone, DMSO, RT, 3 h, 84 %; g) SOCl<sub>2</sub>, 6 h, 80 °C, 96 %.<sup>[75]</sup>

Im Rahmen der Diplomarbeit wurde eine Festphasensynthese für das Marimastat-Derivat **18** ausgearbeitet, welches durch einen vorhandenen Linker an einer festen Phase immobilisiert werden kann. Die Synthese stützt sich auf das hexafluoracetonegeschützte Säurechlorid **17** (Abb. 4.1), welches erstmalig synthetisiert wurde.<sup>[75, 76]</sup>



18

**17** ist durch eine „chiral-pool“-Synthese ausgehend von (–)-D-Diethyltartrat **12** zugänglich. Zunächst wird nach Mori *et al.* ein  $C_2$ -symmetrisches Epoxid **13** erhalten.<sup>[77]</sup> Dieses enthält 5–7 % des nicht gewünschten meso-Diastereomers, welches durch Flashchromatographie entfernt werden kann. Alternativ kann dieses Nebenprodukt auf einer späteren Stufe der Synthese mittels RP-HPLC entfernt werden. Das Epoxid **13** wird anschließend durch eine Ringöffnung mittels eines *in situ* erzeugten Grignardcuprates zu der Diesterverbindung **14** umgesetzt.<sup>[75,78]</sup> Nach Verseifung von **14** wird anschließend die  $\alpha$ -Hydroxysäure **15** erhalten, die mit Hexafluoraceton zu **16** umgesetzt wird. Verbindung **17** ist durch Reaktion mit Thionylchlorid zugänglich. Die Säurechloridgruppe ist dabei die Position mit der höchsten Elektrophilie, so daß an dieser Stelle eine alternative regioselektive Derivatisierung stattfindet. Auf diese Weise wurde das Marimastat-Derivat **18** zugänglich. Ein Nachteil der durchgeführten Festphasensynthese ist die erhaltene geringe Menge, so daß affinitätschromatographische Experimente nicht durchgeführt werden konnten.

#### 4.1.2 Darstellung der Vorstufen

Abb. 4.1 zeigt die Darstellung des ersten Fragmentes, welches für die Synthese von **7** notwendig ist. Das zweite Fragment *L-tert*-Leucin-*N*-methyramid **22** ist in drei Stufen zugänglich und wird als Trifluoroacetat-Salz erhalten (Abb. 4.2). Mit der neuen Synthesevariante konnte eine deutliche Ausbeutensteigerung erreicht werden. Boc-*L-tert*-Leucin **20** wird mit der neuen Synthesevariante in einer Ausbeute von 93 % erhalten, während die publizierte Synthese hier lediglich 64 % erreicht.<sup>[48,58]</sup> Für die



nosäuren bzw. Peptidfragmenten gute Resultate; außerdem zeigen Reaktionen mit EEDQ kaum Racemisierung der eingesetzten Aminosäuren.<sup>[82]</sup>

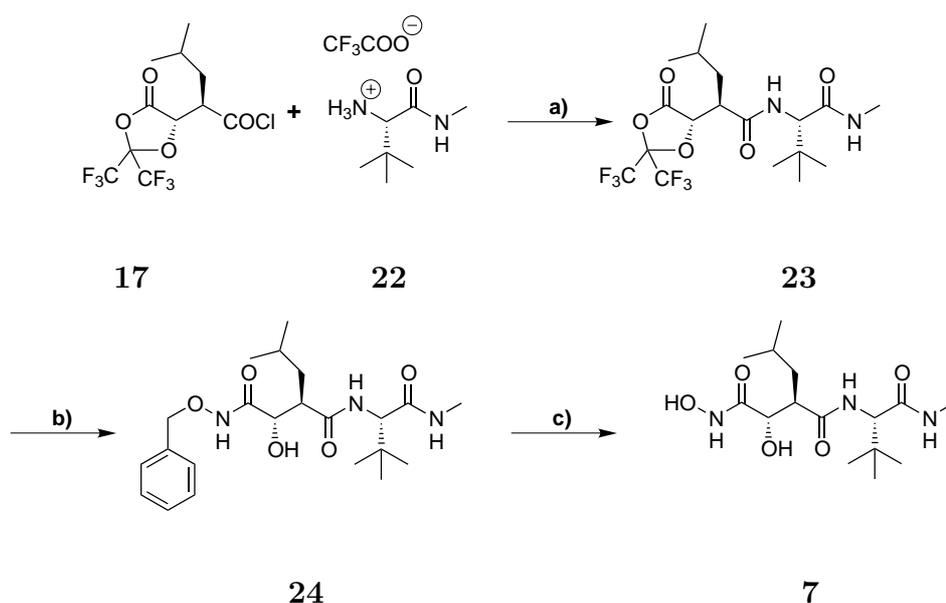
Wie sich gezeigt hat, ist die Umsetzung nicht vollständig, so daß das Produkt auf Grund von Mischfraktionenbildung mit dem Edukt nach fraktionierter Säulenchromatographie letztlich nur mit einer Ausbeute von 11 % erhalten wird.

### 4.1.3 Darstellung von Marimastat 7 (Methode 1)

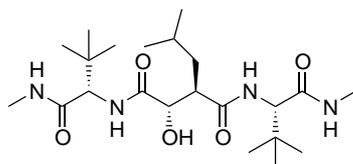
#### Kupplungsreaktion

In der Kupplungsreaktionen reagieren hexafluoracetongeschützte Säurechloride unter geeigneten Reaktionsbedingungen mit primären bzw. sekundären Aminen zu den entsprechenden Säureamiden. Es hat sich gezeigt, daß die Wahl der Reaktionstemperatur entscheidenden Einfluß auf den Erfolg der Reaktion und damit auf die zu erwartenden Ausbeuten hat. Weiterhin ist es notwendig, daß die zugesetzte Hilfsbase in jedem Fall mit dem Amin zusammen zugegeben wird, da sonst eine teilweise Zerstörung des Lactonringes auftritt. Da die von Burger *et al.* beschriebene Methode, die Aminokomponente bei -30 °C zu einem hexafluoracetongeschützten Säurechlorid in Ether zuzutropfen, bei der vorliegenden Reaktion nicht zum Erfolg geführt hat, wurden Optimierungsversuche durchgeführt. Hier gilt es allerdings zu beachten, daß sämtliche beschriebenen Kupplungsreaktionen mit hexafluoracetongeschützten Säurechloridderivaten der Äpfelsäure durchgeführt wurden, die im Gegensatz zu Edukt **17** keine Substitution am  $\beta$ -Kohlenstoff aufweisen (Abb. 4.3).<sup>[59-61]</sup>

Erste eigene Versuche, **17** mit *tert*-Leucin-*N*-methylanid **22** unter Standardbedingungen in Ether zu kuppeln, führten zu keinen befriedigenden Ergebnissen, was auf die mangelnde Löslichkeit des Salzes von **22** in Ether bei -30 °C zurückzuführen ist. Durch Zugabe einer Base, wie Triethylamin, konnte auch keine bessere Löslichkeit erreicht werden. Bei höheren Temperaturen ist das Edukt **22** zwar in Ether löslich,



**Abbildung 4.3:** a) THF,  $\text{NEt}_3$ ,  $-65\text{ }^\circ\text{C}$ , 1.5 h, 91 %; b)  $\text{BnONH}_2\cdot\text{HCl}$ ,  $\text{NEt}_3$ , DCM, RT, 2 h, 85 %; c)  $\text{H}_2$ , Pd/C (10 %), MeOH, RT, 4 h, 92 %.<sup>[75]</sup>



**25**

jedoch führt eine Anhebung der Reaktionstemperatur zur Entstehung von Produkt **25**, da die Aminogruppe neben der Säurechloridgruppe auch den Dioxolanonring von **17** angreift. In Tabelle 4.1 sind einige Versuchsparameter mit den korrelierten erhaltenen Ausbeuten wiedergegeben. Auffällig ist, daß die Reaktion erst bei einer Temperatur von  $-65\text{ }^\circ\text{C}$  gute Ausbeuten liefert. Mit Herabsetzen der Temperatur wird die Reaktion der Aminogruppe mit dem Dioxolanonring soweit verlangsamt, daß diese dann bevorzugt mit dem Säurechlorid reagiert.

**Tabelle 4.1:** Versuche zur Optimierung der Kupplungsreaktion.

Lösungsmittel	Temp. /°C	Hilfsbase	Ausbeute /%
DCM	-65	NEt <sub>3</sub>	30
DCM	-30	NEt <sub>3</sub>	15-21
DCM	-20	NEt <sub>3</sub>	9
DCM	0	NEt <sub>3</sub>	3
DCM	RT	NEt <sub>3</sub>	0
Et <sub>2</sub> O	-30	NEt <sub>3</sub>	<b>22</b> nicht löslich
Et <sub>2</sub> O	0	NEt <sub>3</sub>	14
Et <sub>2</sub> O	RT	NEt <sub>3</sub>	19
THF	-65	NEt <sub>3</sub>	91
THF	-30	NEt <sub>3</sub>	46
THF	0	NEt <sub>3</sub>	33
THF	RT	NEt <sub>3</sub>	6

Um die zweifache Substitution an **17** weiter zu unterdrücken, wurde die Reaktion nach dem Pseudoverdünnungsprinzip durch Einsatz einer Spritzenpumpe mit langsamer Zutropfgeschwindigkeit einer Lösung von **22** zu einer verdünnten Lösung **17** durchgeführt. Weiterhin scheint es entscheidend für die Reaktion zu sein, daß das entsprechende Hydrochlorid der eingesetzten Hilfsbase während der Reaktion aus der Lösung entfernt wird. So liegen die erhaltenen Ausbeuten für die Reaktionen in DCM, in dem sämtliche Reaktionskomponenten gut löslich sind, unter denen für Reaktionen in THF, in dem z. B. das Triethylammoniumchlorid bei tiefen Temperaturen ausfällt.

Außerdem hat sich gezeigt, daß der Einsatz von Pyridin als Hilfsbase oder als Solvens nicht geeignet ist, da auch nach mehrtätiger Reaktionsdauer kaum Umsatz beobachtet wird. Offensichtlich ist die Basizität des Pyridins nicht stark genug, die

Ammoniumgruppe von **22** in ausreichendem Maße zu deprotonieren.

Das Produkt **23** wird in 91 % Ausbeute rein erhalten, wenn die Reaktion in THF bei  $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter Einsatz des Pseudoverdünnungsprinzips mit Triethylamin als Hilfsbase geführt wird.

### Ringöffnung (Methode 1)

Der Dioxolanonring von **23** kann sehr leicht durch ein geeignetes Nucleophil gespalten werden, womit gleichzeitig eine Derivatisierung erreicht wird (Kap. 2.9). In diesem Fall wird die Ringöffnung mit O-Benzylhydroxylamin durchgeführt, so daß **24** in 85 % Ausbeute nach Säulenchromatographie erhalten wird (Abb. 4.3). Die Reaktion wird bei Raumtemperatur in DCM oder DMF durchgeführt.

### Ringöffnung (Methode 2)

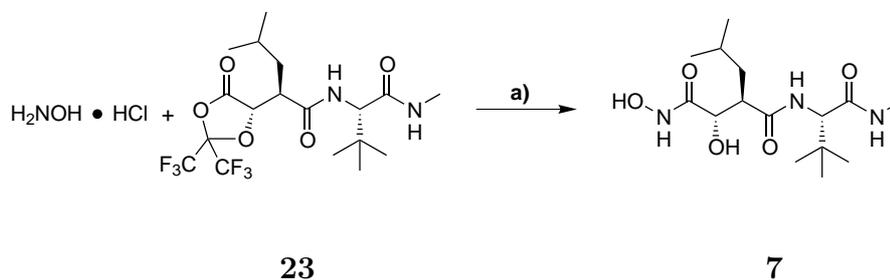


Abbildung 4.4: a) NMM, DMF, RT, 16 h, 80 %.

Der Dioxolanonring kann auch direkt von **23** ausgehend mit *in situ* erzeugtem freiem Hydroxylamin umgesetzt werden, wobei direkt Marimastat **7** erhalten wird (Abb. 4.4). Die Reaktion wird dabei in DMF bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Produkt ist allerdings so stark verunreinigt, daß es für biochemische Experimente nicht geeignet ist. Die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel oder Aluminiumoxid ist nicht möglich, da sich das Produkt nicht wieder eluieren lässt.

Erfolg brachte erst der Einsatz von präparativer Dünnschichtchromatographie auf RP-18-Kieselgel oder der Einsatz von präparativer RP-HPLC, so daß das Produkt in 80 % Ausbeute erhalten wird.

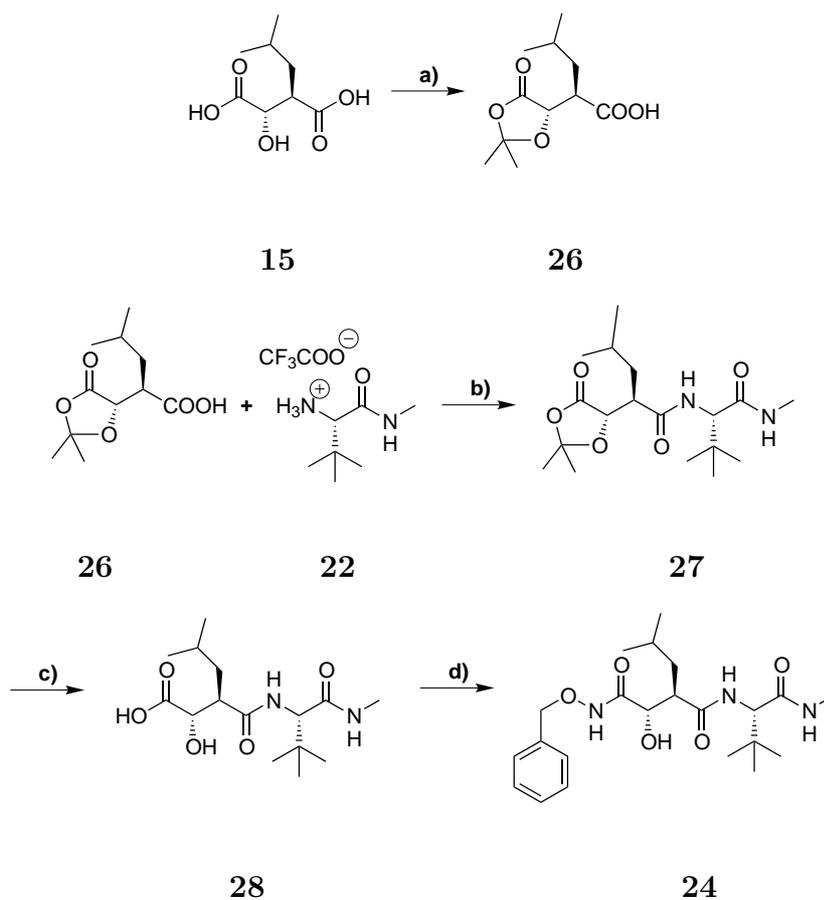
### Entfernung der Benzylschutzgruppe von **24**

Nachdem das benzylgeschützte Marimastat **24** aufgereinigt worden ist, wird es in Gegenwart von Palladium auf Aktivkohle in einer Wasserstoffatmosphäre hydriert. Dabei wird die Benzylschutzgruppe entfernt.<sup>[47,83]</sup> Bei Wahl eines protischen Lösungsmittels wie z. B. Ethanol oder Methanol und kurzer Reaktionsdauer wird kein N–O-Bindungsbruch beobachtet (Abb. 4.3).

#### 4.1.4 Darstellung von Marimastat **7** (Methode 2)

Die Darstellung von Marimastat **7** nach Methode 2 benutzt Elemente der bereits publizierten Methode von British Biotech.<sup>[83]</sup> Allerdings wird die  $\alpha$ -Hydroxydicarbonsäure **15** auf einem anderen Syntheseweg erhalten (Abb. 4.1). Diese Verbindung läßt sich außer mit Hexafluoraceton (s. o.) auch mit 2,2-Dimethoxypropan zu dem Dioxolanon **26** umsetzen (Abb. 4.5). Diese Reaktion erreicht eine Ausbeute nach Säulenchromatographie von 51 %. Die publizierte Ausbeute wird mit 83 % angegeben.<sup>[48]</sup> Allerdings gilt es zu beachten, daß sich diese Angabe auf die Rohausbeute bezieht, da keine weiteren Reinigungsschritte vorgenommen wurden.

Die erhaltene Verbindung **26** wird dann an *L-tert*-Leucin-*N*-methyramid **22** durch den Einsatz von EDC/HOBt gekuppelt. Die Ausbeute konnte im Vergleich mit der in der Literatur angegebenen durch den Einsatz von HOBt als Aktivesterreagenz um 13 % gesteigert werden, so daß sie nun 57 % beträgt.<sup>[48]</sup> Dieses Ergebnis konnte nicht weiter verbessert werden, so daß von sterischen Gründen ausgegangen werden kann, die die vollständige Umsetzung der Edukte verhindert. Sowohl die *tert*-Butylgruppe



**Abbildung 4.5:** a) 2,2-Dimethoxypropan, PTSA, RT, 16 h, 51 %; b) EDC·HCl, HOBT, NMM, DCM, RT, 18 h, 57 %; c) 2 M HCl, RT, 4.5 h, 75 %; d) O-Benzylhydroxylamin, EDC·HCl, NMM, RT, 16 h, 47 %.

von **22**, als auch der *iso*-Butylsubstituent der HOBt-aktivierten Säureverbindung **26** nehmen relativ viel Raum in Anspruch, so daß eine Annäherung beider Moleküle erschwert sein kann.

Anschließend wird die Acetonidschutzgruppe von **27** durch Reaktion mit 2 M Salzsäure entfernt. Dabei entsteht die Verbindung **28**, welche mit O-Benzylhydroxylamin und EDC zu dem benzylgeschützten Marimastat **24** reagiert, das wie bereits oben beschrieben zu **7** (Kap. 4.1.3) hydriert wird.

Davenport und Watson beschreiben die Möglichkeit der gleichzeitigen Öffnung und Derivatisierung des Dioxolanonringes von **27** durch die Verwendung von wässrigem Hydroxylamin (Abb. 4.6).<sup>[84]</sup> Die Reaktion soll dabei schon nach 1 h mit Ausbeuten von 93 % abgeschlossen sein. In eigenen Versuchen konnte dies jedoch nicht verifiziert werden. So zeigt sich selbst nach mehrstündigem Erhitzen unter Rückfluß keine Umsetzung des Eduktes.

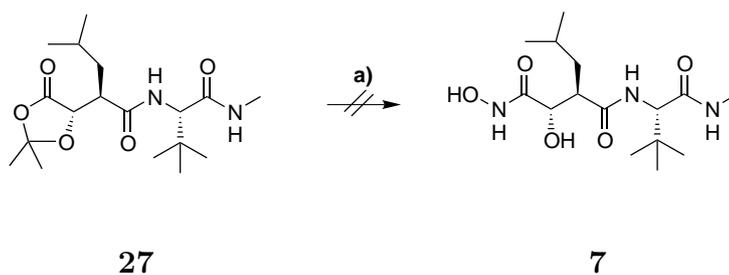


Abbildung 4.6: a)  $\text{H}_2\text{NOH}_{aq}$ , 100 °C, 16 h.<sup>[84]</sup>

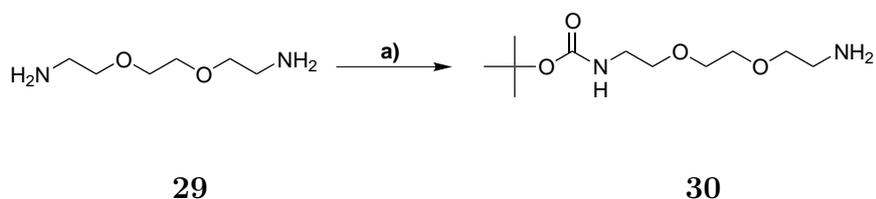
#### 4.1.5 Diskussion

Die neue Synthese, die sich auf das hexafluoracetongeschützte Säurechlorid **17** als „building block“ stützt (Kap. 4.1.3), liefert deutlich bessere Ausbeuten als Methode 2 (Kap. 4.1.4), welche in Anlehnung an den bereits publizierten Syntheseweg für Marimastat **7** getestet wurde. Ein Vergleich der Ausbeuten, bezogen auf die  $\alpha$ -Hydroxydicarbonsäure **15**, zeigt, daß mit Methode 1 57 % und mit Methode 2 nur 10 % Ausbeute erreicht werden.

## 4.2 Synthese neuer Linkermoleküle

### 4.2.1 Verbesserte Synthese von

#### 1-Amino-8-(*tert*-butyloxycarbonylamino)-3,6-dioxaoctan **30**



**Abbildung 4.7:** a)  $\text{Boc}_2\text{O}$ , 1,4-Dioxan, 20 h, 28 °C, 95 %.<sup>[85]</sup>

Bei **30** handelt es sich um eine literaturbekannte Verbindung (Abb. 4.7).<sup>[76,85,86]</sup> Wie sich gezeigt hat, haben die beschriebenen Synthesen jedoch den Nachteil, daß es während der Reaktion auch zur zweifachen Reaktion von Di-*tert*-butyldicarbonat an den Aminogruppen von **29** kommt. Durch Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen kann die Bildung dieses Nebenproduktes gut unterdrückt werden. So führt bereits die Anhebung der Reaktionstemperatur auf 28–30 °C zu einer wesentlich besseren Umsetzung, was mit einer höheren Reaktionsgeschwindigkeit des eintropfenden Di-*tert*-butyldicarbonat zu erklären ist. Vorteilhaft wirkt sich auch die Verlängerung der Zutropfzeit von 2 h auf 10 h aus, so daß die Reaktion unter verbesserten Pseudoverdünnungsbedingungen geführt werden kann.

### 4.2.2 Synthese von 1-Amino-8-(benzyloxycarbonylamino)-3,6-dioxaoctan **32**

Die Synthese des mono-*Z*-geschützten Linkers **32** gelingt mit einer Ausbeute von 61 % (Abb. 4.8). Die Verbindung wird nach der Aufarbeitung in einer so guten Reinheit erhalten, daß eine weitere Aufreinigung, wie z. B. Chromatographie nicht nötig ist, so daß **32** direkt in weiteren Synthesen eingesetzt werden kann.<sup>[87,88]</sup>

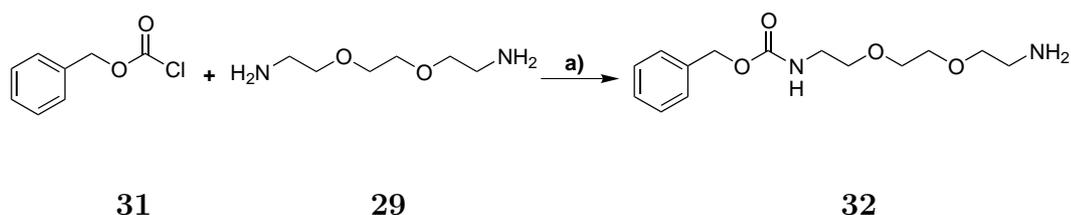


Abbildung 4.8: a) Toluol, 20 h, RT, 61 %.

#### 4.2.3 Synthese von *N*-(8-*tert*-Butyloxycarbonylamino-3,6-dioxaoctan-1-yl)-bernsteinsäureamid **32**

Eine weitere Variante für einen Linker stellt Verbindung **34** dar. Dieser läßt sich durch die vorhandene Carboxylgruppe z. B. an Amino- oder Hydroxylgruppen knüpfen. Die Darstellung gelingt durch Reaktion von **30** mit Bernsteinsäureanhydrid **33** in Gegenwart von Triethylamin als Hilfsbase. Der Basenzusatz ist wichtig, da sonst aufgrund der langen Reaktionsdauer die Gefahr besteht, daß die Boc-Schutzgruppe durch die entstehende Carbonsäure abgespalten wird.<sup>[89]</sup> Nach Säulenchromatographie wird das Produkt in 74 % Ausbeute erhalten.

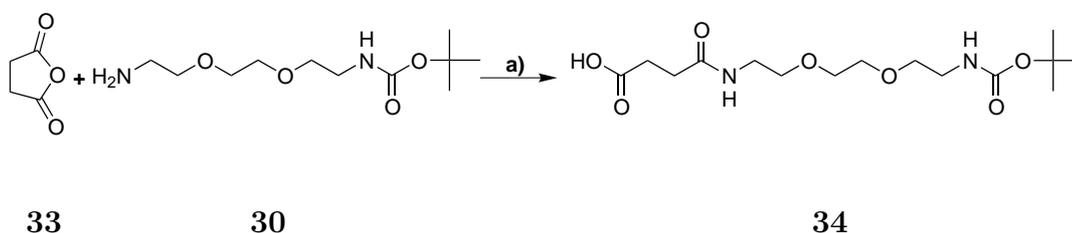


Abbildung 4.9: a) NEt<sub>3</sub>, DCM, 16 h, RT, 74 %.

#### 4.2.4 Synthese von 1-Azido-8-hydroxy-3,6-dioxaoctan **36**

Der in der Verbindung **36** vorhandene Azidosubstituent stellt ebenfalls eine Schutzgruppe dar, die orthogonal zu den bekannten basen- oder säurelabilen Schutzgruppen ist. Eine Umwandlung der Azidogruppe in einen Aminosubstituenten ist leicht durch

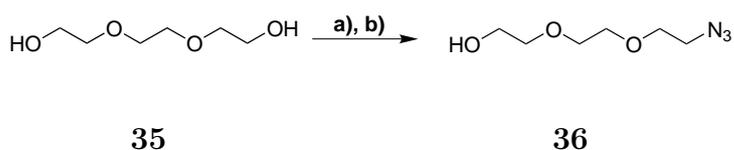


Abbildung 4.10: a) MsCl, Et<sub>3</sub>N, THF, b) NaN<sub>3</sub>, EtOH, 75 %.

katalytische Hydrogenolyse oder durch Umsetzung mit sulfhydrylhaltigen Agenzien möglich. Für die Synthese wird das leicht verfügbare Triethylenglykol **35** verwendet. Dabei wird zunächst nach dem Pseudoverdünnungsprinzip eine der beiden Hydroxylgruppen mittels Mesitylchlorid in eine bessere Abgangsgruppe umgewandelt und diese dann in einem zweiten Schritt durch das Azid substituiert (Abb. 4.10).<sup>[90,91]</sup>

#### 4.2.5 Synthese von 11-Azido-3,6,9-trioxaundecansäure **38**

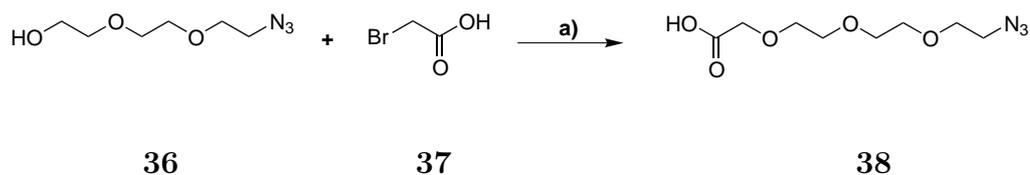
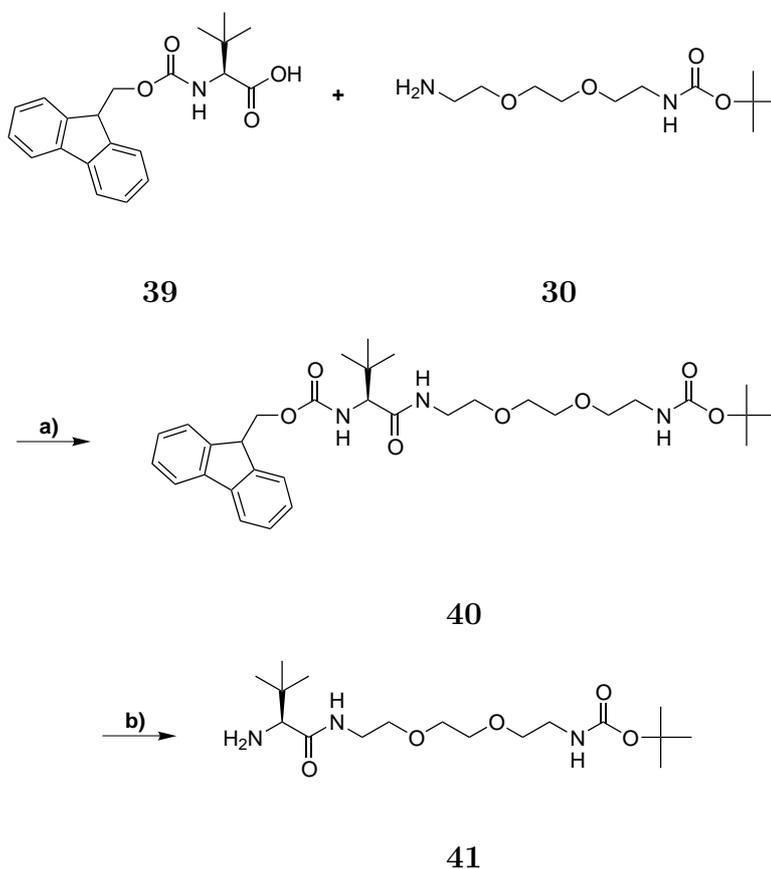


Abbildung 4.11: a) KOH, DMF, 45 °C, 30 h, 65 %.

Nach Reaktion des Azidolinkers **36** mit Bromessigsäure im basischen Milieu wird die Verbindung **38** erhalten.<sup>[90,91]</sup> Diese läßt sich wie **34** durch die vorhandene Carboxylgruppe z. B. mit Alkoholen verestern. Aufgrund des vorhandenen Azidosubstituenten läßt sich **38** auch für Synthesen verwenden, die eine gute Säurestabilität erfordern.

### 4.3 Synthese des Marimastat-Derivats 18

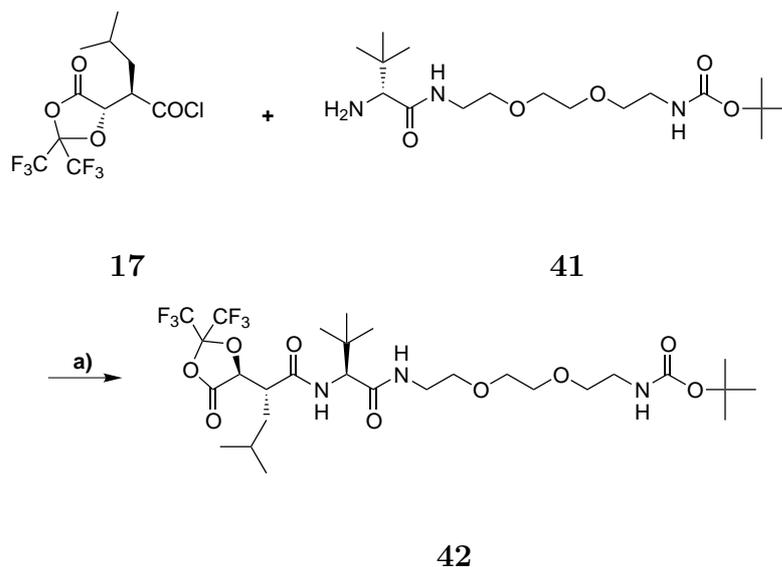
#### 4.3.1 Darstellung des Marimastat-Derivats 18 in Lösung (Methode 1)



**Abbildung 4.12:** a) EDC·HCl, HOBt, NMM, DCM, 0 °C→RT, 3 h, 74 %; b) *N*-(2-Mercaptoethyl)aminomethyl-polystyrolharz, DBU, THF, 20 h, 91 %.

Da die Synthese des Marimastat-Derivates **18** an der festen Phase ohne erheblichen finanziellen Aufwand nur kleine Substanzmengen liefert, welche dann nicht für affinitätschromatographische Zwecke ausreichen, wurde eine Synthese in Lösung ausgearbeitet. Zunächst wird Fmoc-*tert*-L-Leu-OH **39** mit Hilfe des wasserlöslichen Carbodiimids EDC an den mono-Boc-geschützten Linker **30** gekuppelt. Damit es während der Kupplungsreaktion nicht zur Epimerisierung der Aminosäure kommt,

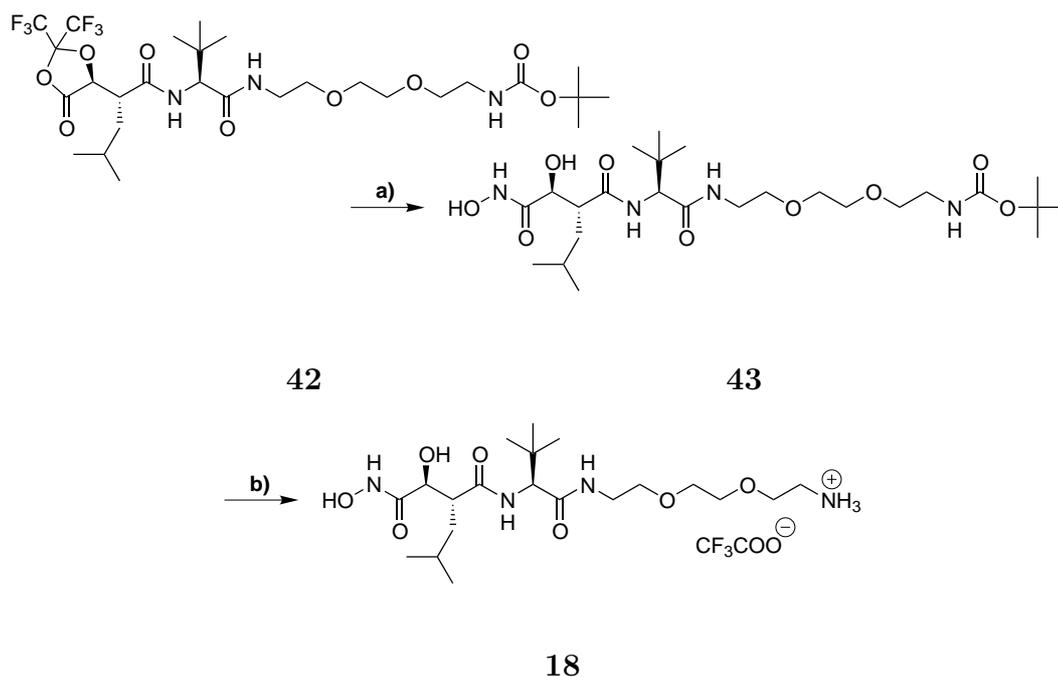
wird der Reaktionsmischung das Aktivesterreagenz HOBt zugesetzt (Abb. 4.12).<sup>[92]</sup> Die erhaltene Verbindung **40** stellt sich als schaumig erstarrender Feststoff dar, eine Eigenschaft, die typisch sowohl für Boc- als auch für Fmoc-geschützte Substanzen ist.



**Abbildung 4.13:** a) THF, NEt<sub>3</sub>, -75 °C, 4 h, 98 %.

Eine elegante Methode zur Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe in Lösung ist die Verwendung eines „scavenger“-Harzes. Das während der Entschützungsreaktion entstehende Dibenzofulven wird dabei als Addukt von dem Harz „gefischt“ und verbleibt deswegen an der festen Phase, so daß Nebenprodukt und Produkt bequem durch Filtration getrennt werden können.<sup>[93]</sup> Bedingt durch die Reaktionsdauer kann es passieren, daß geringe Mengen des Harzes gelöst werden. Daher ist es manchmal erforderlich das Produkt durch eine kleine Kieselgelsäule zu eluieren. Das Harz kann zur Kostenreduktion durch Waschen mit 20 % Piperidin in DMF vollständig regeneriert werden.

Abbildung 4.13 zeigt die bereits in Kap. 4.1.3 besprochene Kupplungsreaktion. Diese verläuft zwischen dem hexafluoracetongeschützten Säurechlorid **17** und der Verbin-



**Abbildung 4.14:** a)  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ , NMM, DMF, RT, 4 h, 43 %; b) TFA/DCM (1:2), RT, 3 h, 78 %.

dung **41** vollständig analog. Das Produkt **42** stellt sich als farbloses Öl mit einem sehr intensiven, charakteristischem Geruch dar, welcher typisch für diese Verbindungsklasse ist. Bei der Aufarbeitung des Produktes muß sehr sorgfältig gearbeitet werden, da der Polyethylenglykol-Linker die Wasserlöslichkeit und die Hygroskopie erhöht, so daß beim Waschen der organischen Phase mit Wasser ein Teil der Verbindung in die wäßrige Phase übergeht. Aufgrund der relativ schnellen Hydrolyse der Hexafluoracetonschutzgruppe scheiterten die ausgeführten Reextraktionsversuche.

Die hexafluoracetongeschützte Verbindung **42** läßt sich wie bereits in Kap. 4.1.3 mit *in situ* erzeugtem Hydroxylamin unter gleichzeitiger Abspaltung und Derivatisierung zur Hydroxamsäure umsetzen (Abb. 4.14). Aufgrund der hohen Polarität kann die entstandene Hydroxamsäure **43** weder an Kieselgel noch an Aluminiumoxid säulenchromatographisch gereinigt werden, so daß auf reversed-phase Kieselgel zurückgegriffen werden muß. Die Aufreinigung gelingt dann mittels RP-HPLC. Die

verbleibende Boc-Schutzgruppe wird nach dem Standardverfahren mit TFA/DCM (1:2) entfernt. Das erhaltene Marimastat-Derivat **18** liegt danach als Trifluoracetat-Salz vor. Eine nachfolgende Aufreinigung des Produktes ist nicht erforderlich.

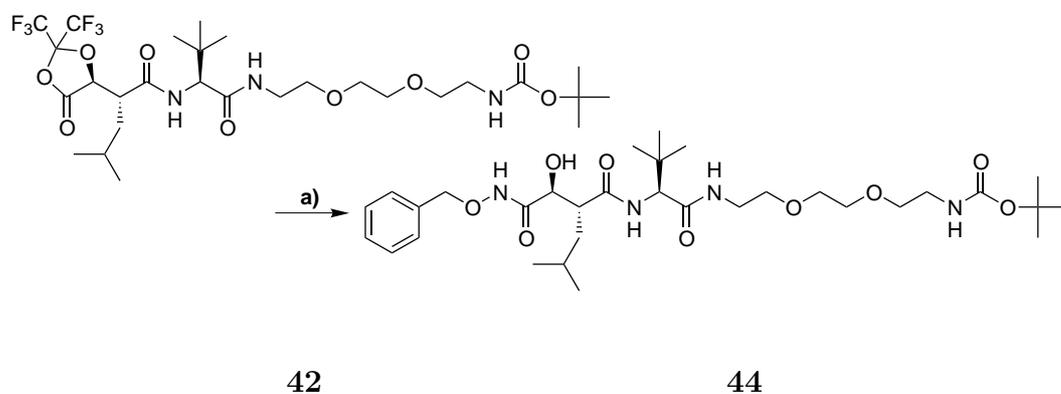


Abbildung 4.15: a) BnONH<sub>2</sub>·HCl, NEt<sub>3</sub>, DMF, RT, 16 h, 64 %.

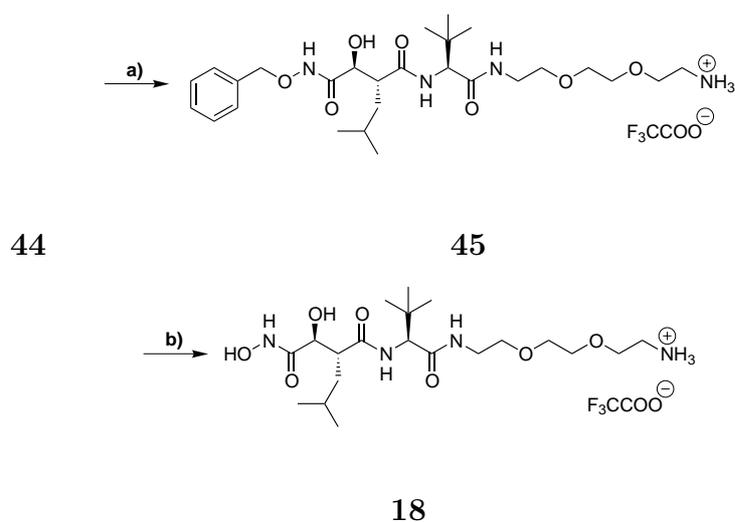


Abbildung 4.16: a) TFA, DCM, RT, 2 h, 99 %; b) H<sub>2</sub>, Pd/C (10 %), MeOH, RT, 2 h, 85 %.

Aufgrund der Tatsache, daß sich die Verbindung **43** nur schwer aufzureinigen läßt, wurde versucht, das hexafluoracetongeschützte Produkt **42** mit O-Benzylhydroxylamin zu öffnen (Abb. 4.15). Wegen der Instabilität der Verbindung **42** hat es sich als vorteilhaft erwiesen, wenn die Reaktion möglichst schnell verläuft. Daher wird ein

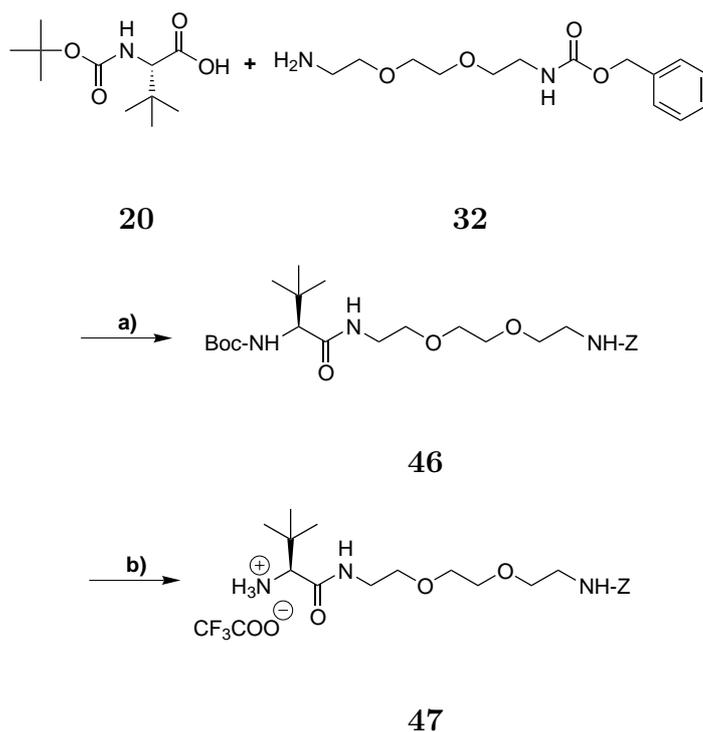
Überschuß an O-Benzylhydroxylamin zugegeben. Schon nach 2 h Reaktionsdauer ist die Reaktion abgeschlossen. Das entstehende Produkt **44** wird nach flashchromatographischer Aufreinigung in 64 % Ausbeute als farbloses Öl erhalten.

Die Entfernung sowohl der Boc- als auch der Benzylschutzgruppe verläuft sauber und ohne Bildung von Nebenprodukten (Abb. 4.16). Auch die oftmals befürchtete N-O-Bindungsspaltung wird bei der hydrogenolytischen Spaltung der Benzylschutzgruppe bei Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen (Kap. 4.1.3) nicht beobachtet. Zur vollständigen Entfernung des Katalysators empfiehlt es sich, das Produkt **18** durch eine kleine Kieselgelsäule mit Methanol zu filtrieren. Das Marimastat-Derivat **18** wird dann in 85%iger Ausbeute als Trifluoracetat-Salz in Form eines farblosen, amorphen Feststoffes erhalten. Die NMR- und MS-Spektren beweisen eindeutig, daß die Verbindung **18** vorliegt.

#### 4.3.2 Darstellung des Marimastat-Derivats **18** in Lösung (Methode 2)

Statt des mono-Boc-geschützten Linkers **30** wird bei Methode 2 der mono-Z-Linker **32** verwendet. Dadurch soll eine direktere Synthese des Marimastat-Derivates **18** ermöglicht werden, die auch insgesamt höhere Ausbeuten liefern soll. Zunächst wird Boc-L-Leu-OH **20** mittels des wasserlöslichen Carbodiimids EDC gekuppelt. Damit zum einen die Kupplungsreaktion möglichst effizient verläuft und zum anderen eine Epimerisierung der Aminosäure weitgehend unterdrückt wird, wird der Reaktionsmischung das Aktivesterreagenz HOBt zugesetzt (Abb. 4.17).<sup>[92]</sup> Das Produkt wird nach Säulenchromatographie in 75 % Ausbeute als farbloses Öl rein erhalten. Anschließend wird die Boc-Schutzgruppe nach dem bekannten Verfahren mit TFA/DCM entfernt.

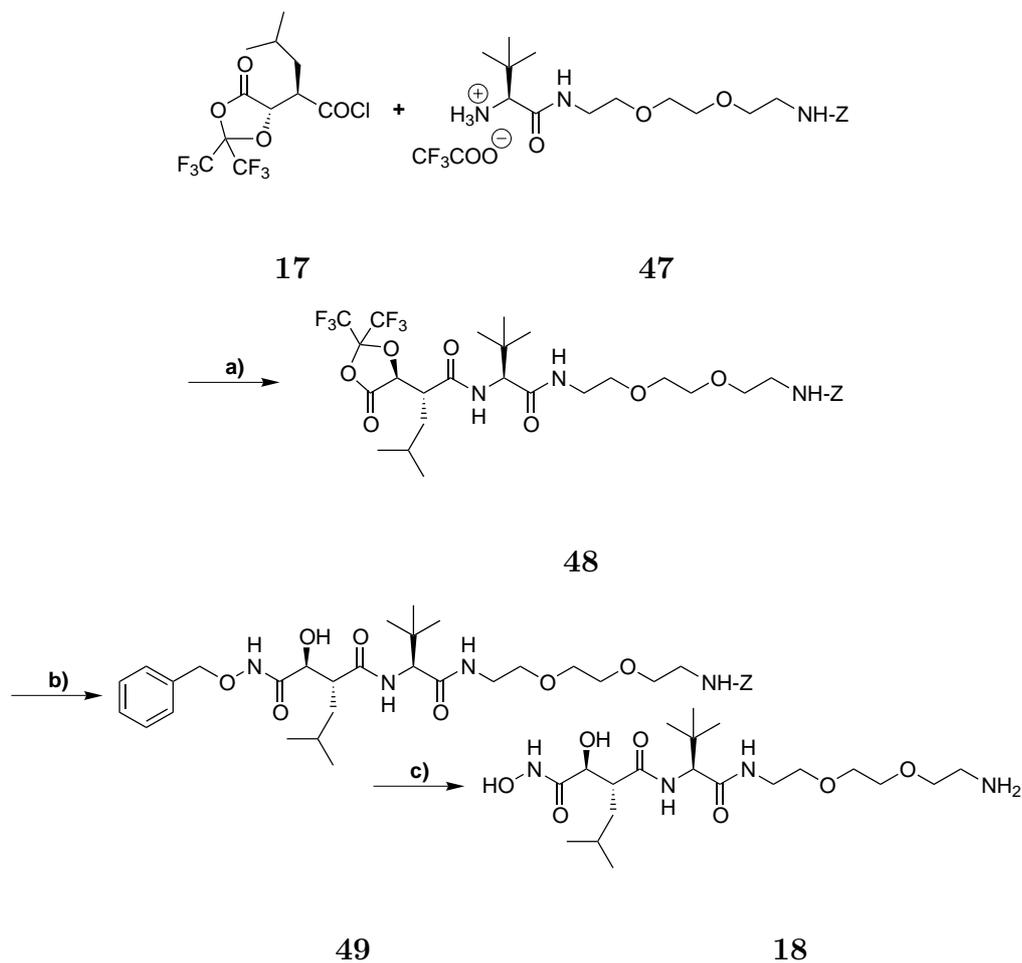
Das hexafluoracetongeschützte Säurechlorid **17** wird mit dem Boc-entschützten Aminosäurederivat **47** nach dem in Kap. 4.1.3 ausgearbeiteten Verfahren gekuppelt (Abb. 4.18). Aufgrund der hohen Instabilität der Verbindung **48** wird auf eine wei-



**Abbildung 4.17:** a) EDC·HCl, HOBT, NMM, DCM, 0 °C→RT, 20 h, 75 %; b) TFA, DCM, RT, 2 h, 99 %.

tergehende Aufreinigung verzichtet und diese direkt weiter eingesetzt. Das Produkt wird dennoch sowohl anhand der NMR-Spektren als auch des MALDI-ToF Massenspektrums eindeutig charakterisiert. So sind im  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum die für diese Verbindungsklasse typischen zwei Quartetts bei  $\delta$  -80.5 ppm und  $\delta$  -81.0 ppm zu erkennen.<sup>[59]</sup> Ebenso zeigt das Massenspektrum bei  $m/z$  739.2 den  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ - und bei  $m/z$  755.1 den  $[\text{M}+\text{K}]^+$ -Peak. Die Derivatisierung von **42** wird durch Ringöffnung mit O-Benzylhydroxylamin erreicht. Aus diese Weise wird die Verbindung **49** erhalten, welche sehr gut durch Flashchromatographie gereinigt werden kann. Diese besitzt sowohl eine Benzyl- als auch eine Z-Schutzgruppe, welche beide gleichzeitig durch Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen hydrogenolytisch innerhalb von 2 h entfernt werden können (Kap. 4.1.3). Ein N-O-Bindungsbruch wird auch hierbei nicht beobachtet. Um den Katalysator vollständig zu entfernen wird das Produkt

durch eine kleine Kieselgelsäule filtriert. Nach Lyophilisieren wird das Produkt in 91 % Ausbeute als farbloser Feststoff erhalten.



**Abbildung 4.18:** a) THF, NEt<sub>3</sub>, -75 °C, 4 h, 98 %; b) BnONH<sub>2</sub>·HCl, NEt<sub>3</sub>, DMF, RT, 16 h, 65 %; c) H<sub>2</sub>, Pd/C (10 %), MeOH, RT, 2 h, 91 %.

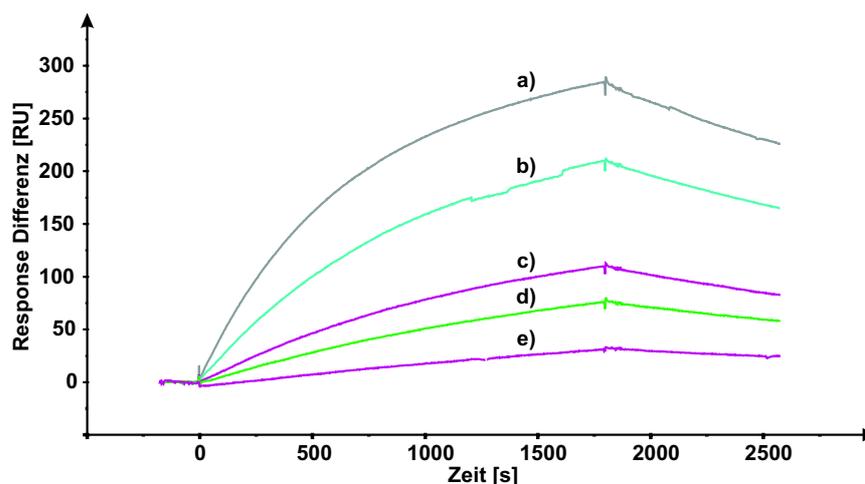
### 4.3.3 Immobilisierung des Marimastat-Derivates 18 für SPR-Studien

Um zu überprüfen, ob das neu synthetisierte Marimastat-Derivat **18** (Seite 44) über biologische Aktivität verfügt, wurden SPR-Studien durchgeführt. Dabei gilt es zu zeigen, daß die Derivatisierung mit einem Linker nicht zu einer Beeinträchtigung der Bindungseigenschaften zu MMPs führt.

Mit der SPR-Technologie lassen sich Bindungen zwischen zwei Interaktionspartnern in Echtzeit verfolgen. Das Marimastat-Derivat **18** wird dabei über die Aminogruppe des Linkers an die NHS-aktivierte Matrix eines Sensorchips gekuppelt. Hierbei wird der CM5-Sensorchip verwendet, der auf seiner Oberfläche mit Carboxymethylcellulose beschichtet ist. Die Kupplungen finden erfolgreich bei einem pH-Wert zwischen 6–9 im wässrigen Milieu statt. Das Derivat **18** wird in HBS-EP-Puffer (pH 7.4) gelöst und anschließend in die entsprechende Meßzelle des BIAcore-Gerätes injiziert. Die beobachtete Zunahme der Resonanz beträgt nach Beendigung der Injektion 40–60 RU. Mehrmalige Injektionen oder eine höhere Konzentration von **18** brachten keine signifikante Änderung. Der beobachtete Wert bei der Zunahme der Response ist für ein kleines Molekül wie **18** jedoch sehr gut. Ursprünglich sind SPR-Geräte entwickelt worden, um damit Interaktionen zwischen zwei Makromolekülen nachweisen zu können. Aufgrund der höheren Molekularmasse etwa von Proteinen werden dann deutlich größere Zunahmen an Response bei der Immobilisierung oder Bindung beobachtet. Die ständige Verbesserung dieser Geräte erlaubt nun auch die Messung von Interaktionen zwischen kleineren Molekülen.<sup>[67,94]</sup>

### 4.3.4 Bindung von MMP-2 an Marimastat-Derivat 18

Für das Testsystem wurde MMP-2 ausgewählt, da bekannt ist, daß sie mit einem guten IC<sub>50</sub>-Wert von der Stammverbindung Marimastat **7** (6 nM, Seite 25) gehemmt wird. MMP-2 wurde von Calbiochem käuflich erworben und vor der Verwendung

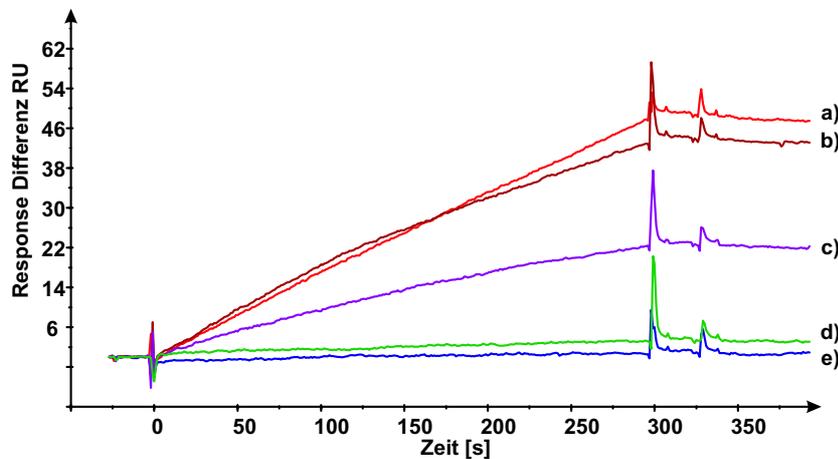


**Abbildung 4.19:** Bindung von MMP-2 an immobilisiertem Marimastat-Derivat **18**. Zunehmende Konzentrationen von aktivierter MMP-2 resultieren in zunehmender Response: a) 55 nM, b) 28 nM, c) 19 nM, d) 14 nM, e) 3 nM.

nach dem Standardprotokoll aktiviert. In Abbildung 4.19 sind die Meßkurven wiedergegeben. Es ist deutlich zu erkennen, daß die erhaltene Response mit der Zunahme der Konzentration linear korreliert. Bei der Messung wurde die Differenzbildung zwischen Meßzelle und Referenzzelle verwendet, um eine unspezifische Bindung ausschliessen zu können. Hierbei wird die zu untersuchende Proteinlösung zunächst in eine nicht derivatisierte, leere Flußzelle (Referenzzelle) geleitet. Aus der wird sie dann direkt in die Meßzelle weitergeleitet. Die resultierende Response ergibt sich dann als Differenz aus den einzelnen Response-Werten der Referenzzelle und Meßzelle.

Eine weitere Methode, um eine unspezifische Bindung von MMP-2 ausschliessen zu können, ist die Konkurrenz in Lösung. Hierbei wird der gleiche Ligand, der immobilisiert wurde, vor der Messung mit dem entsprechenden Analyten inkubiert. Sofern es sich um eine spezifische Bindungsaffinität des Analyten zum Liganden handelt, sollte mit Zunahme der Konzentration des bei der Vorinkubation verwendeten Liganden eine Abnahme an Response beobachtet werden. In Abb. 4.20 ist das Ergebnis dieses

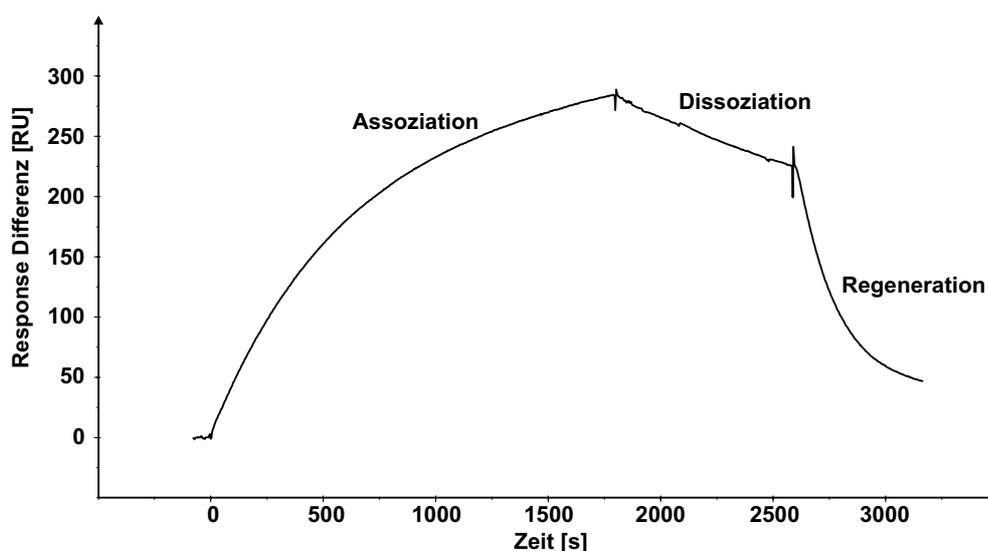
Kompetitionsexperimentes in Lösung zu sehen. Es ist also davon auszugehen, daß die Bindung von MMP-2 an **18** spezifisch ist.



**Abbildung 4.20:** Konkurrenz in Lösung mit Marimastat-Derivat **18**. 14 nM MMP-2 wurden 30 min lang vor der Messung mit verschiedenen Konzentrationen von **18** inkubiert; a) 0 nM, b) 9 nM, c) 18 nM, d) 45 nM, e) 180 nM.

Abb. 4.21 zeigt eine Möglichkeit zur Regeneration der Chipoberfläche. Die gebundene MMP-2 kann schonend mit dem EDTA haltigen HBS-EP-Puffer wieder eluiert werden. Die Meßkurve kehrt nach einer einmaligen Injektion von HBS-EP-Puffer noch nicht vollständig auf die Basislinie zurück. Daher sind 2–3 Regenerationszyklen notwendig.

Um eine Aussage darüber zu erhalten, wie gut der Komplex gebildet wird bzw. wie stabil dieser ist, werden Messungen zur Kinetik durchgeführt. Für den Erhalt von kinetischen Daten aus Sensorgrammen ist es vorteilhaft, wenn die erhaltenen Meßkurven einen möglichst linearen Verlauf haben. Dies kann durch eine Verringerung der MMP-2-Konzentration oder auch durch Erhöhen der Flußgeschwindigkeit erreicht werden.

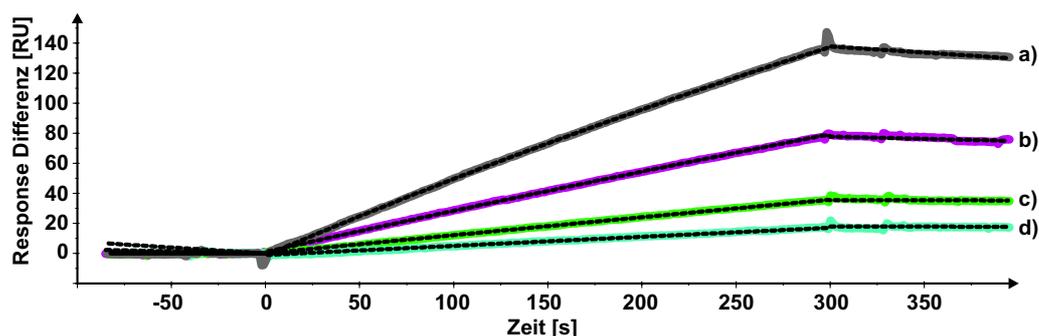


**Abbildung 4.21:** Bindung und Regeneration der Chipoberfläche. Eine 55 nM MMP-2-Lösung wurde injiziert. Danach wird durch Injektion von HBS-EP-Puffer die gebundene MMP-2 von der Oberfläche eluiert.

In Abbildung 4.22 sind die für kinetische Auswertungen benötigten Kurven zusammen mit den gefitteten Kurven dargestellt. Hierbei wird eine deutliche Übereinstimmung erkannt. Aus diesen Kurven werden kinetische Daten berechnet. Der angegebene  $K_D$ -Wert ist ein Maß für die Stabilität des Komplexes Marimastat-Derivat **18**/MMP-2 (Tab. 4.2). Dieser liegt in der gleichen Größenordnung wie der  $IC_{50}$ -Wert für den Komplex Marimastat **7**/MMP-2 (6 nM, Tab. 2.4). Das neue Marimastat-Derivat **18** zeigt eine biologische Aktivität, die mit der Stammverbindung Marimastat **7** vergleichbar ist. Die durchgeführte Derivatisierung von Marimastat mit einem Linkermolekül ist also ohne Aktivitätsverlust möglich (Kap. 2.10).

**Tabelle 4.2:** Kinetische und thermodynamische Konstanten der Interaktion MMP-2/**18**.

$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$R_{max}$ (RU)	$K_A$ (1/M)	$K_D$ (M)	$\chi^2$
$3.08 \cdot 10^4$	$1.99 \cdot 10^{-5}$	727	$1.54 \cdot 10^9$	$6.48 \cdot 10^{-10}$	0.2



**Abbildung 4.22:** Kinetik der Bindung MMP-2 an immobilisiertem **18** unter Annahme einer 1:1-Bindung. Die gefitteten Kurven sind gestrichelt. Konzentrationen: a) 27.5 nM, b) 13.8 nM, c) 5.5 nM, d) 2.8 nM.

Das BIAcore 3000 Gerät erlaubt eine Wiedergewinnung von gebundenem Proteinmaterial. Diese Art von „Ligandenfischen“ soll ein Auffinden von Interaktionspartnern mit anschließender Elution erlauben. Die erhaltenen Eluate können dann massenspektrometrisch untersucht werden.<sup>[94]</sup>

Abbildung 4.23 zeigt ein solches „micro-recover“-Experiment, wobei die gleiche MMP-2-Lösung wie in den vorgenannten Experimenten verwendet wird. Zunächst wird die Lösung in die Flußzelle injiziert, damit die Proteinase an **18** binden kann. Dann finden nacheinander zwei kurze „micro-recover“-Zyklen statt, bei denen HBS-EP-Puffer zur Elution injiziert und das Eluat gesammelt wird. Die gebundene MMP-2 kann mit diesen sehr kurzen Injektionspulsen nicht vollständig eluiert werden. Durch die Verwendung von längeren Pulsen wird jedoch die wiedergewonnene Proteinlösung stärker verdünnt. Mit dem so erhaltenen Eluat wurde versucht, MALDI-ToF-Spektren zu messen, was jedoch aufgrund der sehr niedrigen Proteinkonzentration nicht erfolgreich war. Dieses Problem sollte allerdings durch Verwendung einer größeren Flußzelle, auf der insgesamt eine größere Menge an Protein gebunden werden kann, umgangen werden. Ebenfalls wäre es möglich, die Bindungs- und Elutionsschritte sukzessiv zu wiederholen bis eine genügend große Menge Pro-

teinmaterial erhalten wird. Wegen der hohen Verdünnung sollten die gesammelten Eluate dann allerdings mit Hilfe der Ultrafiltration aufkonzentriert werden. Diese beiden Verfahren konnten jedoch nicht durchgeführt werden, da weder eine größere Flußzelle noch größere MMP-2-Mengen zur Verfügung standen.

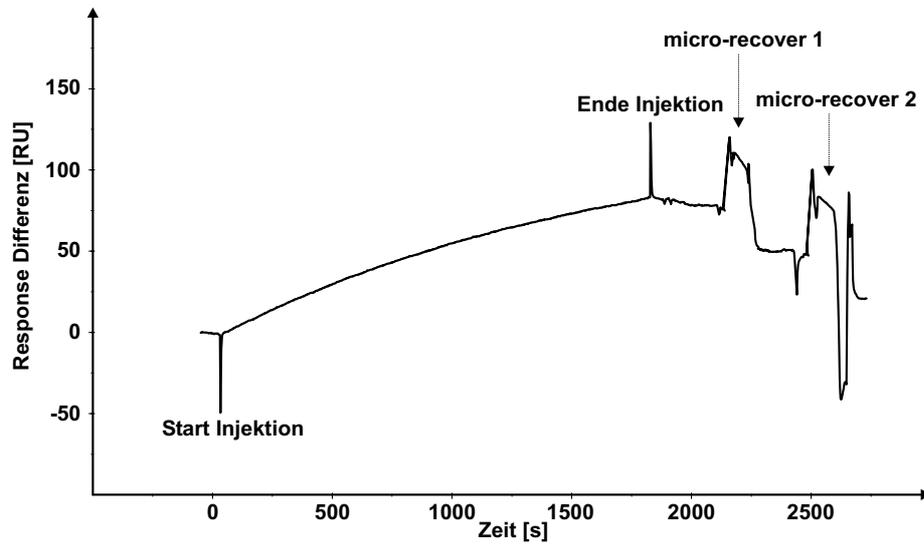
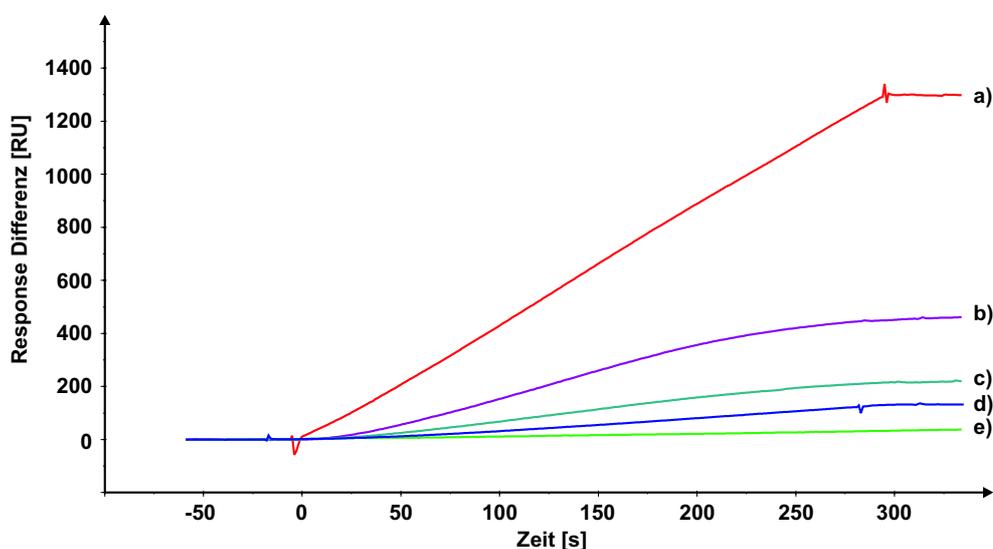


Abbildung 4.23: Micro-recover von MMP-2, die an das Marimastat-Derivat **18** gebunden hat.

## 4.3.5 Bindung von ADAM9 an Marimastat-Derivat 18

Die ADAMs verfügen über eine Metalloproteinasedomäne,<sup>[52]</sup> daher wurden SPR-Untersuchungen hinsichtlich der Bindung an das Marimastat-Derivat **18** durchgeführt. Es soll untersucht werden, ob eine Affinität auch zwischen **18** und ADAMs existiert. Bei dem verwendeten ADAM9-Fc handelt es sich ein rekombinant hergestelltes Proteinkonstrukt, welches mit Hilfe eines inklonierten Fc-Tags an Protein A Sepharose affinitätschromatographisch gereinigt wurde.\*



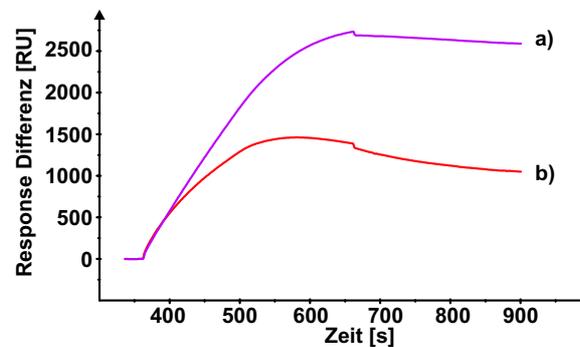
**Abbildung 4.24:** Bindung von ADAM9 an immobilisiertes Marimastat-Derivat **18**. Zunehmende Konzentrationen von ADAM9 resultieren in zunehmender Response: a) 36 nM, b) 18 nM, c) 9 nM, d) 3.6 nM, e) 0.36 nM.

Zunächst wird konzentrationsabhängiges Bindungsverhalten von ADAM9 an **18** untersucht (Abb. 4.24). Es wird wiederum die Differenzbildung zwischen Meß- und Referenzzelle verwendet, um unspezifische Wechselwirkungen bzw. Affinitäten zur CM5-Matrix des Sensorchips auszugleichen. Bei den Messungen wird erneut eine

\*ADAM9-Fc wurde von Prof. Dr. J. Frey (Universität Bielefeld) und seiner Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

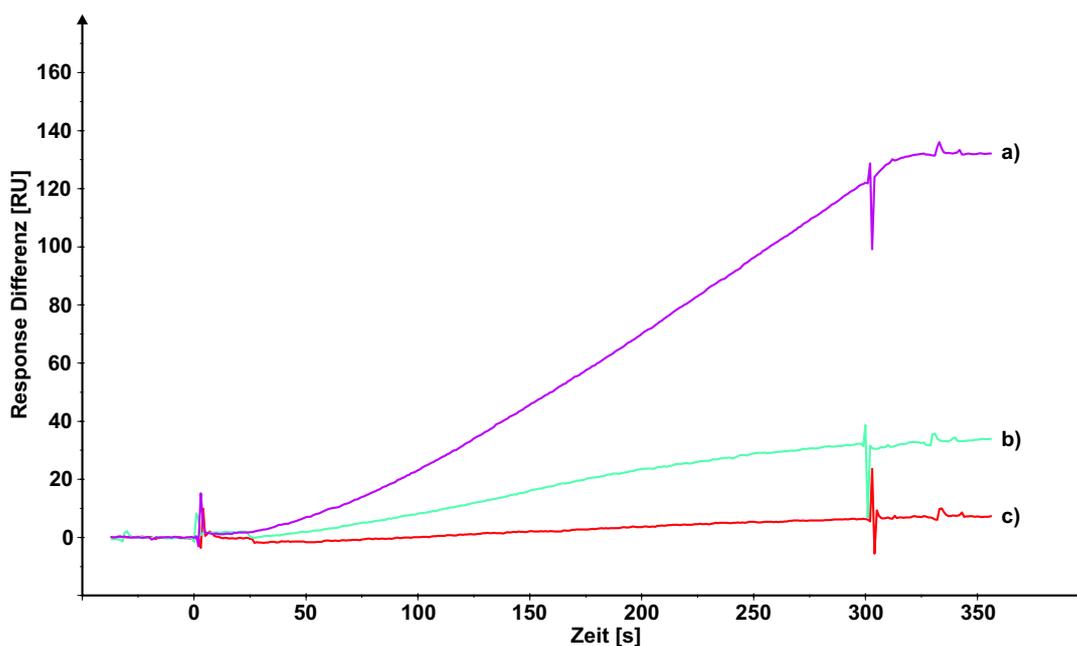
lineare Abhängigkeit zwischen der ADAM9-Konzentration und der beobachteten Response beobachtet.

Auffällig ist, daß nach Injektionsende nur eine sehr langsame Dissoziation des Komplexes stattfindet, was sich aber nach der Betrachtung der einzelnen Resonanzsignale der Meß- und Referenzzelle erklären läßt (Abb. 4.25). Das Signal der Referenzzelle steigt während der Injektion an, fällt aber nach dem Injektionsende stärker ab als das Signal in der Meßzelle. Dies deutet auf eine unspezifische Wechselwirkung von ADAM9-Fc mit der Chipoberfläche hin. Da aber bei der Differenzbildung die Response der Referenzzelle von der Response der Meßzelle abgezogen wird, fällt das resultierende Signal nach Injektionsende scheinbar kaum ab (Abb. 4.24).



**Abbildung 4.25:** Bindung einer 36 nM ADAM9-Lösung an immobilisiertes Marimastat-Derivat **18**. a) Meßzelle, b) Referenzzelle.

Um eine sichere Aussage über die Spezifität der Bindung zu erhalten, werden Kompetitionsexperimente in Lösung durchgeführt. Dabei wird eine konstant gehaltene Konzentration von ADAM9 mit verschiedenen Konzentrationen **18** vor der Messung inkubiert. In Abb. 4.26 ist zu erkennen, daß eine relativ hohe Konzentration an **18** eingesetzt werden muß, um eine signifikante Kompetition zu beobachten.

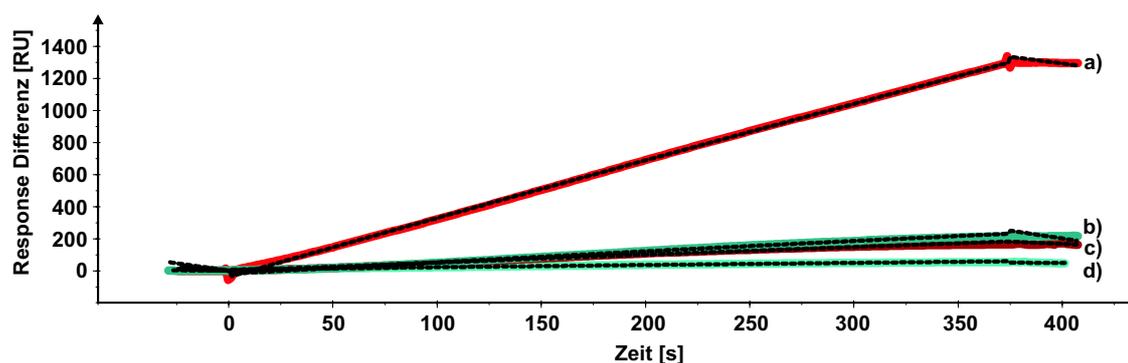


**Abbildung 4.26:** Konkurrenz in Lösung mit Marimastat-Derivat **18**. 3.6 nM ADAM9 wurden 30 min lang vor der Messung mit verschiedenen Konzentrationen von **18** inkubiert; a) 0 nM, b) 14.4 nM, c) 7.2  $\mu\text{M}$ .

**Tabelle 4.3:** Kinetische und thermodynamische Konstanten der Interaktion ADAM9/**18**.

$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$R_{max}$ (RU)	$K_A$ (1/M)	$K_D$ (M)	$\chi^2$
122	$1.95 \cdot 10^{-4}$	$1.46 \cdot 10^6$	$6.3 \cdot 10^5$	$1.6 \cdot 10^{-6}$	2.1

Die für kinetische Berechnungen notwendigen Meßkurven sind in Abbildung 4.27 zusammen mit den gefitteten Kurven dargestellt. Zur Berechnung wurde das 1:1-Bindungsmodell verwendet (BIAevaluation 3.1). Bei der Betrachtung der Kurven wird eine deutliche Übereinstimmung erkannt. Die berechneten Werte sind in Tab. 4.3 wiedergegeben. Bei Vergleich des  $K_A$ -Wertes und des  $K_D$ -Wert läßt sich folgern, daß sich der Komplex nur langsam bildet, er aber dann eine gute Stabilität aufweist.



**Abbildung 4.27:** Kinetik der Bindung ADAM9 an immobilisiertem **18** unter Annahme einer 1:1-Bindung mit driftender Basislinie. Die gefitteten Kurven sind gestrichelt. Konzentrationen: a) 36 nM, b) 18 nM, c) 7.2 nM, d) 1.8 nM.

Der  $K_D$ -Wert für diesen Komplex wird mit  $1.6 \mu\text{M}$  ermittelt. Der für ADAM9 publizierte  $K_I$ -Wert für **7** beträgt 274 nM.<sup>[53]</sup> Damit liegt dieser um den Faktor 6 unter dem ermittelten  $K_D$ -Wert. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, daß das Marimastat-Derivat **18** ADAM9 etwas schlechter bindet als die Stammverbindung Marimastat **7**. Eine Derivatisierung führt in diesem Fall zu einer Herabsetzung der Affinität, was bei den Experimenten mit MMP-2 nicht beobachtet wurde (s. o.). Das Marimastat-Derivat **18** zeigt insgesamt dennoch eine gute Affinität gegenüber ADAM9. Außerdem muß bedacht werden, daß dieses ADAM9 mit einem Fc-Fragment modifiziert wurde, wodurch generell die Bindungseigenschaften im Vergleich zum nicht-modifizierten ADAM9 verändert sein können.

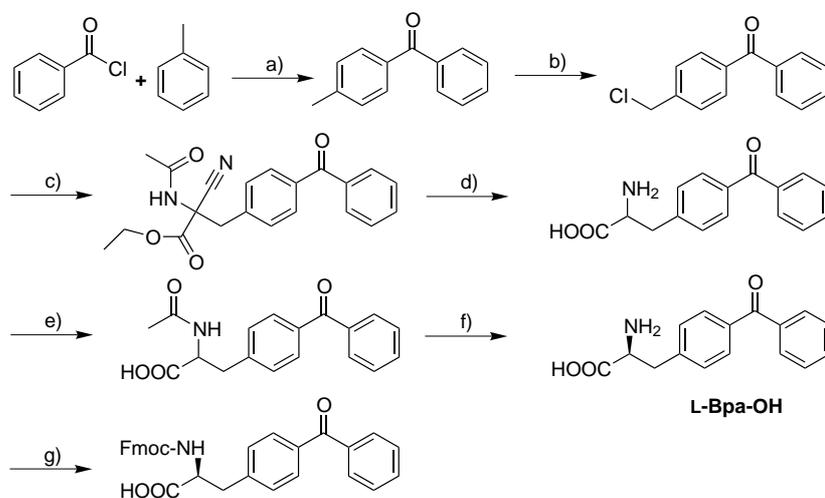
#### 4.3.6 Diskussion

Es sind zwei neue Methoden zur Darstellung des Marimastat-Derivates **18** erarbeitet worden. Beide Verfahren haben gegenüber der Festphasensynthese den Vorteil, daß das Marimastat-Derivat **18** kostengünstiger und in größeren Mengen dargestellt werden kann. Jedoch ist auf den einzelnen Stufen oftmals eine zeitintensive chroma-

tographische Reinigung notwendig, was bei der Festphasensynthese nicht erforderlich bzw. möglich ist. Dafür ist aber eine genaue Charakterisierung der Zwischenstufen bei der Synthese in Lösung möglich. Die Methode 1 gestattet z. B. bei Verbindung **45** eine Derivatisierung an dem Linker mit nachfolgender Entfernung der Benzylschutzgruppe und damit Freisetzung der Hydroxamsäure. Aus diese Weise würden sich weitere Derivate darstellen lassen. Methode 2 bietet eine direktere Möglichkeit zur Synthese des Marimastat-Derivates **18**. Hier wird in einem Schritt sowohl die C-terminale Schutzgruppe am Ende des Linkers, als auch die Benzylschutzgruppe der Hydroxamsäurefunktion entfernt. Eine weitere Derivatisierung ist dann ausgehend von **18** nicht mehr möglich.

Mit dem erhaltenen Marimastat-Derivat **18** wurden SPR-Studien durchgeführt, damit geklärt werden kann, ob die neue Verbindung über eine selektive Affinität zu Biomolekülen, insbesondere Matrixmetalloproteinasen, aufweist. Wie sich in den Studien gezeigt hat, verfügt **18** über eine gute Affinität zu den beiden Modellproteinen MMP-2 und ADAM9, die mit der Affinität der Stammverbindung Marimastat **7** vergleichbar ist. Folglich hat die Verknüpfung mit einem Linker nicht zu einer wesentlichen Verschlechterung der Bindungseigenschaften geführt.

## 4.4 Synthese neuer Proteinsonden für MMPs

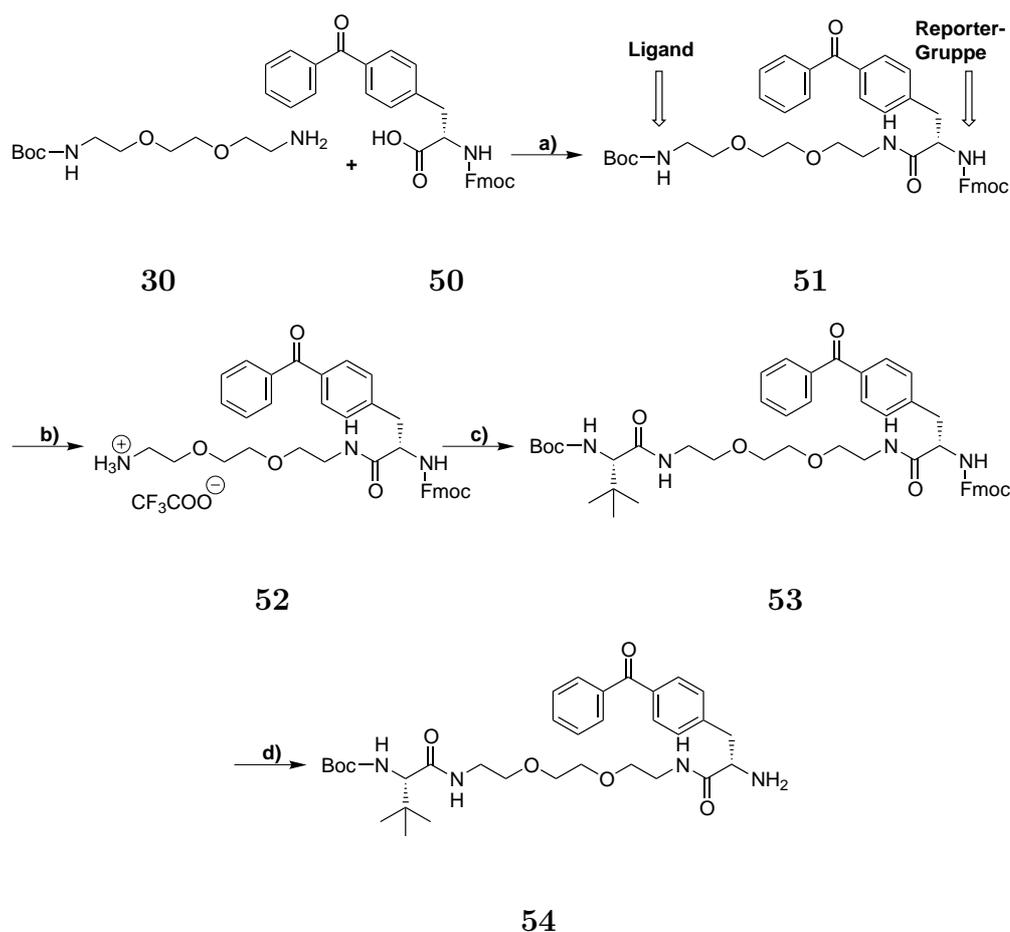


50

**Abbildung 4.28:** a)  $\text{AlCl}_3$ ,  $110\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 h, 90 %; b)  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$ , Dibenzoylperoxid,  $\text{CCl}_4$ , reflux, 25 h, 38 %; c) Ethylacetamidocyanoacetat,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , KI, Aceton,  $80\text{ }^\circ\text{C}$ , 16 h, 69 %; d) 8 M  $\text{HCl}_{aq}$ ,  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , 20 h, 92 %; e) Essigsäureanhydrid, 5 min, 80 %; f) *Aspergillus* Acylase I,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 18 h, 40 %; g) Fmoc-OSu,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1,4-Dioxan/ $\text{H}_2\text{O}$ , RT, 24 h, 67 %.

Es sollen Proteinsonden für das Auffinden/Detektieren von MMPs auf einem SDS-Polyacrylamidgel dargestellt werden. Diese sollen wie bereits in Kap. 2.1.1 erwähnt aus einem Liganden, der die gesuchten Proteine erkennt, und einem Linker bestehen, an dem eine Reaktiv- und eine Reportergruppe verknüpft sind. Als Ligand soll der Breitband-Inhibitor Marimastat **7** (Seite 25) eingesetzt werden. Wie Sewald und Hagenstein *et al.* bereits gezeigt haben, lässt sich Benzophenon als Reaktivgruppe einsetzen. Diese reagiert dabei bei Bestrahlung mit dem Protein, wobei eine kovalente Bindung zwischen der Proteinsonde und dem Protein entsteht (Kap. 2.12).

Für die Synthese wird zuerst L-Benzoylphenylalanin (L-Bpa-OH) nach der Vorschrift von Kauert *et al.* dargestellt (Abb. 4.28).<sup>[95]</sup> Nachdem das L-Bpa-OH  $\text{N}^\alpha$  geschützt wurde, kann es als Aminosäurederivat leicht in organische Moleküle bzw. Peptide



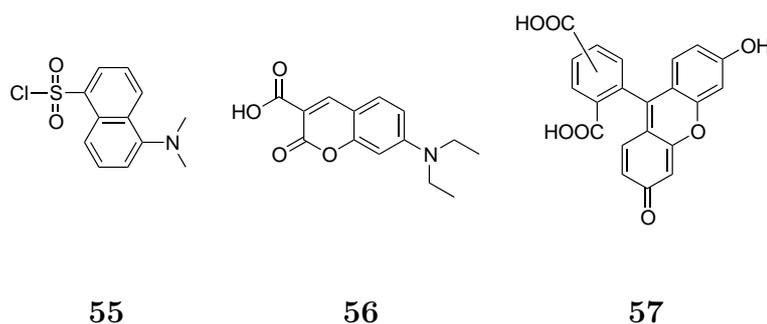
**Abbildung 4.29:** a) EDC·HCl, HOBT, NMM, DCM, RT, 18 h, 83 %; b) TFA/DCM (1:1), RT, 1 h, 98 %; c) Boc-L-*tert*-Leu-OH **20**, EDC·HCl, HOBT, NMM, DCM, RT, 18 h, 82 %; d) *N*-(2-Mercaptoethyl)aminomethyl-polystyrolharz, DBU, THF, 20 h, 94 %.

eingebaut werden. Für die durchgeführte Synthese der Photoaffinitätssonde wird das Fmoc-L-Bpa-OH **50** als Edukt verwendet, welches nach dem üblichen Verfahren durch Reaktion von *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid (Fmoc-OSu) mit L-Bpa-OH erhalten werden kann.<sup>†[96]</sup>

Um die photoreaktive Gruppe mit dem Liganden zu verknüpfen, ist der Einbau eines Linkers notwendig. Dazu wird der mono-Boc-geschützten Linker **30** mit dem

<sup>†</sup>Das Fmoc-L-Bpa-OH ist auch im Chemikalienhandel erhältlich.

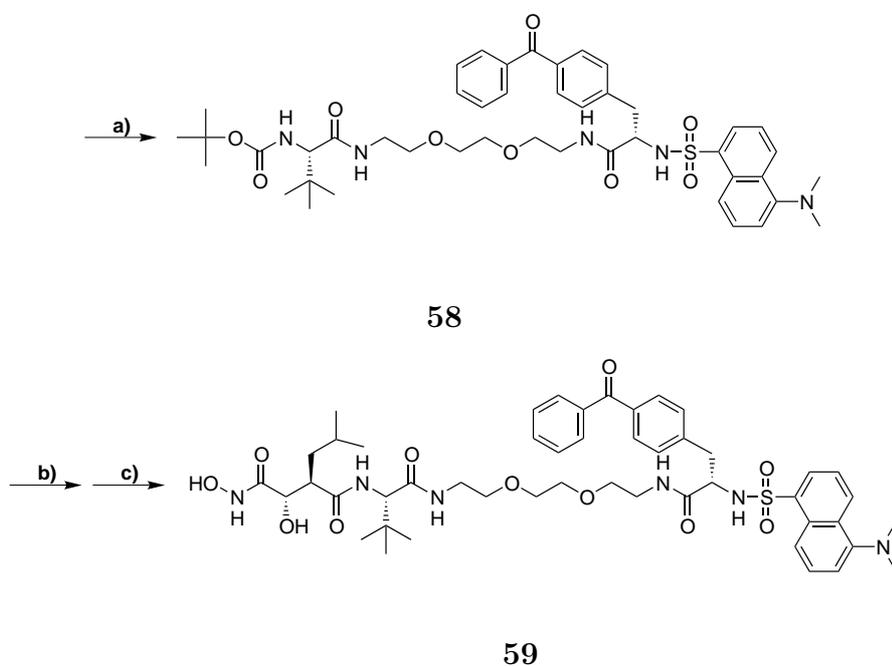
synthetisiertem Fmoc-L-Bpa-OH **50** durch das Kupplungsreagenz EDC unter Zusatz von HOBt verknüpft. Der Zusatz des Aktivesterreagenzes verhindert eine Epimerisierung der Aminosäure. Die in 83 % Ausbeute erhaltene Verbindung **51** ist als Grundbaustein für die Synthese von Photoaffinitätsmarkern anzusehen. Auf der N-terminalen Seite können Reportergruppen wie Fluoreszenzfarbstoffe oder Biotin angeheftet werden, während am C-Terminus ein entsprechender Ligand verknüpft werden kann (Abb. 4.29).



**Abbildung 4.30:** Fluoreszenzfarbstoffe: Dansylchlorid **55** (Absorption 340 nm / Emission 578 nm), 7-Diethylamino-coumarin-3-carbonsäure **56** (Absorption 409 nm / Emission 473 nm), 5(6)-Carboxyfluorescein **57** (Absorption 492 nm / Emission 518 nm).

Bei den eigenen Synthesen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die Reportergruppe in Form eines Fluoreszenzfarbstoffes möglichst spät in die Verbindung einzuführen. Eine Derivatisierung z. B. mit 5(6)-Carboxyfluorescein **57** führt zu einer erhöhten Wasserlöslichkeit des Produktes, so daß es zu Problemen bei der Aufarbeitung der Reaktion kommt. Das Produkt kann dann sehr leicht in die wässrige Phase übergehen, aus der es nur schwer zu reextrahieren ist. Deshalb wird zunächst Boc-*tert*-Leu-OH **20** nach Entfernung der Boc-Schutzgruppe von **51** mit EDC gekuppelt und dann anschließend die Fmoc-Schutzgruppe mittels eines „scavenger“-Harzes entfernt (Abb. 4.29). Durch die Verknüpfung mit der Aminosäure *tert*-Leu-OH ist die Verbindung **53** insgesamt hydrophober als **51**, so daß es nicht zu den oben genannten Problemen kommt. Das Intermediat **54**, das durch Abspaltung von Fmoc aus **53**

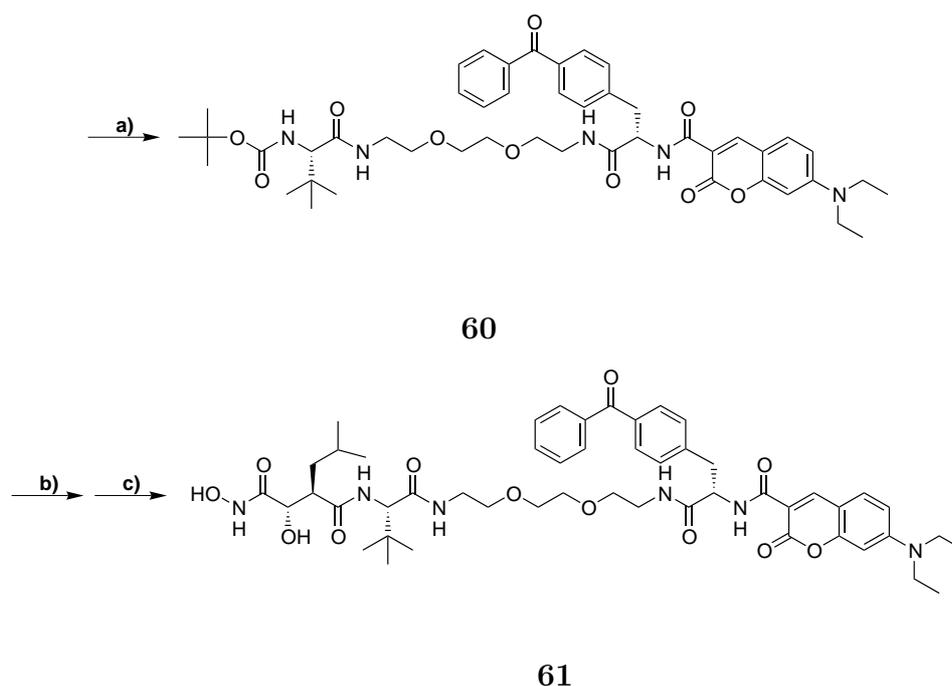
entsteht, ist eine Schlüsselverbindung für die weiteren Synthesen, da einerseits beliebige Reportergruppen, andererseits auch beliebige Inhibitoren/Liganden gekoppelt werden können.



**Abbildung 4.31:** a) **54**, Dansylchlorid **55**, Pyridin, DCM, RT, 20 h, 67 %; b) TFA/DCM (1:2), RT, 2 h, 99 %; c) **17**, THF, NEt<sub>3</sub>, -78 °C, 4.5 h; H<sub>2</sub>NOH·HCl, NMM, DMF, RT, 16 h, 65 %.

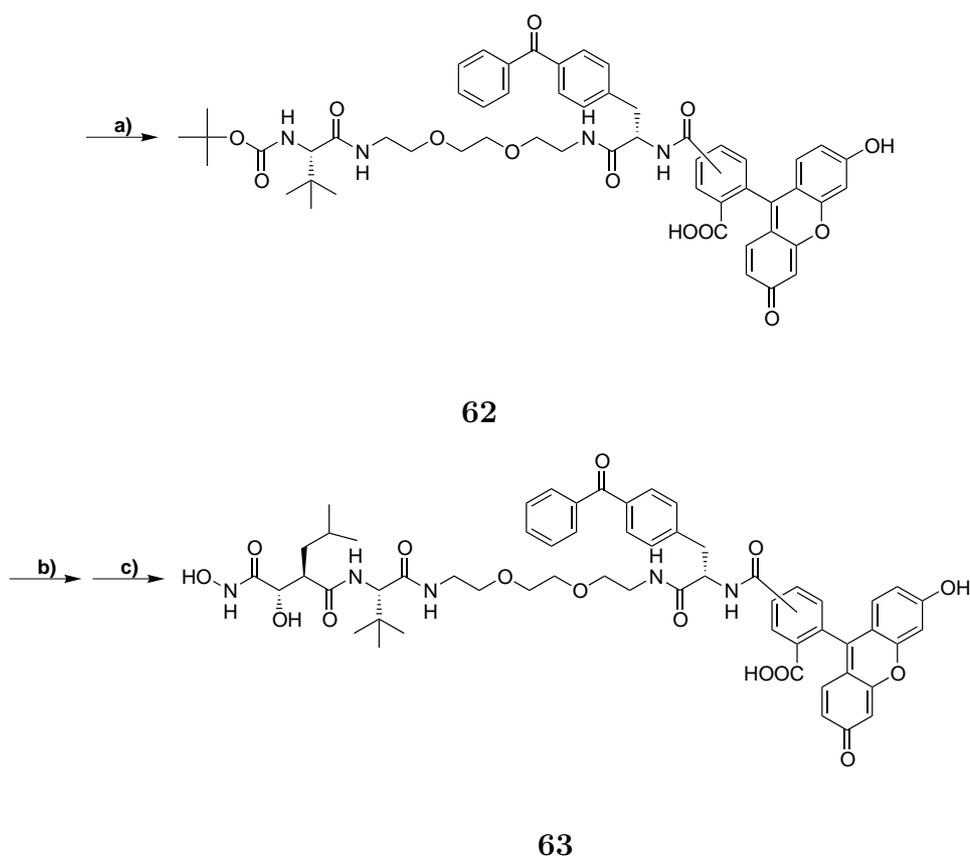
Als Reportergruppen wurden drei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe ausgewählt, die sich in den Absorptions- und Emissionswellenlängen signifikant voneinander unterscheiden (Abb. 4.30). Die Farbstoffe haben sich für die Markierung von Proteinen in der biologischen Forschung etabliert. Besonders das 5(6)-Carboxyfluorescein wird in Form des entsprechenden Isothiocyanates benutzt, welches mit primären Aminogruppen von Proteinen leicht reagiert. Mit diesen Farbstoffen werden drei unterschiedliche Proteinsonden synthetisiert.

Für die Synthese der ersten Proteinsonde wird zunächst der Fluoreszenzfarbstoff Dansyl in Form des Dansylchlorids **55** an die freie Aminogruppe von **54** gekoppelt.



**Abbildung 4.32:** a) **54**, 7-Diethylamino-coumarin-3-carbonsäure **56**, EDC·HCl, HOBT, NMM, DMF, RT, 20 h, 96 %; b) TFA/DCM (1:2), RT, 2 h, 99 %; c) **17**, THF, NEt<sub>3</sub>, -78 °C, 4.5 h; H<sub>2</sub>NOH·HCl, NMM, DMF, RT, 16 h, 45 %.

Bei dieser Reaktion muß eine Hilfsbase zugegeben werden, damit die Reaktion zum einen vollständig abläuft und zum anderen die Boc-Schutzgruppe nicht durch das entstehende HCl abgespalten wird. Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung wird das Produkt in 67 % Ausbeute als gelbes Öl erhalten. Dann wird die Boc-Schutzgruppe nach dem üblichen Verfahren acidolytisch entfernt. Die Kuppelung und nachfolgende Ringöffnung des hexafluoracetongeschützten Säurechlorids **17** wird analog der in Kap. 4.1.3 erarbeiteten Methode durchgeführt. Da hexafluoracetongeschützte Verbindungen dieses Typs sehr instabil sind, wird die Synthese ohne Isolierung der entsprechenden Spezies fortgeführt. Das Produkt **59** wird in 65 % Ausbeute als gelber Feststoff nach präparativer RP-HPLC rein erhalten (Abb. 4.31). Die NMR- und MS-Daten belegen das Vorliegen des Produktes eindeutig. So wird im ESI-MS bei  $m/z$  933.4 der  $[M+H]^+$ - und bei  $m/z$  955.4 der  $[M+Na]^+$ -Peak gefunden.



**Abbildung 4.33:** a) **54**, 5(6)-Carboxyfluorescein **57**, EDC·HCl, HOBT, NMM, THF, RT, 20 h, 94 %; b) TFA/DCM (1:2), RT, 2 h, 94 %; c) **17**, THF, NEt<sub>3</sub>, -78 °C, 4.5 h; H<sub>2</sub>NOH·HCl, NMM, DMF, RT, 16 h, 36 %.

Eine weitere Proteinsonde wird mit dem Farbstoff 7-Diethylamino-coumarin-3-carbonsäure **56** dargestellt. Dabei wird statt des oben eingesetzten Dansyls das Coumarinderivat **56** eingesetzt. Dieses wird durch das Carbodiimid EDC an **54** gekuppelt. Die Reaktion verläuft glatt mit einer Ausbeute von 96 %. Durch die Verwendung des Carbodiimids EDC läßt sich die Aufarbeitung und damit die Synthese beschleunigen, da sämtliche Nebenprodukte sehr gut wasserlöslich sind. Daher wird das Produkt **60**, nachdem die organische Phase mit einer leicht sauren, wäßrigen Lösung extrahiert worden ist, schon so sauber erhalten, daß es direkt weiter eingesetzt werden kann.

Die Entfernung der Boc-Schutzgruppe von **60** verläuft sauber und ohne die Bildung von Nebenprodukten. Nach der Aufreinigung wird das in 96 % Ausbeute erhaltene, gelborange Öl analog wie oben beschrieben direkt weiter mit dem hexafluoracetongeschützten Säurechlorid **17** umgesetzt. Nach präparativer RP-HPLC wird das Produkt **61** in 45 % Ausbeute als orangener Feststoff erhalten (Abb. 4.32). Die gemessenen NMR-Signale können eindeutig zugeordnet werden. Im ESI-MS werden bei  $m/z$  943.3 der  $[M+H]^+$  und bei  $m/z$  956.4 der  $[M+Na]^+$ -Peak gefunden. Weiterhin belegt das hochaufgelöste Massenspektrum (ESI-FT-ICR) das Vorliegen von Verbindung **61**.

Nach Verknüpfung von **54** mit 5(6)-Carboxyfluorescein **57** wird das Produkt **62** als gelbes Öl mit 94 % Ausbeute erhalten (Abb. 4.33). Dieses liegt hierbei in Form eines Isomerengemisches vor, das auch nicht mit Hilfe des Einsatzes von präparativer HPLC getrennt werden kann, da sich die Retentionszeiten nur wenig voneinander unterscheiden. Der Einsatz des Eduktes **57**, welches als Gemisch aus 5- und 6-Carboxyfluorescein vorliegt, macht die Synthese allerdings erheblich kostengünstiger. Das Produkt **62** wird dann analog wie oben beschrieben weiter umgesetzt. Die Proteinsonde **63** wird in 36 % Ausbeute nach der Aufreinigung mittels präparativer RP-HPLC erhalten. Ein Grund für die verminderte Ausbeute im Vergleich zu den vorangegangenen Reaktionen könnte in den vorhandenen phenolischen Hydroxylgruppen zu suchen sein. Wie sich gezeigt hat, ist die Kupplungsreaktion des hexafluoracetongeschützten Säurechlorids **17** sensitiv gegenüber Veränderungen der Reaktionsparameter (Kap. 4.1.3). Das im Verhältnis 58/42 erhaltene Produktgemisch, das sich auch nicht nach mehrmaligen Aufreinigungsversuchen mittels HPLC trennen lässt, kann aber anhand des NMR-Spektrums und vor allem anhand der Massenspektren charakterisiert werden. So ist im ESI-MS der  $[M+H]^+$ -Peak bei  $m/z$  1058.5 und der  $[M+Na]^+$ -Ionenpeak bei  $m/z$  1080.4 zu finden. Das hochaufgelöste Massenspektrum ist ebenfalls als Beweis für das Vorliegen der Verbindung **63** anzusehen.

#### 4.4.1 Diskussion

Die Darstellung der Proteinsonden gelingt bei der Verwendung der richtigen Synthesstrategie. Die problematischste Reaktion ist die Kupplung des hexafluoracetongeschützten Säurechlorids **17**. Wie sich bereits bei der Darstellung von Marimastat **7** gezeigt hat, reagiert die Kupplungsreaktion sehr sensitiv gegenüber Veränderungen der Reaktionsparameter (Kap. 4.1.3). Die nicht isolierten Kupplungsprodukte müssen wegen ihrer erhöhten Instabilität sofort weiter in der Synthese eingesetzt werden. Die anschließend nach präparativer HPLC erhaltenen Produkte zeigen eine sehr hohe Reinheit. Das Produkt **63** liegt selbst nach der Aufreinigung als Isomerengemisch vor, was aber für die nachfolgenden Proteinmarkierungsexperimente nur eine untergeordnete Rolle spielt. Sewald und Hagenstein *et al.* haben an Proteinsonden, die selektiv für Proteinkinasen sind, erfolgreich gezeigt, daß solche Isomerengemische für Markierungsexperimente benutzt werden können.<sup>[12]</sup>

Mit den Produkten **59**, **61** und **63** liegen nun Proteinsonden vor, die für die Photoaffinitätsmarkierung von MMPs geeignet sind. Diese Proteinsonden können mit einer Proteinlösung inkubiert und dann bestrahlt werden, wobei eine kovalente Bindung zwischen Sonde und Protein ausgebildet wird. Durch diese stabile Bindung wird gewährleistet, daß der Komplex zwischen Sonde und Protein auch während der denaturierenden Bedingungen einer SDS-Polyacrylamidelektrophorese bestehen bleibt. Die markierten Proteine können anschließend über die Reportergruppe detektiert werden.

Durch die Verwendung einer photoreaktiven Gruppe bei der Markierung ist jedoch eine Quantifizierung der einzelnen Proteine anhand der Reportergruppe schlecht möglich. Dies begründet sich in der schlechten Effizienz der photochemischen Markierungsreaktion, so daß nicht von einer vollständigen Markierung sämtlicher in Frage kommender Proteine ausgegangen werden kann.<sup>[12]</sup> Weiterhin können durch die Verwendung eines Inhibitors als Ligand für den Aufbau solcher Proteinsonden nur

aktive Proteine gefunden werden, während die nicht aktiven Proenzyme (Zymogene) auf diese Weise nicht detektiert werden.

## 4.5 Synthese von cyclischen RGD-Peptiden

Von cyclischen RGD-Peptiden ist bekannt, daß sie als Liganden an einige Integrine binden (Tab. 2.1, Seite 19). Durch die Derivatisierung mit einem Linker sollen Peptide dargestellt werden, die nach Immobilisierung auf einer festen Phase Integrine und assoziierte bzw. verwandte Proteine aus einer Proteinlösung RGD-abhängig binden können. Das nach Elution erhaltene und vereinfachte Proteom – das Subproteom – kann dann weiter analysiert werden.

Die gewünschte Derivatisierung von solchen Peptiden kann durch eine Verknüpfung mit einem Linker in der Seitenkette von dem enthaltenen Lysin erreicht werden, wobei die neuen Derivate auf ihre biologische Aktivität überprüft werden müssen.

### 4.5.1 Synthese von Lysinderivaten

#### Darstellung von Fmoc-Lys(Dde)-OH 66

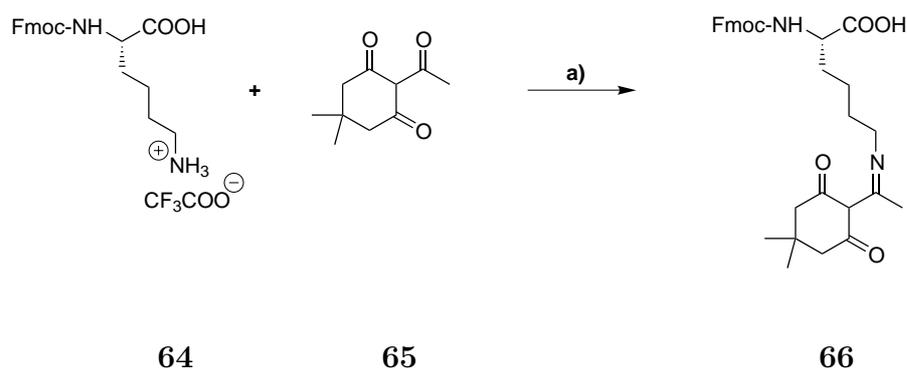


Abbildung 4.34: a) NEt<sub>3</sub>, DMF, RT, 16 h, 82 %.

Bei Dde handelt es sich um eine Schutzgruppe, die orthogonal zur Fmoc/Boc-Synthesestrategie ist.<sup>[97]</sup> Deshalb kann sie für die Synthese von Peptiden verwendet werden, die in der Seitenkette von Lysin derivatisiert sind. Mit der Dde-Schutzgruppe lassen sich selektiv primäre Aminogruppen leicht schützen, wobei die Schutzgruppe insgesamt eine hohe Stabilität aufweist. Die Abspaltung erfolgt sehr schnell mit einer 2%igen Hydrazin-Lösung.

Fmoc-L-Lys-OH·TFA **64**, welches aus Fmoc-L-Lys(Boc)-OH durch Umsetzung mit TFA in DCM (1:1) dargestellt werden kann, wird mit Dde **65** zur Reaktion gebracht. Die Darstellung von **66** gelingt in einem Schritt und verläuft sauber mit guter Ausbeute von 82 % (Abb. 4.34). Das Vorliegen des Produktes **66** wird dabei sowohl durch die NMR- als auch der MS-Spektren gestützt. Im ESI-MS ist bei  $m/z$  533.2 der  $[M+H]^+$  und bei  $m/z$  555.2 der  $[M+Na]^+$ -Ionenpeak zu finden. Das Produkt liegt nach der Synthese so rein vor, daß eine weitergehende Aufreinigung nicht notwendig ist.

#### Darstellung von Fmoc-Lys(Linker-Boc)-OH **67**

Ein weiteres Lysinderivat, welches für die Festphasensynthese eingesetzt werden kann, stellt Verbindung **67** dar, die im Gegensatz zu Fmoc-Lys(Dde)-OH **66** schon mit einem Linker verknüpft wurde. Für die Darstellung wird Fmoc-Lys-OH·TFA mit dem Linker **34** gekuppelt. Hierbei wird das Carbodiimid EDC verwendet, welches sich sehr leicht durch wäßrige Extraktion der organischen Phase entfernen läßt. Nach Flashchromatographie wird dann das Produkt als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 79 % in 95 % Reinheit (RP-HPLC) erhalten. Auch nach wiederholter Säulenchromatographie konnte die Reinheit nicht weiter gesteigert werden. Eine mögliche Ursache ist in dem schlechten Laufverhalten von **67** an Kieselgel zu suchen. Daher müssen sehr polare Solventien zur Elution verwendet werden, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, daß Verunreinigungen bei diesen Bedingungen

koeluiert werden. Im ESI-MS sind neben Signalen für das Produkt allerdings keine weiteren zu finden. So befindet sich bei  $m/z$  599.3 der  $[M+H-Boc]^+$ - und bei  $m/z$  699.3 der  $[M+H]^+$ -Peak. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wird oft in ESI- und vor allem in MALDI-ToF Massenspektren beobachtet.

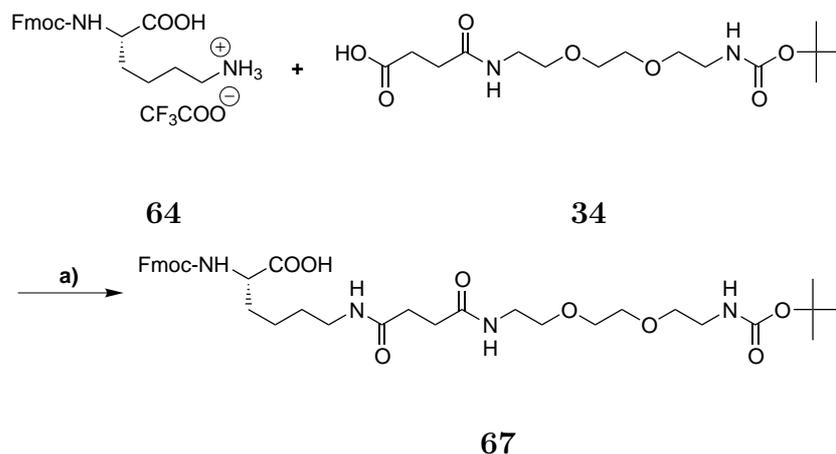


Abbildung 4.35: a) EDC·HCl, NHS, NMM, DMF, RT, 3 h, 79 %.

#### 4.5.2 Darstellung von RGD-Cyclopeptiden

Für die Darstellung der Cyclopeptide (Tab. 4.4) werden zunächst die Aminosäuren mittels Festphasensynthese an 2-Chlortritylharz linear verknüpft. Als erstes wird Glycin als C-terminale Aminosäure an das Harz gekuppelt, da bei dieser Aminosäure eine Epimerisierung während der späteren Cyclisierung nicht möglich ist. Allerdings kann es – während des Elongationsschrittes am Harz – zu niedrigeren Ausbeuten an linearem Peptid aufgrund von Diketopiperazin-Bildung auf der Dipeptid-Stufe kommen. Die Peptidsynthese wird manuell durchgeführt, da sie im Gegensatz zur automatischen Synthese im Peptidsynthesizer eine Reaktionskontrolle bei jedem Schritt leichter ermöglicht. So wird jeder Kupplungs- bzw. auch jeder Entschützungsschritt mittels MALDI-ToF MS, oder wenn notwendig, auch mit Hilfe der analytischen RP-HPLC kontrolliert. Für das Abspalten vom dem sehr säuresensi-

tiven 2-Chlortritylharz wird eine Mischung aus HFIP/DCM (1:4) verwendet. Wie sich gezeigt hat, ist HFIP gerade sauer genug, um eine quantitative Abspaltung vom Harz zu erreichen, ohne jedoch die permanenten Schutzgruppen in der Seitenkette zu entfernen.<sup>[98]</sup> Dieses Verfahren ist daher der Abspaltung mit 1 % TFA in DCM überlegen. Hier kann es bei dem Entfernen des Lösungsmittels zu einer Aufkonzentrierung der TFA kommen, wobei die Gefahr besteht, daß säureempfindliche Schutzgruppen in der Peptidseitenkette abgespalten werden. Bei der Verwendung von HFIP wird dies nicht beobachtet.

**Tabelle 4.4:** Ausbeute und Reinheit der synthetisierten cyclischen RGD-Peptide.

	Peptid	Ausbeute	Reinheit
<b>P1</b>	c(RGDfV)	57 %	100 %
<b>P2</b>	c(RGDfV <sup><math>\beta</math></sup> A)	29 %	100 %
<b>P3</b>	c(RGDfK)	20 %	100 %
<b>P4</b>	c(RGDfK <sup><math>\beta</math></sup> A)	30 %	100 %
<b>P5</b>	c(RGDfK(Linker))	13 %	95 %
<b>P6</b>	c(RGDfK(Linker) <sup><math>\beta</math></sup> A)	29 %	92 %

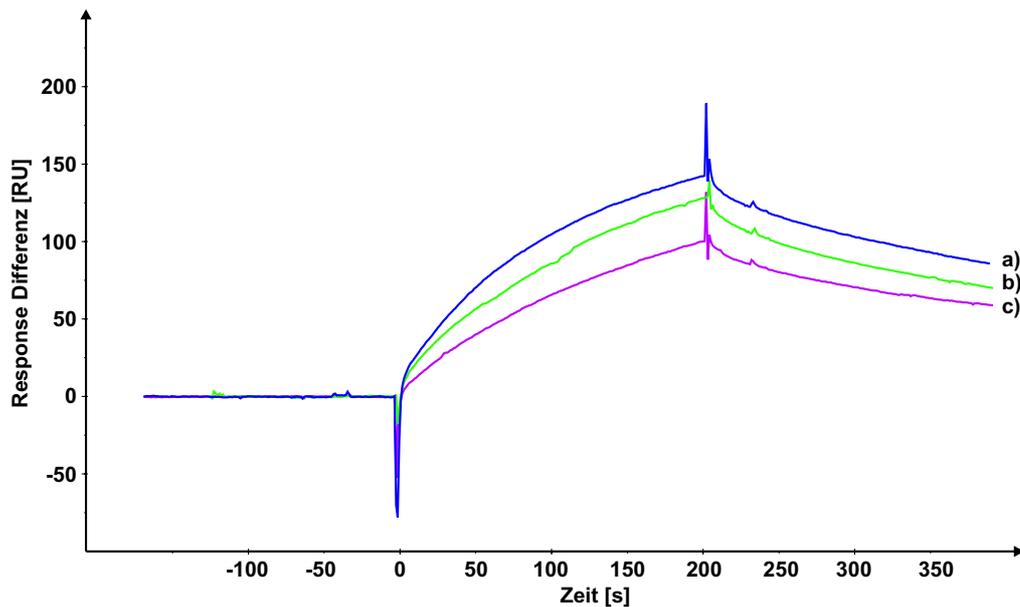
Nach dem Abspalten werden sämtliche Peptide in der Weise cyclisiert, daß gleichzeitig sowohl eine Lösung des linearen Peptides als auch eine Lösung des Kupplungsreagenzes unter Pseudo-Verdünnungsbedingungen zu einer Lösung von DIPEA in DMF mit einer Spritzenpumpe zugegeben werden.<sup>[99, 100]</sup> Durch die langsame Zugabe soll sichergestellt werden, daß die linearen Peptide intramolekular eine Kopf-Schwanz-Cyclisierung eingehen. Nachdem die Cyclisierung abgeschlossen ist, werden die verwendeten säurelabilen Schutzgruppen acidolytisch entfernt. Die Rohprodukte werden anschließend durch Ether-Fällung aus der Reaktionslösung isoliert. Die nach Zugabe von Ether erhaltenen farblosen Feststoffe enthalten noch kleinere Mengen an Verunreinigungen, die durch eine Reinigung mittels präparativer „reversed-phase“-HPLC entfernt werden können.

Die erhaltenen Peptide sind insgesamt hochrein (Tab. 4.4).

Um die Peptide **P5** und **P6**, welche mit dem Linker **34** derivatisiert sind, darstellen zu können, sind zwei Synthesewege getestet worden. Bei dem ersten Weg wird während des linearen Elongationsschrittes Fmoc-Lys(Dde)-OH **66** eingesetzt. Die Dde-Schutzgruppe zeichnet sich dadurch aus, daß sie orthogonal sowohl zu der Boc- als auch zu der Fmoc-Schutzgruppe ist. Nach der Abspaltung von Dde mit 2 % Hydrazin in DMF kann anschließend an der Lysinseitenkette eine Derivatisierung erreicht werden, ohne die temporäre Fmoc-Schutzgruppe zu entfernen. Mit Hilfe des Kupplungsreagenzes TBTU wird nun der Linker **34** (Seite **34**) an die nun entschützte Aminogruppe gekuppelt.<sup>[80]</sup>

Für den zweiten Syntheseweg wird während der linearen Festphasensynthese das bereits vorher synthetisierte Fmoc-Lys(Linker-Boc)-OH **67** eingesetzt.

## 4.5.3 SPR-Studien mit Plazentamembranextrakt



**Abbildung 4.36:** Bindungsexperiment mit Plazentamembranextrakt B an c(RGDfK(Linker)) **P5**. Verdünnung des Membranextraktes mit Integrin-Puffer B: a) 1:1, b) 1:2.5, c) 1:5.

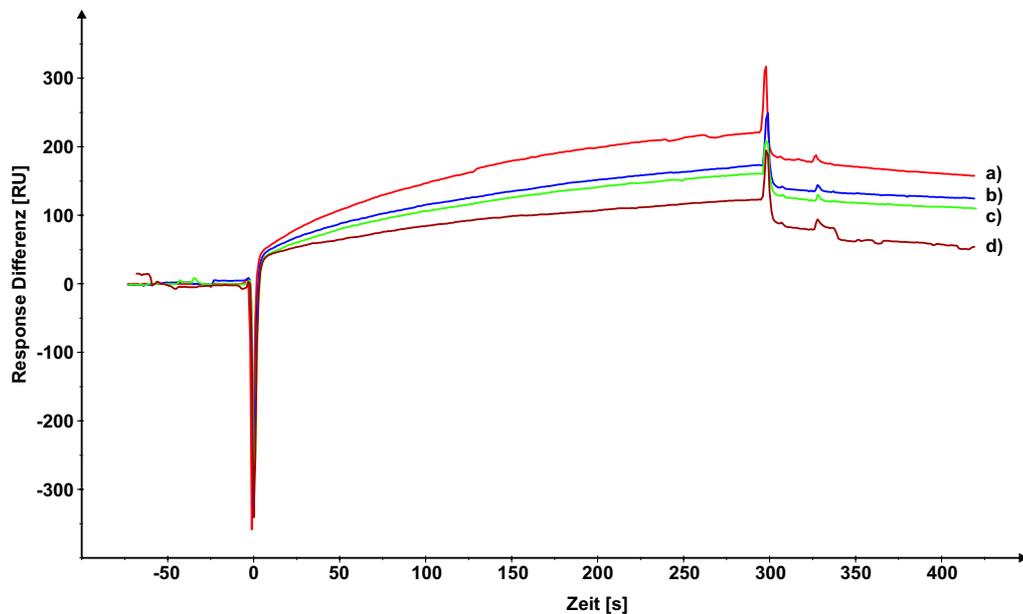
Bindungsexperimente mit dem Peptid c(RGDfK(Linker)) **P5** zeigen, daß Proteine im präparierten Plazentamembranextrakt vorhanden sind, die RGD-abhängig binden. In Abb. 4.36 ist das entsprechende Sensorgramm wiedergegeben. Hierbei wird der Plazentamembranextrakt B mit dem Laufpuffer (Integrin-Puffer B) in unterschiedlichen Verhältnissen verdünnt und dann sukzessiv injiziert. Zur Kontrolle wird wiederum die Referenzsubstraktion durchgeführt. Es wird eine konzentrationsabhängige Bindung an das immobilisierte Peptid **P5** beobachtet. Mit Hilfe der SPR-Studien wurde gefunden, daß sich die gebundenen Proteine durch den EDTA-haltigen Integrin-Elutionspuffer B wieder eluieren lassen.

Zur Kontrolle, ob es sich hierbei tatsächlich um eine spezifische Wechselwirkung handelt, werden Konkurrenzexperimente mit verschiedenen Peptiden durchgeführt.

Tabelle 4.5: Peptide mit ihren entsprechenden  $IC_{50}$ -Werten.

	Peptid	Integrin	$IC_{50}$	Integrin	$IC_{50}$
<b>P1</b>	c(RGDfV)	$\alpha_5\beta_1$	$11 \mu\text{M}^{[101]}$	$\alpha_v\beta_3$	$1 \text{ nM}^{[102]}$
<b>P2</b>	c(RGDfV $^{\beta}$ A)	$\alpha_5\beta_1$	$0.6 \mu\text{M}^{[101]}$	$\alpha_v\beta_3$	nicht bekannt
<b>P3</b>	c(RGDfK)	$\alpha_5\beta_1$	nicht bekannt	$\alpha_v\beta_3$	$2 \text{ nM}^{[103]}$

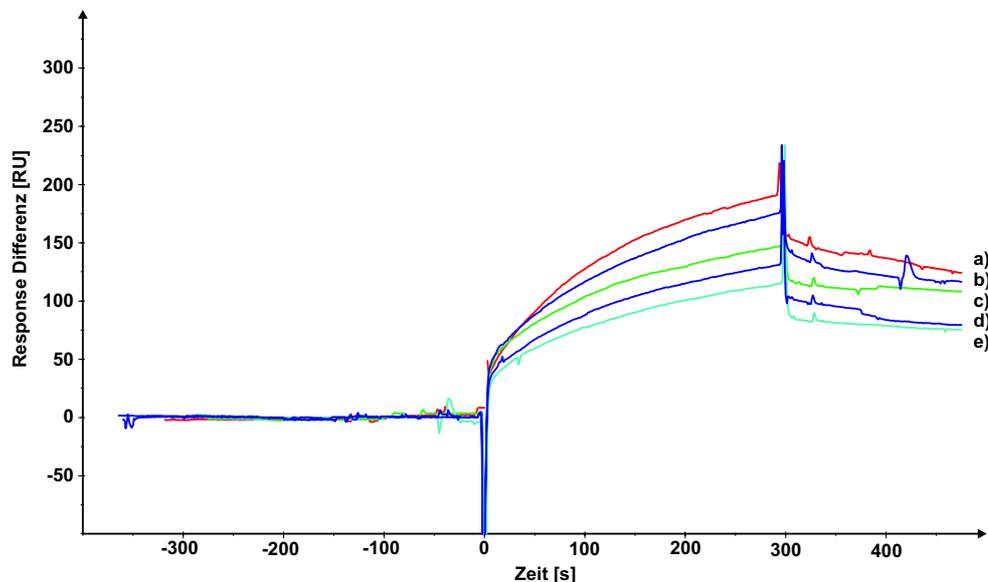
Von diesen Peptiden ist bekannt, daß sie jeweils eine hohe Affinität bzw. Selektivität zu einem bestimmten Integrin haben. In Tab. 4.5 sind die entsprechenden  $IC_{50}$ -Werte, die sich auf die Hemmung der Bindung von Vitronectin ( $\alpha_v\beta_3$ ) bzw. Fibronectin ( $\alpha_5\beta_1$ ) an das entsprechende Integrin beziehen, angegeben.



**Abbildung 4.37:** Konkurrenz in Lösung von verdünntem Plazentamembranextrakt (1:1) mit löslichem c(RGDfV) **P1** an immobilisiertem **P5**. Konzentrationen: a)  $0 \mu\text{M}$ , b)  $100 \mu\text{M}$ , c)  $200 \mu\text{M}$ , d)  $500 \mu\text{M}$ .

Die Konkurrenzstudien in Lösung belegen, daß eine selektive RGD-abhängige Bindung an das immobilisierte Peptid **P5** stattfindet. Dazu wurde zunächst eine kon-

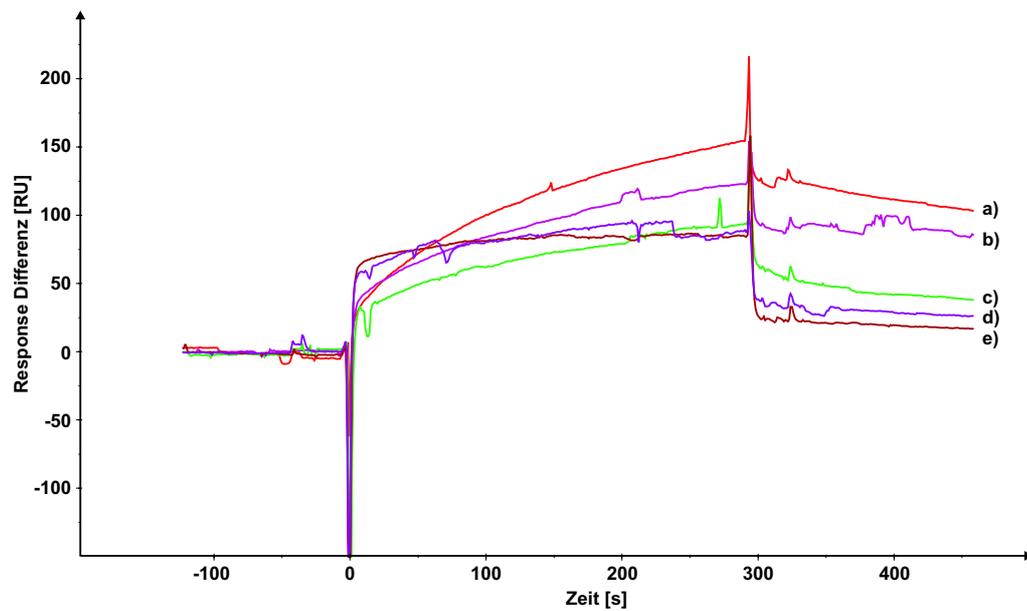
stantgehaltene Verdünnung (1:1) des Plazentamembranextraktes B mit dem Peptid **P1**, welches eine hohe Affinität zu dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  besitzt, 30 min lang inkubiert und dann in das SPR-Gerät injiziert. Abb. 4.37 zeigt, daß eine höhere Peptidkonzentration zu einer Verringerung der Bindung an **P5** führt.



**Abbildung 4.38:** Konkurrenz in Lösung von verdünntem Plazentamembranextrakt (1:1) mit löslichem c(RGDfV <sup>$\beta$</sup> A) **P2**. Konzentrationen: a) 0  $\mu$ M, b) 100  $\mu$ M, c) 200  $\mu$ M, d) 500 nM, e) 1 mM.

Die Bindung von Fibronectin an das Integrin  $\alpha_5\beta_1$  wird von dem Peptid **P2** gut inhibiert.<sup>[101]</sup> Konkurrenzstudien in Lösung mit diesem Peptid gegen den Plazentamembranextrakt zeigen hier ebenfalls eine Verringerung der Bindung an **P5** bei steigender Konzentration des Peptides **P2**.

Mit dem Stammpeptid **P3**, von dem **P5** abgeleitet ist, wurden ebenfalls Konkurrenzstudien durchgeführt. Von **P3** ist bekannt, daß es mit einer sehr hohen Affinität zu dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  bindet (Tab. 4.5).<sup>[104]</sup> Die mit den beiden Peptiden **P1** und **P2** gemachten Beobachtungen werden auch hier verifiziert.



**Abbildung 4.39:** Konkurrenz von verdünntem Plazentamembranextrakt (1:1) mit löslichem c(RGDfK) **P3**. Konzentrationen: a) 0  $\mu\text{M}$ , b) 100  $\mu\text{M}$ , c) 200  $\mu\text{M}$ , d) 500  $\mu\text{M}$ , e) 1 mM.

Mit Hilfe dieser Untersuchungen läßt sich sagen, daß mit einer sehr großen Wahrscheinlichkeit mehrere RGD-abhängig bindende Integrine bzw. auch deren assoziierte Proteine, die in dem Plazentamembranextrakt vorkommen, an das immobilisierte Peptid c(RGDfK(Linker)) **P5** binden.

Die oben gemachten Konkurrenzstudien zeigen in Kombination mit Erfahrungen aus der Arbeitsgruppe,<sup>[103]</sup> daß die zwei Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_5\beta_1$  eine gute Affinität zum Peptid **P5** besitzen. Ein weiteres Indiz, daß es sich um Integrine handeln kann, die an **P5** binden, ist in dem Elutionsverhalten mit EDTA-haltigen Puffern zu finden, da die Fähigkeit der Integrine Liganden zu binden stark von der  $\text{Ca}^{2+}$ - bzw. der  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionenkonzentration abhängt. Werden den Integrinen diese Ionen entzogen, so wird auch keine Bindung mehr beobachtet.<sup>[28]</sup>

#### 4.5.4 Diskussion

Für biologische Tests wurden cyclische RGD-Peptide synthetisiert. Neben den nicht-derivatisierten Peptiden **P1–P4** wurden zwei neue Peptide **P5** und **P6** dargestellt, welche mit einem Linker an der Lysinseitenkette versehen sind. Die Peptide **P5** und **P6** sollten sich über die Aminogruppe des Linkers an einer stationären Phase immobilisieren lassen.

Für die Synthese der Peptide **P5** und **P6** wurden unterschiedliche Synthesewege getestet. Sowohl die Dde-gestützte Synthese als auch der Einsatz des bereits vorher derivatisierten Lysins führen zu ähnlichen Ausbeuten und Reinheiten.

Die Verwendung von Fmoc-Lys(Alloc)-OH für die Darstellung der Peptide **P5** und **P6** führt zu einer Ausbeute, die nur ein Zehntel dessen erreicht, was mit den neuen Synthesewegen möglich ist. In eigenen Versuchen hat sich gezeigt, daß die Entfernung der Alloc-Schutzgruppe mit Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> problematisch sein kann bzw. unvollständig bleibt. Als Allylgruppen-„scavenger“ wurden sowohl *N*-Methylmorpholin als auch Phenylsilan, welches für besonders milde Bedingungen gute Ausbeuten liefert, eingesetzt. Ein weiteres Problem stellen Rückstände des Katalysators Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> dar, welcher nicht vollständig vom Harz wieder entfernt werden konnte, obwohl mit Dithiocarbamat, was zum Entfernen der Katalysatorreste empfohlen wird, gewaschen wurde.<sup>[105–109]</sup> Die nachfolgenden Kupplungsreaktionen verlaufen dann nicht mehr vollständig.

Um zu überprüfen, ob die neuen Peptide über eine biologische Aktivität verfügen, wurden SPR-Studien durchgeführt. Das Peptid **P5** wurde auf einen Sensorchip immobilisiert und mittels SPR-Studien hinsichtlich seiner Affinität zu RGD-abhängig bindende Proteinen hin überprüft. Dazu wurde ein präparierter Plazentamembranextrakt verwendet, der eine gute Quelle für z. B. Integrine ist.<sup>[28]</sup> Aus den durchgeführten Wettbewerbsstudien in Lösung mit den Peptiden **P1**, **P2** und **P3**, die sich als gute Bindungspartner zu bestimmten Integrinen erwiesen haben, kann abgeleitet

werden, daß offensichtlich mehrere RGD-abhängig bindende Integrine und eventuell auch deren Assoziationspartner an das immobilisierte Peptid **P5** binden. Da mit den SPR-Studien bewiesen wurde, daß **P5** über eine biologische Aktivität verfügt, kann es für affinitätschromatographische Isolierungen von Proteinen eingesetzt werden. Auf diese Weise soll ein spezielles Subproteom für RGD-abhängig bindende Proteine erzeugt werden.

## 4.6 Subproteome aus Plazenta

Plazentagewebe ist eine gute Quelle zur Isolierung von Proteinen. Aufgrund der Tatsache, daß sie relativ leicht zu beschaffen ist, wird sie häufig zur Gewinnung von z. B. Integrinen benutzt.<sup>[110]</sup>

Da Plazentagewebe sehr proteinreich ist, sollte versucht werden, neben Integrinen auch MMPs zu isolieren. Als schnell wachsendes und sich veränderndes Gewebe wurde vermutet, daß es MMPs des Kollagenase- und Gelatinase-Typs enthalten sollte, da besonders diese Enzyme stark an Um- und Abbauprozessen in Geweben beteiligt sind (Tab. 2.2). Eine Isolierung von MMPs aus Plazentagewebe wurde bislang noch nicht beschrieben, so daß aufbauend bzw. ableitend von bekannten Versuchsvorschriften zur Isolierung von MMPs eine neue Methode ausgearbeitet wurde. So sind MMPs bereits schon aus Muskelgewebe von Ratten,<sup>[111]</sup> aus Aortagewebe,<sup>[112]</sup> und aus Leukozyten isoliert worden.<sup>[113]</sup> Um möglichst reine MMPs und Integrine zu erhalten, werden Expressionssysteme auf Basis von Zellkulturtechnik benutzt. Rekombinant hergestellte, sekretierte Proteine sind idealerweise schon so rein, daß eine weitergehende Aufreinigung meist nicht notwendig ist.<sup>[110,114]</sup>

## 4.6.1 Plazentapräparation

Das frisch aufgetaute Gewebe wird zunächst zerkleinert, mit MMP-Puffer A versetzt und homogenisiert (Abb. 4.40). Da sich die Zusammensetzung des MMP-Puffers A und des Integrin Puffers B, welcher von Eble *et al.* verwendet wird,<sup>[110]</sup> nicht so stark unterscheiden, sollte davon ausgegangen werden, daß die Integrinaktivität während der Gewebeaufarbeitung erhalten bleibt.<sup>[115,116]</sup> Nach der Zentrifugation wird der Überstand, der die löslichen MMPs enthalten sollte, abdekantiert. Das Pellet wird noch einmal in MMP-Puffer A resuspendiert und zentrifugiert, um das Membrangewebe auf diese Weise noch einmal zu waschen. Das so erhaltene Pellet kann sowohl in Integrin Extraktionspuffer A als auch in B resuspendiert werden, um die membranständigen Integrine zu solubilisieren.<sup>[110,117]</sup> Die Integrin Extraktionspuffer sind aufgrund ihrer hohen Detergenzkonzentration in der Lage, die natürliche Lipidumgebung integraler Membranproteine nachzuahmen.

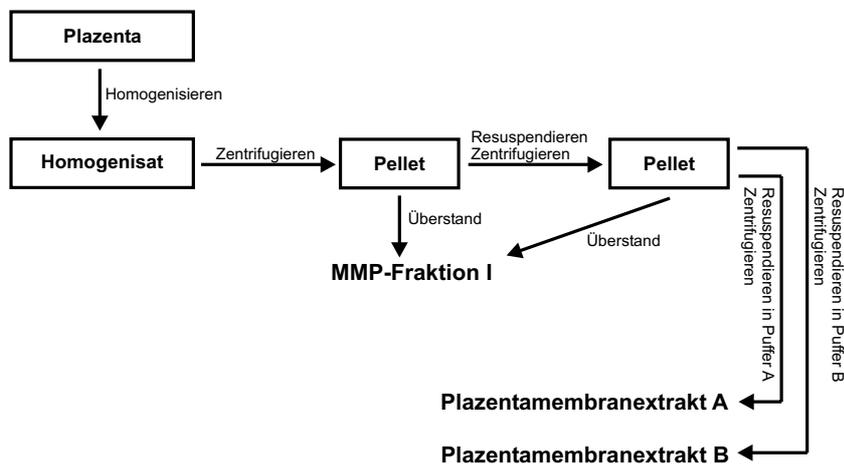
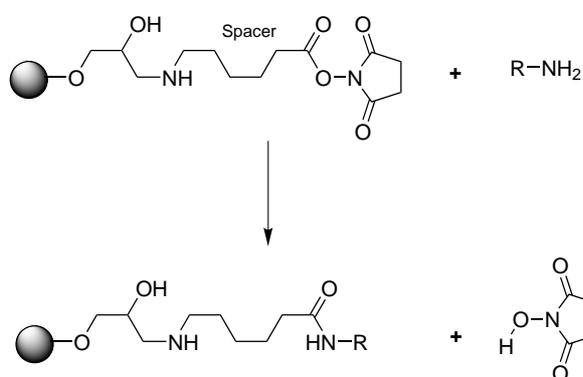


Abbildung 4.40: Schematische Darstellung der Plazentapräparation.

#### 4.6.2 Herstellung von Affinitätssäulen

##### Selektive Säule für MMPs (Säule I)

Für die Herstellung einer Affinitätssäule zur Isolierung und Aufreinigung von MMPs wird das Marimastat-Derivat **18** an eine NHS-aktivierte Sepharosematrix gekuppelt. Für die Reaktion wird das Marimastat-Derivat **18** in HBS-EP-Puffer gelöst und anschließend auf die Säule aufgetragen. In Abb. 4.41 ist die Ligandenkupplung schematisch wiedergegeben.



**Abbildung 4.41:** Ligandenkupplung an NHS-aktiverter Sepharose.

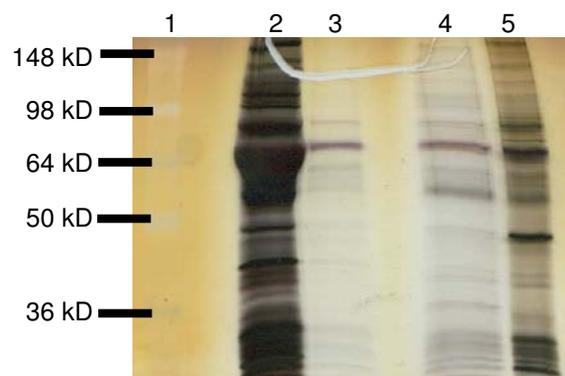
Bei der Kupplungsreaktion reagiert die Aminogruppe im wässrigen Milieu bei pH 6–9 sehr schnell und effizient mit dem NHS-Aktivester. Die Reaktion ist nach 1–2 h beendet. Dabei wird der Fortschritt bzw. das Ende der Reaktion durch analytische HPLC ermittelt. Aus dem Integralverhältnis vor und nach der Kupplungsreaktion wurde berechnet, daß die Säule mit 6  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  der theoretisch möglichen 10  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  beladen werden konnte. Bevor die Säule eingesetzt wird, müssen die NHS-Gruppen, die nicht mit **18** reagiert haben, deaktiviert werden. Dazu wird die Säule mit MMP-Puffer A gewaschen und über Nacht bei 4 °C belassen. Die primäre Aminogruppe der Tris-Puffersubstanz reagiert dabei mit den noch vorhandenen NHS-Aktivestern, wobei diese deaktiviert werden.

### Integrinselektive Säule (Säule II)

Zur Herstellung einer Affinitätssäule, die eine Selektivität für Integrine aufweist, wird das Peptid c(RGDfK(Linker)) **P5** an NHS-aktivierte Sepharose gekuppelt. Dazu wird eine Lösung aus **P5** in Kupplungspuffer auf die Säule aufgetragen. Die Reaktion ist nach 1 h mit einer Effizienz von 86 % (RP-HPLC) abgeschlossen.

#### 4.6.3 Affinitätschromatographisches Auffinden von MMPs

Durch die Verwendung eines immobilisierten Liganden, der eine hohe Affinität zu MMPs besitzt, sollte ein Subproteom erzeugt werden können, daß anschließend erheblich schneller und einfacher zu analysieren ist. Dabei sollen sowohl sämtliche MMPs als auch deren assoziierte Proteine aus einer Lösung „gefischt“ werden.



**Abbildung 4.42:** Ergebnis der Affinitätschromatographie von Plazentaextrakt an immobilisiertem **18**. (10%iges Trenngel, Silberfärbung, 1: Marker (SeeBluePlus 2 Pre-Stained Standard); 2: Plazentaextrakt; 3: Waschdurchlauf; 4: Elution I; 5: Elution II.)

Die aus der Plazentapräparation erhaltene MMP-Fraktion I wird mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule I aufgetragen. Damit die Säule möglichst hoch mit MMPs gesättigt ist, wird das gesamte Volumen der Fraktion aufgetragen.

Nach der Beendigung der Zugabe wird gründlich mit 30 Säulenvolumina MMP-Waschpuffer A gewaschen. In SPR-Studien wurde belegt, daß sich die gebundene MMP-2 durch Waschen der Sensorchipoberfläche mit HBS-EP-Puffer relativ mild eluieren läßt (s. o.). Folglich wird zunächst der EDTA-haltige HBS-EP-Puffer verwendet, um gebundene MMPs zu eluieren (Elution I). Ebenfalls läßt sich durch eine Erhöhung der Salzkonzentration als auch durch eine Änderung des pH-Wertes eine Elution eines Proteins herbeiführen. Der MMP-Elutionspuffer A besitzt diese beiden Eigenschaften, so daß die Proteine, die noch nicht bei dem ersten Elutionsschritt von der Matrix gelöst wurden, in diesem Fall eluiert werden sollten (Elution II).<sup>[118]</sup>

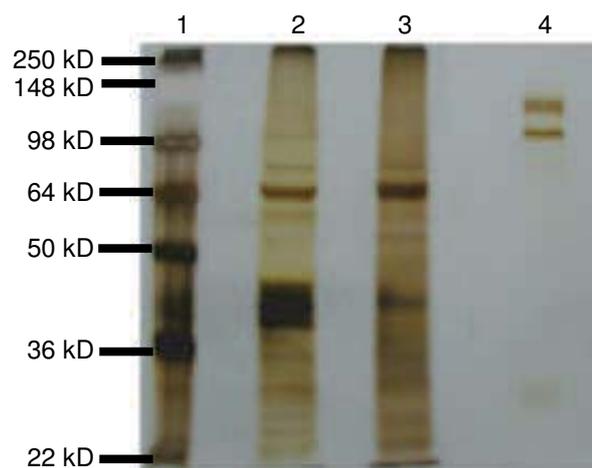
In Abb. 4.42 ist das Ergebnis der Affinitätschromatographie mit dem Marimastat-Derivat **18** wiedergegeben. Bei der Bahn 4 als auch bei der Bahn 5 ist zu erkennen, daß die Komplexität des Proteinmusters erniedrigt wurde. In Bahn 5 sind jedoch einige Banden deutlicher zu erkennen als in Bahn 4. Offensichtlich lassen sich mit den drastischeren Bedingungen des MMP-Elutionspuffers A deutlich mehr Proteine eluieren.

Für eine Analyse dieses auf Basis eines breitbandigen MMP-Inhibitors erzeugten Subproteoms müssen die einzelnen Proteinflecke nach dem Standardverfahren ausgeschnitten und anschließend nach einem tryptischen Verdau mittels MALDI-ToF MS fingerprint Analyse charakterisiert werden.

Ebenfalls wäre es möglich nach der Affinitätschromatographie einen tryptischen Verdau mit nachfolgender RP-HPLC durchzuführen. Die aufgefangenen Fraktionen können dann massenspektrometrisch untersucht werden. Multidimensionale chromatographische Ansätze dieser Art haben sowohl den Vorteil der Automation als auch den des hohen Durchsatzes (Kap.2.1).<sup>[8]</sup>

#### 4.6.4 Isolierung von RGD-abhängig bindenden Proteinen

Die Isolierung und Auffindung von allen RGD-abhängig bindenden Proteinen, wie z. B. Integrinen, mittels Affinitätschromatographie setzt bei einem funktionellen Proteomansatz einen immobilisierten Liganden voraus, der eine gute Selektivität für solche Proteine besitzt. Zur Erzeugung eines entsprechenden Subproteoms sollen RGD-Peptide, die sich als gute Bindungspartner für einige Integrine erwiesen haben (Kap. 2.5), eingesetzt werden. Zur Immobilisierung eines Peptides ist eine Derivatisierung mit einem Linker notwendig, welche sich nicht negativ auf die Bindungseigenschaften auswirken darf. Von dem underivatisierten Peptid c(RGDfK) **P3** ist bekannt, daß es eine signifikante Affinität zu Integrinen besitzt, die zur  $\alpha_v$ -Untergruppe gehören. So bindet es z. B. sowohl an das  $\alpha_v\beta_3$ - als auch an das  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin.<sup>[33,119]</sup>



**Abbildung 4.43:** Ergebnis der Isolierung der Integrine mittels SDS-PAGE. (10%iges Trenngel, Silberfärbung, 1: Marker (SeeBluePlus 2 Pre-Stained Standard); 2: Plazentamembranextrakt; 3: Extrakt durchlauf; 4: Produkte der Isolierung mittels Peptid **P5**.<sup>[103]</sup>)

Eine Derivatisierung des Peptids an der Aminogruppe der Lysinseitenkette führt sogar oft zu einer stärkeren Bindung der genannten Integrine.<sup>[104, 120]</sup> Bei eigenen Untersuchungen hat sich nach SPR-Studien erwiesen, daß das Peptid c(RGDfK(Linker)) **P5** eine RGD-abhängige Affinität zu Proteinen aus Plazentamembranextrakt besitzt.

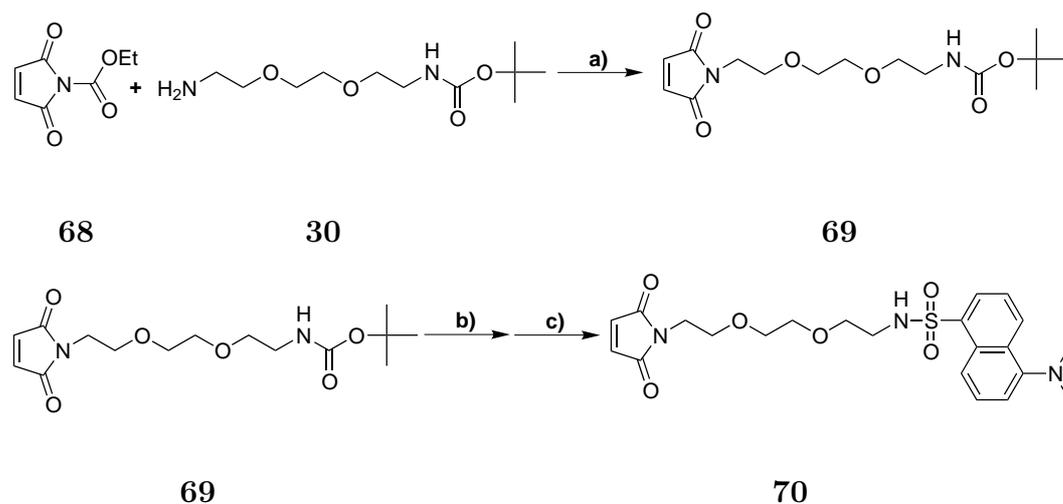
Die affinitätschromatographische Isolierung von RGD-abhängig bindenden Proteinen aus Plazentamembranextrakt mit dem Peptid **P5** wurde von Tobias Schulz im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt.<sup>[103]</sup> Abbildung 4.43 zeigt das Ergebnis dieser Isolierungsstrategie. Durch Western-Blotting konnte gezeigt werden, daß die auf diese Weise gewonnene Proteinfraction (Bahn 4) neben  $\alpha_v\beta_3$  noch die Integrine  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  enthält.<sup>[103]</sup>

Die Bindung der Proteine ist auf die gemeinsame Erkennung der RGD-Sequenz zurückzuführen. Mit der dieser Proteinisolierung konnte beispielhaft gezeigt werden, daß durch Wahl und Design eines geeigneten, relativ unspezifischen Liganden, wie hier das Peptid **P5**, ein funktioneller Proteomansatz verfolgt werden kann. Durch veränderte Wasch- und Elutionsbedingungen sollte ein Interactomics-Ansatz verfolgt werden können, bei dem auch entsprechende Interaktionspartner mitisoliert werden.

## 4.7 Synthese eines Maleinimidderivates

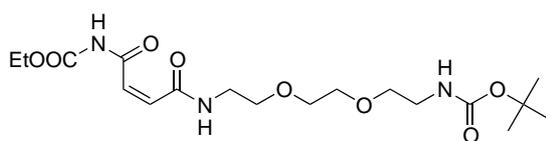
Maleinimid bzw. Maleinimidderivate reagieren mit freien Sulfhydrylgruppen. Mit der Verknüpfung eines Maleinimids mit einem Fluoreszenzfarbstoffes können dann die Proteine, deren SH-Gruppen markiert wurden, detektiert werden.

Das Maleinimidderivat **70** ist in 3 Stufen (Abb. 4.44) zugänglich. Zunächst wird das nach Umsetzung mit Ethylchlorkohlensäure voraktivierte Maleinimid **68**, mit dem mono-Boc-geschützten Linker **30** unter Eiskühlung in einem  $\text{NaHCO}_3$ -Puffer zur Reaktion gebracht. Dabei entsteht intermediär ein Imid-Amid **71**. Begleitet wird die



**Abbildung 4.44:** a)  $\text{NaHCO}_3$ , THF/ $\text{H}_2\text{O}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 1.5 h, 60 %; b) TFA/DCM (1:1), RT, 45 min, 99 %; c) Dansylchlorid **55**,  $\text{NEt}_3$ , DCM,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 2.5 h, 64 %

Reaktion durch eine Absenkung des pH-Wertes, weshalb es erforderlich sein kann, weiteres  $\text{NaHCO}_3$  als Puffer hinzuzufügen.<sup>[121]</sup> Aus früheren Studien an diesem Reaktionstyp wurde empirisch gefunden, daß der Ringschluß zum Maleinimid einen pH-Wert von 8.5 benötigt. Desweiteren scheint das Hydrogencarbonation einen katalytischen Einfluß zu besitzen.<sup>[73]</sup> Nach Säulenchromatographie wird dann **69** in 60 % Ausbeute als farbloses Öl erhalten. Die Verbindung wird anhand der NMR- und Massenspektren eindeutig charakterisiert.



**71**

Nachdem die Boc-Schutzgruppe entfernt wurde, wird die freie Aminogruppe mit Dansylchlorid **55** zu dem Derivat **70** umgesetzt. Nach Säulenchromatographie wird das Produkt als gelb fluoreszierendes Öl mit einer Ausbeute von 64 % rein erhalten.

### 4.7.1 Diskussion

Eine Derivatisierung von **69** mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen konnte nicht erreicht werden (Abb. 4.45). Die Kupplung von z. B. 5(6)-Carboxyfluorescein führte zu einer sehr hohen Wasserlöslichkeit des Produktes, was eine Aufarbeitung sehr erschwert hat. Desweiteren hydrolysierte das Maleinimid **73** beim Aufkonzentrieren bzw. Einengen. Eine mögliche Ursache ist in dem phenolischen Proton der Fluoresceingruppe zu suchen, welches offensichtlich eine genügend hohe Acidität besitzt, um eine Ringöffnung herbeizuführen. Es ist bekannt, daß solche Maleinimidverbindungen sehr leicht durch Wechsel des pH-Wertes abgespalten werden können, weshalb sie auch Anwendung als Schutzgruppe gefunden haben.<sup>[73]</sup> Probleme dieser Art wurden bei der Synthese des Dansyl-Derivates **70** nicht beobachtet.

Die Verbindung **70** kann zur Sulfhydrylgruppenmarkierung von Proteinen/Peptiden benutzt werden, da die Maleinimidgruppe sehr leicht mit ihnen reagiert. Die Substanz wurde an Prof. Dr. K. Dietz (Universität Bielefeld, Fakultät für Biologie) zwecks biologischer Untersuchungen (Kap. 2.13) übergeben. Die Ergebnisse zu diesen Studien liegen derzeit noch nicht vor.

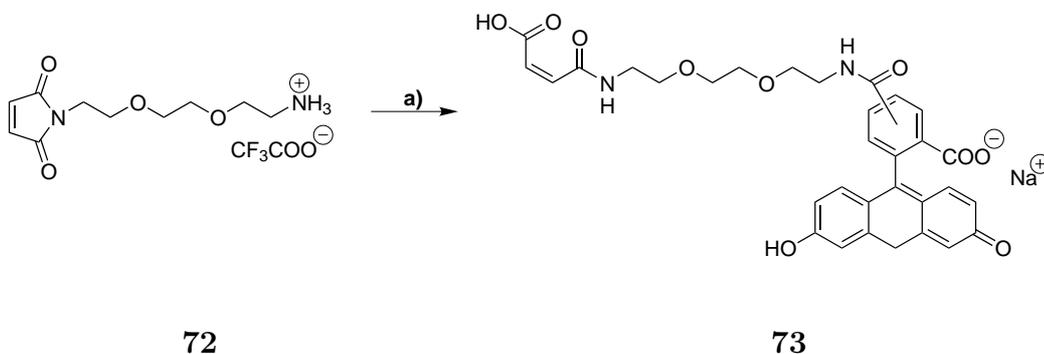


Abbildung 4.45: a) 5(6)-Carboxyfluorescein, EDC·HCl, NMM, DMF, RT, 4 h.

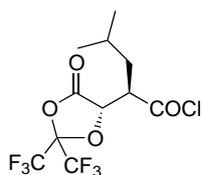
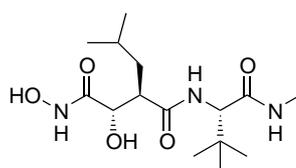
## 5 Zusammenfassung

Das Proteom beschreibt die Gesamtheit der Proteine, die von einem Organismus unter bestimmten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimiert wird. Die Proteomik ist dabei die Disziplin, die in einem parallelisierten Ansatz eine Analyse aller Proteine in einer Zelle, Gewebe oder Flüssigkeit betreibt. Wegen der enorm großen Anzahl exprimierter Proteine in einer Zelle unterliegt die Proteomanalyse einigen Schwierigkeiten, weshalb es notwendig ist, neue Konzepte zu entwickeln.

Die vorgestellten experimentellen Arbeiten für eine neue, aktivitätsbasierte Methode in der *funktionellen Proteomik* beschäftigen sich mit der Darstellung immobilisierbarer Liganden, die Affinität zu Proteinen der Zellmembran oder der extrazellulären Matrix besitzen. Ziel ist es, z. B. mittels Affinitätschromatographie Proteinfamilien und etwa gleichzeitig auch deren Interaktionspartner zu isolieren. Die auf dieser Basis erzeugten Subproteome sollten sich einfacher und schneller als das Gesamtproteom analysieren lassen.

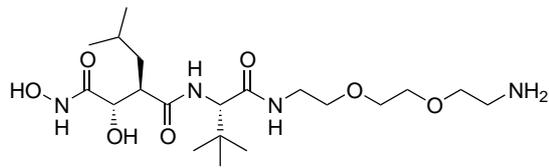
Für ein erstes Testsystem wurde ein Hydroxamsäure-Inhibitor für Matrixmetalloproteinasen (MMP) mit einem Linker versehen, um Immobilisierung oder weitere Derivatisierungen zu ermöglichen. Die MMPs, die neben den Integrinen, ADAMs, TIMPs und vielen mehr, zu den Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) gehören, sind schon lange im Blickfeld der pharmazeutischen Industrie, da viele Krankheiten ursächlich auf eine Störung im Zusammenspiel der Proteine in der ECM zurückzuführen sind. Die Forschung verspricht sich hier neue Ansätze bei der Suche nach Leitstrukturen für die Entwicklung von Medikamenten.

Als erste Testsubstanz wurde Marimastat **7** ausgewählt, das ein breites Inhibitionsspektrum für MMPs aufweist. Die neue Synthese stützt sich auf ein reaktives hexafluoracetongeschütztes Säurechloridderivat **17** einer  $\alpha$ -Hydroxydicarbonsäure und erlaubt einen modularen Aufbau von neuen immobilisierbaren Marimastat-Derivaten. Außerdem konnten ebenfalls bedeutende Ausbeutesteigerungen bei der Synthese von Marimastat **7** erreicht werden.

**17****7**

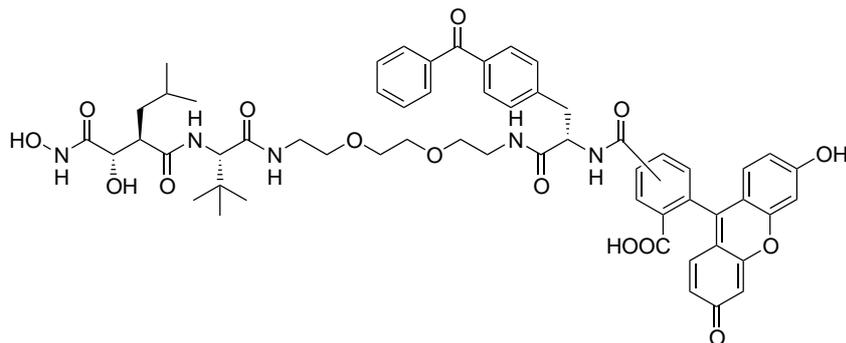
Ein mit einem Linker zur Immobilisierung versehenes Marimastat-Derivat **18** wurde erstmals in Lösung synthetisiert. Oberflächenplasmonresonanz-Studien wurden durchgeführt, um die neue Verbindung auf Bindungseigenschaften zu MMPs zu prüfen. Für die exemplarischen Studien wurde MMP-2 (Gelatinase A) ausgewählt, da sie einen guten  $IC_{50}$ -Wert gegen die Stammverbindung Marimastat **7** besitzt. Die SPR-Studien belegen, daß die Derivatisierung mit einem Linker nicht zu einer Verschlechterung der Bindungseigenschaften führt. Als weitere Testsubstanz wurde ADAM9 eingesetzt. Bei den ADAMs („A Disintegrin And Metalloprotease“) handelt es sich ebenfalls um Proteine der extrazellulären Matrix die neben der Metalloproteinasedomäne über eine Disintegrindomäne verfügen. Es sollte überprüft werden, ob das neue Marimastat-Derivat **18** als Breitbandinhibitor eine Affinität zu der Metalloproteinasedomäne aufweist. In den Studien konnte belegt werden, daß das neue Derivat eine gute Affinität zu ADAM9 aufweist, wobei unspezifische Wechselwirkungen ausgeschlossen werden können.

Die Verwendung eines derivatisierten Breitbandinhibitors erlaubt es ein Subproteom zu erzeugen, das hauptsächlich MMPs und gegebenenfalls mit diesen assoziierte Pro-



18

teine enthält. Außerdem ließen sich auch neue, noch nicht entdeckte MMPs leichter entdecken. Deshalb wurden affinitätschromatographische Experimente an immobilisiertem Marimastat-Derivat **18** mit Plazentaextrakt durchgeführt. Nach der Affinitätschromatographie konnte auf dem SDS-Polyacrylamidgel beobachtet werden, daß das Komplexitätsmuster der Proteine nach der Elution deutlich erniedrigt war. Daraus kann geschlossen werden, daß die neue Verbindung prinzipiell für die affinitätschromatographische Isolierung bei einem aktivitätsbasierten, funktionellen Proteomikansatz eingesetzt werden kann.

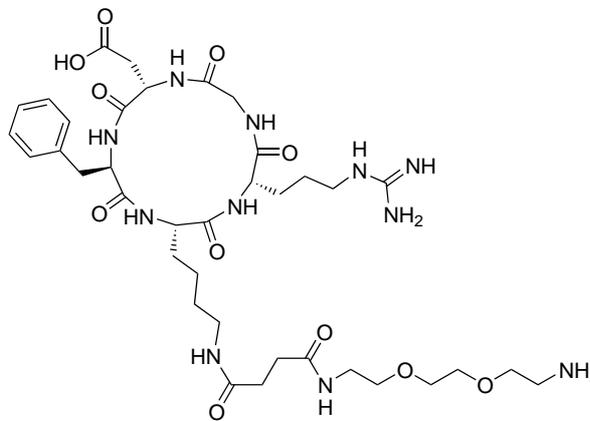


63

Weiterhin wurden neue Marimastat-Derivate synthetisiert, wie z. B. **63**, die an der freien Aminogruppe des Linkers über ein Konstrukt aus einer Reportergruppe (Fluoreszenzfarbstoffe) und einer Reaktivgruppe (Photoaffinitätsmarker) verfügen. Nach Inkubation eines Zellaufschlusses mit Verbindungen dieses Typs wird durch Bestrahlung eine kovalente Bindung zwischen Inhibitor mit Reportergruppe und MMP hergestellt, die auch unter den denaturierenden Bedingungen einer

SDS-Gelelektrophorese bestehen bleibt. Damit würden sich MMPs auf einem Polyacrylamidgel selektiv detektieren lassen.

Eine analoge Strategie erlaubt die Anreicherung von Integrinen, transmembranen Glycoproteinrezeptoren, die bei der Zelladhäsion eine Rolle spielen und in viele physiologische und pathologische Geschehen involviert sind. Cyclische RGD-Peptide weisen gute Affinität zu bestimmten Integrinen auf. Daher wurden modifizierte RGD-Peptide synthetisiert, die über einen Linker an einer festen Phase immobilisiert werden können.



**P5**

Zur Überprüfung der Bindungseigenschaften wurden SPR-Studien mit präpariertem Plazentamembranextrakt an dem immobilisiertem Peptid c(RGDfK(Linker)) **P5** durchgeführt. Die SPR-Studien belegen, daß eine selektive RGD-abhängige Bindung an immobilisiertes **P5** stattfindet.

Mit einer nachfolgenden Affinitätschromatographie konnten mehrere RGD-abhängig bindende Proteine angereichert werden. Das Peptid **P5** ist ein Ligand für Integrine und erlaubt in der funktionellen Proteomik die Erzeugung eines Integrinsubproteoms.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Allgemeine Arbeitsmethoden

Zur Schmelzpunktbestimmung wurde das Gerät Büchi Melting Point B-540 verwendet; die angegebenen Werte sind nicht korrigiert.

Die optischen Drehwerte wurden mit dem Polarimeter DIP-360 der Firma Jasco ermittelt.

Die Infrarotspektren wurden mit einem Spektrometer FT/IR-410 des Herstellers Jasco nach Basislinienkorrektur erhalten.

Die  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden auf den Geräten Bruker AM 250 (Basisfrequenz: 249.9 MHz für  $^1\text{H}$  und 62.9 MHz für  $^{13}\text{C}$ , Temperatur: 303 K) und Bruker DRX 500 (Basisfrequenz: 499.9 MHz für  $^1\text{H}$  und 125.7 MHz für  $^{13}\text{C}$ , Temperatur: 298 K) aufgenommen. Bei der Aufnahme von  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurde die Breitbandentkopplung in Kombination mit  $J$ -moduliertem Spinechoexperimenten verwendet. Die Angabe, ob es sich um p, s, t, oder q Kohlenstoffatome handelt, ist dann angegeben, wenn  $^{13}\text{C}$ -DEPT-Spektren gemessen wurden.  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren wurden ohne  $^1\text{H}$ -Breitbandentkopplung aufgenommen. Der verwendete Standard ist bei den entsprechenden Spektren angegeben.

Die Massenspektren wurden mit dem Gerät VG Autospec (Fisons) aufgenommen. Als Ionisationsverfahren diente die chemische Ionisation oder die Elektronenstoßionisation bei 70 eV; angegeben ist die relative Intensität der Signale bezüglich des

Basispeaks. Die MALDI-ToF-Spektren wurden mit dem Voyager System DE (PE Biosystems) gemessen. Für die Aufnahme der ESI-Massenspektren wurde das Gerät Esquire 3000 (Bruker) verwendet. Die angegebenen berechneten Molekül- bzw. Pseudomolekülionenmassen sind monoisotopische Massen.

Die Massenfeinbestimmungen wurden auf einem Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometer APEX III (Bruker) mit einem supraleitenden 7.0 T-Magneten durchgeführt.

Für „reversed-phase“-HPLC wurden folgende Geräte und Parameter verwendet:

**analytisch:** Pumpe: Thermo Separation Products P4000, Detektor: Thermo Separation Products UV6000LP bei  $\lambda = 220$  nm,  $\lambda = 256$  nm und  $\lambda = 290$  nm, Säule: Vydac Protein and Peptide C18 ( $5 \mu\text{m}$ ,  $250 \times 4.6$  mm) oder Phenomenex Jupiter C18 ( $5 \mu\text{m}$ ,  $250 \times 4.6$  mm), Flußrate: 1.0 ml/min.

**präparativ:** Pumpe: Thermo Separation Products P4000, Detektor: Thermo Separation Products UV1000 bei  $\lambda = 220$  nm, Säule: Vydac Protein and Peptide C18 ( $10 \mu\text{m}$ ,  $250 \times 22$  mm), Flußrate: 10 ml/min.

**Eluent A:** Wasser/Acetonitril/TFA (95/5/0.1) (v/v/v)

**Eluent B:** Wasser/Acetonitril/TFA (5/95/0.1) (v/v/v)

<b>Gradient</b>	0–5 min	100 % A
	5–30 min	100 % A–70 % A/30 % B
	30–40 min	70 % A/30 % B–100 % B
	40–50 min	100 % B–100 % A

Zur Säulenchromatographie bzw. Flashchromatographie wurde Kieselgel 60, 0.063–0.200 mm, sowie 0.040–0.063 mm (Merck) verwendet.

Die Dünnschicht-Chromatographie erfolgte mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> auf Al-Folie der Firma Merck. Zur Detektion diente ein UV-Strahler MinUVIS der Firma Desaga. Die Zusammensetzung der Laufmittelgemische ist in Volumenverhältnissen angegeben.

Die Elementaranalysen wurden mit dem Gerät CHNS-932 der Firma Leco durchgeführt.

Die verwendeten Lösungsmittel wurden destillativ gereinigt, wenn nötig nach den üblichen Verfahren absolutiert. Für die Synthesen unter Inertgas wurde nachgetrockneter Stickstoff verwendet. Acetonitril für die HPLC wurde von der Firma Merck in Lichrosolv-Qualität bezogen. Wasser für die HPLC und für die unten genannten Puffer wurde einer MilliQ Reinstwasseranlage (Millipore) entnommen.

Die Verbindungen (2*S*,3*R*)-2-Hydroxy-3-isobutylbernsteinsäure **15** und (2*R*)-4-Methyl-2-((4*S*)-5-oxo-2,2-bis-(trifluormethyl)-1,3-dioxolan-4-yl)pentansäurechlorid **17** (Seite 43) wurden, wie bereits in der eigenen Diplomarbeit beschrieben und veröffentlicht, synthetisiert.<sup>[75,76]</sup>

## 6.2 Allgemeine Angaben zu den biochemischen Experimenten

### 6.2.1 Puffer

MMP-Puffer A	50 mM Tris·HCl pH 7.5, 0.2 M NaCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 0.02 % Brij 35, 0.02 % NaN <sub>3</sub> , 1 mM PMSF
MMP-Elutionspuffer A	100 mM Tris·HCl pH 9.0, 500 mM NaCl, 100 mM CaCl <sub>2</sub> , 0.02 % Brij 35, 0.02 % NaN <sub>3</sub> , 1 mM PMSF
MMP-Waschpuffer A	50 mM Tris·HCl pH 7.5, 0.2 M NaCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 0.5 mM ZnCl <sub>2</sub> , 0.02 % Brij 35, 0.02% NaN <sub>3</sub> , 1 mM PMSF

---

ADAM-Puffer	100 mM Tris·HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 20 mM ZnCl <sub>2</sub>
Integrin Extraktionspuffer A	50 mM Tris·HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 100 mM $\beta$ -Octylthioglucoopyranosid, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM PMSF, 1 mM NEM
Integrin Extraktionspuffer B	50 mM Tris·HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 % (w/v) Triton X-100, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM PMSF, 1 mM NEM
Integrin Puffer B	25 mM Tris·HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 0.5 % Triton X-100, 1 mM NEM, 1 mM MnCl <sub>2</sub>
Integrin Elutionspuffer B	25 mM Tris·HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 0.5 % Triton X-100, 1 mM NEM
HBS-EP Puffer	0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % Surfactant P20
Kupplungspuffer	0.2 M NaHCO <sub>3</sub> pH 8.3, 0.5 M NaCl
Elektrophoresepuffer	190 mM Glycin, 25 mM Tris, 0.1 mM SDS
Fixierer-Lösung	40 % (v/v) Ethanol, 10 % Glycerin, 10 % (v/v) Essigsäure
Silberkomplex-Lösung	2 % (w/v) AgNO <sub>3</sub> , 2 % (w/v) NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
Moderator	10 % (w/v) Wolframatokieselsäure
Entwickler	3 % Formaldehyd
Beschleuniger	5 % (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Stopp-Lösung	5 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Lösung	0.2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 45 % (v/v) Methanol, 0.1 % (v/v) Essigsäure

---

3-fach Probenpuffer	200 mM Tris·HCl, pH 6.8, 25 % (w/v) Glycerin, 6 % (w/v) SDS, 0.06 % (w/v) Bromphenolblau, 5 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol
Sammelgelpuffer	0.5 M Tris·HCl, pH 6.8
Trenngelpuffer	1.5 M Tris·HCl, pH 8.8
Standard	SeeBlue Plus pre-stained standard (4 bis 250 kD) (Invitrogen)

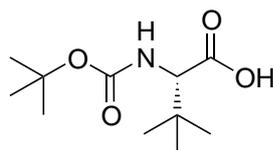
### 6.2.2 Geräte

SPR	BIAcore 3000
Sensorchip	CM5-Chip, research grade (BIAcore)
Kontrollsoftware	BIAcore Control Software 3.0
Auswertungssoftware	BIAevaluation 3.1
Haushaltsmixer	Waren Blender (Kenwood)
Homogenisator	Ultraturrox (IKA)
Chromatographie	Äkta-prime FPLC (Amersham Biosciences)
Affinitätssäule	HiTrap NHS-activated HP, 1 ml (Amersham Biosciences)
Zentrifugenkonzentrator	Centricon CENTRIPLUS YM-50 (Millipore)

## 6.3 Synthesen

### 6.3.1 Synthese von Marimastat 7 (Methode 1)

#### Boc-L-*tert*-Leucin 20



3.64 g (16.68 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat werden zu einer Lösung aus 2.00 g (15.25 mmol) L-*tert*-Leucin **19** und 0.67 g (16.80 mmol) NaOH in 40 ml Wasser/*tert*-Butanol (1:1) gegeben. Die Lösung wird über Nacht bei RT gerührt und anschließend dreimal mit jeweils 50 ml EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit wenig gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Die organischen Phasen werden verworfen. Dann werden die vereinigten wässrigen Phasen auf pH 1.5–2.0 angesäuert und viermal mit jeweils 50 ml EE extrahiert. Anschließend werden die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel entfernt wurde, wird das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.<sup>[122]</sup>

**Ausbeute:** 3.28 g (14.17 mmol, 93 %), farbloser Feststoff.

**Schmp.:** 122 °C

**Molmasse:** 231.29 g/mol

**Summenformel:** C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>O<sub>4</sub>N

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.39 (PE/EE (2:1))

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):** δ = 1.28 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.45 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 4.13 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.5 Hz, CH), 5.11 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.5 Hz, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta = 26.5$  ( $\text{CH}_3$ ), 28.3 ( $\text{CH}_3$ ), 34.4 (C), 61.6 (CH), 80.0 (C), 155.6 (C=O), 176.9 (COOH).

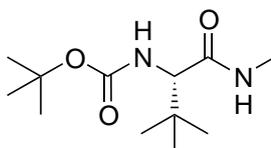
IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu} = 3372, 3347, 1758, 1724, 1660, 1538, 1367, 1332, 1274, 1255, 1228, 1160, 978$ .

MS (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 175 (6;  $\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_8$ ), 130 (10), 119 (37), 101 (18), 86 (9), 75 (13), 57 (100), 43 (6).

Drehwert:  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +5.8 \pm 0.1$  ( $c = 0.6$ ; EE).

Elementaranalyse:	C	H	N
berechnet	57.12 %	9.15 %	6.05 %
gemessen	57.23 %	8.70 %	6.03 %

### Boc-L-*tert*-Leucin-N-methylamid 21



Eine Suspension aus 1.00 g (4.32 mmol) Boc-L-*tert*-Leucin **20**, 4.41 ml (25.92 mmol) DIPEA, 1.51 g (4.70 mmol) TBTU und 0.75 g (14.1 mmol) *N*-Methylammoniumchlorid in 16 ml ACN werden über Nacht bei RT gerührt. Nachdem 50 ml EE hinzugefügt worden sind, wird die Reaktionsmischung dreimal mit 5 %  $\text{KHSO}_4$ -Lösung, dreimal mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und zweimal mit gesättigter  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen. Anschließend wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Danach wird das Solvens im Vakuum entfernt.<sup>[81]</sup> Der erhaltene Rückstand wird flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 2:1).

**Ausbeute:** 0.74 g (3.05 mmol, 71 %), farbloser Feststoff.

**Schmp.:** 129 °C

**Molmasse:** 244.32 g/mol

**Summenformel:** C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.60 (PE/EE (1:1))

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):** δ = 0.99 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.43 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2.78 (m, 3H, NCH<sub>3</sub>) 3.92 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.6 Hz, CH), 5.40 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.6 Hz, NH), 6.55 (m, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):** δ = 25.9 (CH<sub>3</sub>), 26.5 (CH<sub>3</sub>), 28.3 (CH<sub>3</sub>), 34.5 (C), 62.1 (CH), 79.5 (C), 155.9 (C=O), 171.6 (C=O).

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):**  $\tilde{\nu}$  = 3330, 3272, 3104, 2969, 2875, 1681, 1650, 1567, 1523, 1482, 1365, 1251, 1178, 1078, 1006, 912, 863, 757.

**MS (ESI):** m/z (%) = 266.9 (100, [M+Na]<sup>+</sup>, berechnet 267.2).

**Drehwert:** [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> = +13.4 ± 0.2 (c = 1; EE).

<b>Elementaranalyse:</b>	C	H	N
berechnet	58.99 %	9.90 %	11.46 %
gemessen	58.98 %	9.88 %	11.46 %

### **L-tert-Leucin-N-methylamid Trifluoracetat 22**

166 mg (0.68 mmol) Boc-L-tert-Leucin-N-methylamid **21** werden in 5 ml TFA/DCM (1:1) gelöst und 2 h lang bei RT gerührt. Dann wird das Solvens im Vakuum entfernt. Anschließend wird das Produkt lyophilisiert.

**Ausbeute:** 174 mg (0.68 mmol, 99 %), leicht gelblicher Feststoff.

**Schmp.:** 122.5 °C

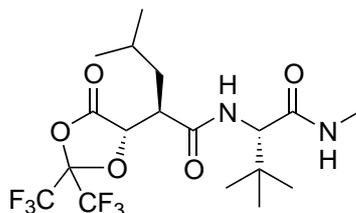
**Molmasse:** 258.24 g/mol

**Summenformel:** C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 144.9 (100,  $[M+H]^+$ , berechnet 145.1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{24} = +32.8 \pm 0.1$  ( $c = 2$ ; Ethanol).

**$N^\alpha$ -((2*R*)-4-Methyl-2-((4*S*)-5-oxo-2,2-bis-(trifluormethyl)-1,3-dioxolan-4-yl)-pentanoyl)-L-*tert*-leucin-*N*-methyramid **23****



Unter Schutzgas wird eine Lösung aus 35 mg (0.13 mmol) *L-tert*-Leucin-*N*-methyramid Trifluoracetat **22** und 36  $\mu\text{L}$  (0.26 mmol) Triethylamin in 10 ml trockenem THF über einen Zeitraum von 2 h bei  $-65^\circ\text{C}$  zu einer Lösung aus 45 mg (0.13 mmol) **17**<sup>[75]</sup> in 15 ml trockenem THF mit Hilfe einer Spritzenpumpe getropft. Nach Beendigung der Zugabe wird die Lösung auf RT erwärmt und filtriert. Anschließend wird das Solvens im Vakuum entfernt und der Rückstand wird in 50 ml eiskaltem DCM aufgenommen. Die organische Phase wird schnell dreimal mit jeweils 5 ml Eiswasser gewaschen. Dann wird die farblose Lösung über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

**Ausbeute:** 55.0 mg (0.118 mmol, 91 %), farbloser Feststoff.

**Schmp.:**  $148^\circ\text{C}$

**Molmasse:** 464.40 g/mol

**Summenformel:**  $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{F}_6\text{O}_5\text{N}_2$

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):**  $\delta = 0.88$  (d, 3H,  $^3J=6.7$  Hz,  $\text{CHCH}_3$ ), 0.89 (d, 3H,  $^3J=6.7$  Hz,  $\text{CHCH}_3$ ), 0.98 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 1.47 (m, 1H,  $\text{CHCH}_A\text{H}_B$ ),

1.64–1.74 (m, 2H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 2.76–2.83 (m, 4H, O=C(O)CHCH, NCH<sub>3</sub>), 4.34 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.4 Hz, NHCHCO), 4.73 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.6 Hz, O=C(O)CHCH), 6.30 (q, 1H, <sup>3</sup>J=4.6 Hz, NHCH<sub>3</sub>), 6.82 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.4 Hz, NH).

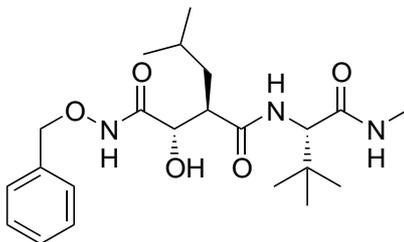
<sup>19</sup>F-NMR (470.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CFCl<sub>3</sub> extern): δ = -80.4 (q, <sup>3</sup>J=7.5 Hz, CF<sub>3</sub>), -81.0 (q, <sup>3</sup>J=7.5 Hz, CF<sub>3</sub>).

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3315, 2962, 2933, 2875, 1851, 1644, 1541, 1370, 1321, 1240, 1189, 1136, 1072, 983, 722.

MS (CI, NH<sub>3</sub>): *m/z* (%) = 465 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 406 (14), 299 (6).

MS (MALDI-FT-ICR, Dihydroxybenzoesäure): *m/z* gemessen 487.16360, monoisotopische Masse berechnet für das Kation C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>F<sub>6</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>Na<sup>+</sup> 487.16381.

*N*-(*N'*-Benzyloxy-(2*R*,3*S*)-2-hydroxy-3-isobutyl-4-succinamoyl)-(5)-*tert*-leucin-*N''*-methyamid **24**



Zu einer Lösung aus 55 mg (0.12 mmol) **23** in 2 ml DCM wird eine Lösung aus 192 mg (1.20 mmol) O-Benzyloxyhydroxylaminhydrochlorid und 180  $\mu$ L (1.20 mmol) Triethylamin in 5 ml DCM gegeben. Nach 3 h Rühren bei RT wird das Solvens im Vakuum entfernt und der Rückstand wird in 20 ml EE/Wasser (10:1) aufgenommen. Anschließend werden die Phasen getrennt und die organische Phase wird dreimal mit 5 % KHSO<sub>4</sub>-Lösung, einmal mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und zum Abschluß einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Dann wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

getrocknet und das Solvens wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird flash-chromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM/Ethanol 30:1).

**Ausbeute:** 43 mg (0.10 mmol, 85 %), farbloses Öl.

**Molmasse:** 421.65 g/mol

**Summenformel:** C<sub>22</sub>H<sub>35</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.32 (DCM/MeOH 20:1)

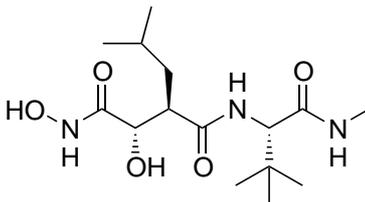
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>4</sub>-Methanol):** δ = 0.88 (d, 3H, <sup>3</sup>J=6.5 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 0.91 (d, 3H, <sup>3</sup>J=6.5 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 0.98 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.24 (m, 1H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 1.49–1.62 (m, 2H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 2.69 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>), 2.83 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J=5.0 Hz, <sup>3</sup>J=9.5 Hz, <sup>3</sup>J=9.5 Hz, HOCHCH), 4.00 (d, 1H, <sup>3</sup>J=5.8 Hz, HOCHCH), 4.22 (s, 1H, HNCHCO), 4.80–4.85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O), 7.32–7.37 (m, 3H, CH<sub>aryl</sub>), 7.41–7.44 (m, 2H, CH<sub>aryl</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, D<sub>4</sub>-Methanol):** δ = 22.4 (CH<sub>3</sub>), 23.5 (CH<sub>3</sub>), 26.0 (NCH<sub>3</sub>), 26.8 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 27.2 (CH<sub>3</sub>), 35.4 (C), 39.7 (CHCH<sub>2</sub>), 49.4 (CH), 61.9 (CH), 72.9 (HOCH), 79.0 (CH<sub>2</sub>O), 129.5 (CH), 129.7 (CH), 130.3 (CH), 136.7 (C), 171.7 (C=O), 173.1 (C=O), 175.3 (C=O).

**MS (MALDI-ToF, CHCA):** m/z (%) = 422.4 (100, [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 422.2), 444.4 (76, [M+Na]<sup>+</sup>, berechnet 444.2), 460.4 (42, [M+K]<sup>+</sup>, berechnet 460.2).

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):**  $\tilde{\nu}$  = 3312, 3033, 2957, 2871, 2086, 1643, 1535, 1369, 1256, 1237, 1213, 1146, 1083, 1016, 749, 698.

Marimastat, (*N*-((2*R*,3*S*)-3, *N'*-dihydroxy-2-isobutyl-4-succinamoyl)-(*S*)-*tert*-leucin-*N''*-methyamid) **7**



**Methode 1** Eine Suspension aus 42 mg (0.10 mmol) benzylgeschütztem Marimastat **24** und 2.0 mg Pd/C (10 %) in 50 ml Methanol wird in einer Wasserstoffatmosphäre 4 h lang bei RT hydriert. Dann wird die Lösung durch eine Schicht Kieselgel filtriert und das Solvens wird im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt kann mittels RP-HPLC gereinigt werden.<sup>[47]</sup>

**Ausbeute:** 30.5 mg (92.0  $\mu$ mol, 92 %), farbloser Feststoff.

**Methode 2** Eine Lösung aus 3.5 mg (50  $\mu$ mol) Hydroxylammoniumchlorid und 8  $\mu$ l (50  $\mu$ mol) NMM in 3 ml DMF wird bei RT zu einer Lösung aus 21 mg (45  $\mu$ mol) **23** getropft. Nach 2 h wird das Solvens im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels RP-HPLC gereinigt.

**Ausbeute:** 12 mg (36  $\mu$ mol, 80 %), farbloser Feststoff

**Molmasse:** 331.39 g/mol

**Summenformel:** C<sub>15</sub>H<sub>29</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>4</sub>-Methanol):**  $\delta$  = 0.88 (d, 3H, <sup>3</sup>*J*=6.5 Hz, CH<sub>3</sub>), 0.92 (d, 3H, <sup>3</sup>*J*=6.5 Hz, CH<sub>3</sub>), 0.98 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.26 (m, 1H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 1.54 (m, 1H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 1.64 (m, 1H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 2.71 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.84 (ddd, 1H, <sup>3</sup>*J*=5.2 Hz, <sup>3</sup>*J*=9.2 Hz, <sup>3</sup>*J*=9.2 Hz, HOCHCH), 4.02 (d, 1H, <sup>3</sup>*J*=4.7 Hz, HOCHCH), 4.20 (m, 1H, HNCHCO), 7.86 (d, 1H, <sup>3</sup>*J*=9.2 Hz, HONH).

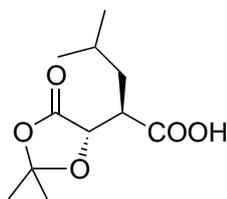
**MS (MALDI-ToF, CHCA):**  $m/z$  (%) = 332.5 (40,  $[M+H]^+$ , berechnet 332.2), 354.5 (100,  $[M+Na]^+$ , berechnet 354.2), 370.5 (38,  $[M+K]^+$ , berechnet 370.2),

**präparative HPLC:**  $t_R = 35.5$  min.

**analytische HPLC:**  $t_R = 30.9$  min.

### 6.3.2 Synthese von Marimastat 7 (Methode 2)

#### (2*R*)-2-[2,2-Dimethyl-4-oxo-1,3-(5*S*)-dioxolanyl]-4-methylpentansäure 26



2.70 g (14.17 mmol) (2*S*,3*R*)-2-Hydroxy-3-isobutylbernsteinsäure **15** werden zusammen mit 268 mg (1.42 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure in 31 ml 2,2-Dimethoxypropan gelöst und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit einer Spatelspitze Kieselgel versetzt und filtriert. Anschließend wird das Filtrat im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wird in 50 ml EE aufgenommen und dreimal mit jeweils 10 ml Wasser sowie einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Es wird über  $Na_2SO_4$  getrocknet und die organische Phase wird bis zur Trockne eingeeengt. Anschließend wird der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt. Schnelllaufende Verunreinigungen werden zunächst mit DCM/MeOH (30:1) entfernt, anschließend wird das Produkt mit DCM/MeOH (5:1) eluiert.

**Ausbeute:** 1.67 g (7.25 mmol, 51 %; Lit. 83 %), farbloses Öl.<sup>[48]</sup>

**Molmasse:** 230.26 g/mol

**Summenformel:**  $C_{11}H_{18}O_5$

DC: 0.63 (DCM/MeOH/AcOH 150:45:5)

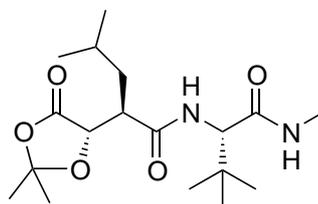
$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.96$  (d, 6H,  $^3\text{J}=5.2$  Hz,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.55 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.60 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.62–1.85 (m, 3H,  $\text{CHCH}_A\text{CH}_B$ ), 2.94–3.04 (m, 1H,  $\text{HOCHCH}$ ), 4.46 (d, 1H,  $^3\text{J}=4.8$  Hz,  $\text{HOCHCH}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 21.7$  (p,  $\text{CHCH}_3$ ), 22.1 (p,  $\text{CHCH}_3$ ), 25.7 (t,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 26.1 (p,  $\text{CCH}_3$ ), 26.7 (p,  $\text{CCH}_3$ ), 36.5 (s,  $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2$ ), 45.0 (t,  $\text{CHCHCOOH}$ ), 74.1 (t,  $\text{OC}(\text{O})\text{CHCH}$ ), 111.2 (q,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 171.8 (COOH), 177.6 (C=O).

IR (NaCl,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu} = 3300, 2959, 2872, 2625, 1794, 1716, 1488, 1387, 1267, 1220, 1117, 984, 943, 889, 737$ .

MS (ESI):  $m/z$  (%) = 253.0 (100,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , berechnet 267.2).

**(2R)-2-[2,2-Dimethyl-4-oxo-1,3-(5S)-dioxolanyl]-4-methylpentanoyl-L-tert-leucin-N-methylamid 27**



530 mg (2.30 mmol) **26** werden zusammen mit 441 mg (2.30 mmol) EDC·HCl und 310 mg (2.30 mmol) HOBt in 10 ml DCM gelöst. Dann werden 252  $\mu\text{l}$  (2.30 mmol) NMM hinzugefügt und 15 min lang bei 0 °C gerührt. Anschließend wird eine Lösung aus 593 mg (2.30 mmol) L-tert-Leucin-N-methylamid Trifluoacetat **22** und 252  $\mu\text{l}$  (2.30 mmol) NMM in 2 ml DCM hinzutropft. Nachdem 18 h lang bei RT gerührt wurde, wird das Solvens im Vakuum entfernt und in 100 ml EE/Wasser (4:1) aufgenommen. Die Phasen werden getrennt und die organische Phase wird dreimal

mit jeweils 10 ml 5 % KHSO<sub>4</sub>-Lösung, dreimal mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Danach wird die Lösung über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Der Rückstand wird flashchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 1:1).

**Ausbeute:** 467 mg (1.31 mmol, 57 %; Lit. 44 %), farbloser Feststoff.<sup>[48]</sup>

**Schmp.:** 121 °C

**Molmasse:** 356.46 g/mol

**Summenformel:** C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.27 (PE/EE (1:1))

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 0.89 (d, 3H, <sup>3</sup>J=6.9 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 0.91 (d, 3H, <sup>3</sup>J=6.9 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 1.00 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.53 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 1.57 (m, 1H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 1.62 (s, 3H, CCH<sub>3</sub>), 1.64–1.76 (m, 2H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 2.78 (d, 3H, <sup>3</sup>J=4.4 Hz, NCH<sub>3</sub>), 2.79 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J=5.7 Hz, <sup>3</sup>J=6.9 Hz, <sup>3</sup>J=6.9 Hz, OC(O)CHCHCH<sub>2</sub>), 4.37 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.4 Hz, NHCHCO), 4.46 (d, 1H, <sup>3</sup>J=6.3 Hz, OC(O)CHCH), 6.74 (m, 1H, NHCH<sub>3</sub>), 6.75 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.4 Hz, NHCHCO).

**<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 22.0 (CHCH<sub>3</sub>), 23.0 (CHCH<sub>3</sub>), 25.7 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25.8 (CCH<sub>3</sub>), 26.0 (CCH<sub>3</sub>), 26.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.8 (NHCH<sub>3</sub>), 34.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 36.9 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 47.3 (CHCHCOOH), 60.5 (NHCHCO), 74.1 (OC(O)CHCH), 110.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 170.6 (C=O), 170.9 (C=O), 171.9 (C=O).

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):**  $\tilde{\nu}$  = 3318, 2958, 2878, 1793, 1643, 1536, 1467, 1411, 1386, 1367, 1267, 1128, 985, 890, 754.

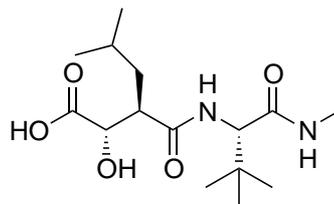
**MS (ESI):** *m/z* (%) = 379.2 (60, [M+Na]<sup>+</sup>, berechnet 379.2), 395.3 (55, [M+K]<sup>+</sup>, berechnet 395.2), 734.9 (100, [2M+Na]<sup>+</sup>, berechnet 735.4).

**MS (ESI-FT-ICR):** *m/z* gemessen 379.22022, monoisotopische Masse berechnet für das Kation C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>Na<sup>+</sup> 379.22034.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{24} = +2.9 \pm 0.2$  ( $c = 1$ ; DCM).

**analytische HPLC:**  $t_R = 36.4$  min.

***N*-((2*R*,3*S*)-3-hydroxy-2-isobutyl-succinyl)-(*S*)-*tert*-leucin-*N*'-methylamid 28**



193 mg (0.54 mmol) **27** werden in 5 ml THF gelöst. Dann werden 5 ml 2 M Salzsäure hinzugefügt und die Reaktionsmischung wird 4.5 h lang bei RT gerührt.<sup>[83,84]</sup> Es wird mit NaHCO<sub>3</sub> neutralisiert und das Solvens wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit 10 ml Wasser aufgenommen und die Lösung wird mit KHSO<sub>4</sub> auf pH 1.5 eingestellt. Anschließend wird achtmal mit jeweils 20 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Solvens wird im Vakuum entfernt.

**Ausbeute:** 129 mg (0.40 mmol, 75 %), farbloses Öl.

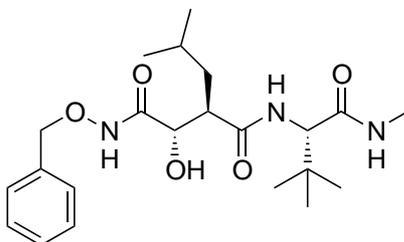
**Molmasse:** 316.39 g/mol

**Summenformel:** C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>4</sub>-Methanol):**  $\delta = 0.87$  (d, 3H,  $^3J=6.3$  Hz, CH<sub>3</sub>), 0.90 (d, 3H,  $^3J=6.3$  Hz, CH<sub>3</sub>), 0.97 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.26 (m, 1H, CHCH<sub>A</sub>CH<sub>B</sub>), 1.51 (m, 1H, CHCH<sub>A</sub>CH<sub>B</sub>), 1.63 (m, 1H, CHCH<sub>A</sub>CH<sub>B</sub>), 2.79 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.82 (ddd, 1H,  $^3J=5.8$  Hz,  $^3J=9.6$  Hz,  $^3J=9.6$  Hz, HOCHCH), 4.20 (d, 1H,  $^3J=6.3$  Hz, HOCHCH), 4.17 (s, 1H, HNCHCO).

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 297.0 (100, [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, berechnet 297.2), 315.1 (95, [M-H]<sup>-</sup>, berechnet 315.2).

*N*-(*N'*-Benzyloxy-(2*R*,3*S*)-2-hydroxy-3-isobutyl-4-succinamoyl)-(*S*)-*tert*-leucin-*N''*-methyamid **24**



Zu einer Lösung von 129 mg (0.40 mmol) **28** in 5 ml DCM wird eine Lösung aus 192 mg (1.20 mmol) O-Benzylhydroxylamin Hydrochlorid und 132  $\mu$ l (1.20 mmol) NMM gefügt. Anschließend werden 77 mg (0.40 mmol) EDC·HCl und 44  $\mu$ l NMM hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wird sie bis zur Trockne eingengt und der Rückstand wird in 20 ml EE/Wasser (10:1) aufgenommen. Die Phasen werden getrennt und die organische Phase wird dreimal mit 5 % KHSO<sub>4</sub>-Lösung, dreimal mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und abschließend einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und dann zur Trockne eingengt.<sup>[83]</sup> Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM/EtOH 30:1).\*

**Ausbeute:** 142 mg (0.19 mmol, 47 %), farbloses Öl.

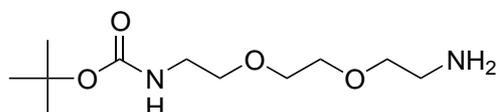
**Molmasse:** 421.65 g/mol

**Summenformel:** C<sub>22</sub>H<sub>35</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>

---

\*physikalische Daten s. oben

## 6.3.3 Synthese neuer Linkermoleküle

1-Amino-8-(*tert*-butyloxycarbonylamino)-3,6-dioxaoctan **30**

Zu einer Lösung aus 17.90 g (0.120 mmol) 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan **29** in 10 ml trockenem 1,4-Dioxan wird eine Lösung aus 2.64 g (12.1 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat in 40 ml trockenem 1,4-Dioxan bei 28 °C mit einer Spritzenpumpe innerhalb von 10 h getropft. Nach 10 h Rühren wird das Solvens entfernt und der Rückstand wird in 50 ml Wasser aufgenommen. Es wird dreimal mit jeweils 30 ml DCM extrahiert. Dann werden die vereinigten organischen Phasen dreimal mit jeweils 10 ml Wasser und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wird die Lösung über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Solvens wird im Vakuum entfernt.

**Ausbeute:** 2.85 g (11.5 mmol, 95 %, Lit. 70 %), farbloses Öl.<sup>[85,86]</sup>

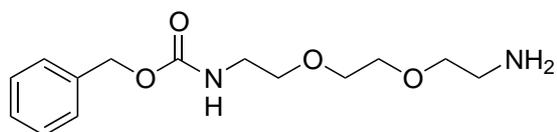
**Molmasse:** 248.32 g/mol

**Summenformel:** C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):** δ = 1.45 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.94 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.90 (t, 2H, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) 3.31 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NHCO), 3.53–3.55 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>), 3.60–3.64 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 5.23 (br. s, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):** δ = 28.4 (p, CH<sub>3</sub>), 40.4 (s, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 41.7 (s, CH<sub>2</sub>NHCO), 67.1 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 70.2 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 73.4 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO), 79.2 (q, C), 156.0 (q, C=O).

**MS (CI, NH<sub>3</sub>):** *m/z* (%) = 249 (100, [M+H]<sup>•+</sup>), 193 (45, M<sup>•+</sup>-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C=CH<sub>2</sub>), 175 (43, M<sup>•+</sup>-*t*BuOH), 149 (15, M<sup>•+</sup>-Boc), 106 (5).

**1-Amino-8-(benzyloxycarbonylamino)-3,6-dioxaoctan 32**

Zu einer Lösung von 11.86 g (80.00 mmol) 1,8-Diamino-3-6-dioxaoctan **29** in 5 ml trockenem Toluol wird unter Schutzgas eine Lösung von 1.36 g (1.20 ml, 8.00 mmol) Benzylchlorcarbonat **31** in 20 ml trockenem Toluol bei RT innerhalb von 10 h mit einer Spritzenpumpe getropft. Nach Beendigung der Zugabe werden weitere 10 h bei RT gerührt. Dann wird das Solvens im Vakuum entfernt, der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und es wird viermal mit jeweils 20 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit jeweils 20 ml Wasser und einmal mit 10 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Solvens wird im Vakuum entfernt.

**Ausbeute:** 1.39 g (4.93 mmol, 61 %, Lit. 58 %), farbloses Öl.<sup>[87]</sup>

**Molmasse:** 282.34 g/mol

**Summenformel:** C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>

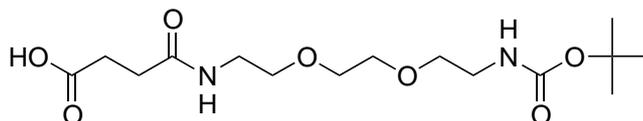
**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):**  $\delta$  = 1.49 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.37 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NHCO), 3.44–3.66 (m, 8H, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 5.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5.55 (s, 1H, CONH), 7.29–7.41 (m, 5H, CH<sub>aryl</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):**  $\delta$  = 40.9 (s, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 41.6 (s, CH<sub>2</sub>NHCO), 66.6 (s, CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 70.0 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 70.1 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.2 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO), 128.1 (t, CH), 128.3 (t, CH), 128.5 (t, CH), 136.6 (q), 156.5 (q, C=O).

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):**  $\tilde{\nu}$  = 3334, 3062, 3033, 2937, 2869, 1718, 1535, 1454, 1402, 1349, 1257, 1135, 1025, 738, 698.

MS (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 283 (1.4;  $M^+$ ), 253 (1), 240 (1.8), 196 (14), 91 (100), 44 (56).

***N*-(8-*tert*-Butyloxycarbonylamino-3,6-dioxaoct-1-yl)-bernsteinsäureamid **34****



971 mg (3.91 mmol) **30** und 565  $\mu$ l (3.91 mmol) Triethylamin sowie 390 mg (3.90 mmol) Bernsteinsäureanhydrid werden in 15 ml trockenem DCM über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 50 ml DCM verdünnt und mit 5 %  $KHSO_4$ -Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird mit 50 ml DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden mit wenig gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $Na_2SO_4$  getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM/MeOH 30:1 $\rightarrow$ 10:1).

**Ausbeute:** 1.01 g (2.90 mmol, 74 %), farbloses, harziges Öl.

**Molmasse:** 348.39 g/mol

**Summenformel:**  $C_{15}H_{28}O_7N_2$

$^1H$ -NMR (500 MHz,  $D_4$ -MeOH, TMS):  $\delta$  = 1.43 (s, 9H,  $C(CH_3)_3$ ), 2.47 (t, 2H,  $^3J=6.9$  Hz,  $CH_2CO$ ), 2.58 (t, 2H,  $^3J=6.9$  Hz,  $HOOCCH_2$ ), 3.22 (t, 2H,  $^3J=5.6$  Hz,  $CH_2NHCO$ ), 3.36 (t, 2H,  $^3J=5.5$  Hz,  $CH_2NHCO$ ), 3.49–3.64 (m, 8H,  $CH_2OCH_2CH_2OCH_2$ ).

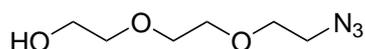
$^{13}C$ -NMR (125.7 MHz,  $D_4$ -MeOH, TMS):  $\delta$  = 28.7 (p,  $C(CH_3)_3$ ), 30.3 (s,  $CH_2CO$ ), 31.5 (s,  $HOOCCH_2$ ), 40.4 (s,  $CH_2NHCO$ ), 41.2 (s,  $CH_2NHCO$ ), 70.6 (s,  $OCH_2CH_2NH_2$ ), 71.1 (s,  $OCH_2CH_2O$ ), 71.2 (s,  $OCH_2CH_2O$ ), 71.3 (s,  $OCH_2CH_2NHCO$ ), 80.1 (q, C), 158.5 (q,  $HNCO-O^{tert}Bu$ ), 174.6 (q, COOH), 176.2 (q, C=O).

**IR (NaCl,  $\text{cm}^{-1}$ ):**  $\tilde{\nu} = 3336, 2877, 1712, 1538, 1361, 1249, 1172, 1103, 1009, 736$ .

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 371.2 (100,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , berechnet 371.2).

**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 379.22022, monoisotopische Masse berechnet für das Kation  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_5\text{N}_2\text{Na}^+$  379.22034.

### 1-Azido-8-hydroxy-3,6-dioxaoctan **36**



Eine auf 0 °C gekühlte Lösung von 42 g (280 mmol) Triethylenglykol **35**, 30 ml Triethylamin und 200 ml THF werden mit 7.74 ml (100 mmol) Methansulfonylchlorid tropfenweise versetzt. Die Reaktionsmischung wird auf RT gebracht und über Nacht gerührt. Anschließend wird das Solvens vollständig im Vakuum entfernt und der Rückstand wird in 200 ml abs. Ethanol aufgenommen. Nach der Zugabe von 13.0 g (200 mmol) Natriumazid wird die Reaktionsmischung über Nacht unter Rückfluß erhitzt. Das Solvens wird anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand in 500 ml Diethylether gelöst. Die organische Phase wird zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingeeengt.

**Ausbeute:** 16.3 g (93.2 mol, 93 %, Lit. 75 %), farbloses, hochviskoses Öl.<sup>[90,91]</sup>

**Molmasse:** 175.19 g/mol

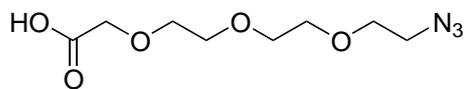
**Summenformel:**  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}_3$

**$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):**  $\delta = 2.41$  (br. s, 1H, OH), 3.40 (t, 2H,  $^3J=5.1$  Hz), 3.59–3.79 (m, 10H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):**  $\delta = 50.7$  (s), 61.7 (s), 70.1 (s), 70.4 (s), 70.7 (s), 72.5 (s).

**IR (NaCl,  $\text{cm}^{-1}$ ):**  $\tilde{\nu} = 3434, 2923, 2871, 2107, 1452, 1348, 1286, 1122, 1068, 933$ .

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 198.0 (100,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , berechnet 198.1).

**11-Azido-3,6,9-trioxaundecansäure 38**

Zu einer Suspension aus 15.56 g (88.86 mmol) 1-Azido-8-hydroxy-3,6-dioxaoctan **36** und 26.30 g (470.0 mmol) KOH in 160 ml DMF wird eine Lösung aus 12.51 g (90.0 mmol) Bromessigsäure in 30 ml DMF getropft. Nach Beendigung der Zugabe wird die Reaktionsmischung 12 h lang auf 45 °C erhitzt. Es werden nochmals 5.80 g (103.4 mmol) KOH und 13.02 g (93.9 mmol) Bromessigsäure hinzugefügt und weitere 12 h lang bei 45 °C gerührt. Dann werden 50 ml Wasser hinzugefügt und abermals 12 h bei 45 °C gerührt. Das Solvens wird anschließend im Hochvakuum entfernt und der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und mit Salzsäure neutralisiert. Es wird viermal mit jeweils 50 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeengt. Das Rohprodukt wird mit DCM/MeOH (49:1) säulenchromatographisch an Kieselgel eluiert.

**Ausbeute:** 13.47 g (57.76 mmol, 65 %, Lit. 76 %), farbloser, harziger Feststoff.<sup>[90,91]</sup>

**Molmasse:** 233.22 g/mol

**Summenformel:** C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.28 (DCM/MeOH)

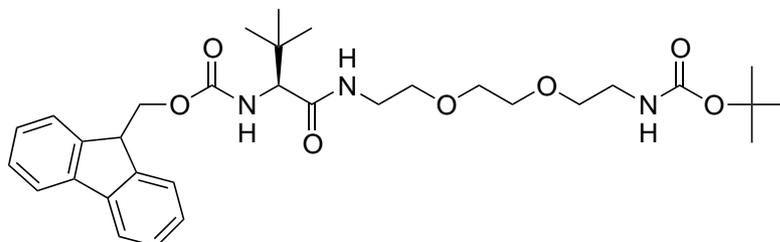
**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):** δ = 3.33 (t, 2H, <sup>3</sup>J=4.9 Hz), 3.52–3.71 (m, 12H).

**<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):** δ = 50.6 (s), 60.3 (s, CH<sub>2</sub>COOH), 61.7 (s), 69.9 (s), 70.4 (s), 70.6 (s), 72.5 (s), 171.0 (q, COOH).

**MS (ESI):** m/z (%) = 232.0 (100, [M-H]<sup>-</sup>, berechnet 232.1).

## 6.3.4 Synthese des Marimastat-Derivats 18 in Lösung (Methode 1)

*N'*-(8-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl)-(N-(9*H*-fluoren-9-yl-methyloxycarbonyl))-*tert*-L-leucinamid **40**



191 mg (1.00 mmol) EDC·HCl und 101 mg (110  $\mu$ l, 1.00 mmol) NMM werden in 10 ml Dichlormethan bei 0 °C gelöst. 153 mg (1.00 mmol) HOBt-Hydrat sowie 353 mg (1.00 mmol) Fmoc-L-*tert*-Leucin **39** werden hinzugefügt. Die Mischung wird 15 min gerührt und dann mit einer Lösung von 250 mg (1.00 mmol) **30** in 1 ml Dichlormethan tropfenweise versetzt. Nach 1 h Rühren bei 0 °C und weiteren 2 h bei RT wird das Lösungsmittel bis zur Trockne entfernt und der Rückstand mit 50 ml Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wird dreimal mit 15 ml 5 % KHSO<sub>4</sub>-Lösung, dreimal mit 10 ml Wasser und zum Abschluß zweimal mit 20 ml Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird an Kieselgel mit Petrolether (60–80 °C)/Ethylacetat (1:1) säulenchromatographisch gereinigt.

**Ausbeute:** 435 mg (0.74 mmol, 74 %), farbloser, schaumiger Feststoff.

**Schmp.:** 80 °C

**Molmasse:** 583.74 g/mol

**Summenformel:** C<sub>32</sub>H<sub>46</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):**  $\delta$  = 1.01 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.44 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 3.28–3.32 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 3.49–3.60 (m, 10H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-

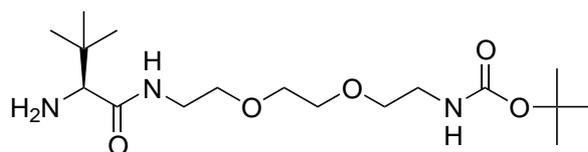
CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 3.94 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.2 Hz, OCCHNH), 4.15–4.45 (m, 3H, OCOCH<sub>2</sub>CH), 5.30 (br. s, 1H, HNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) 5.68 (m, 1H, OCCHNH), 6.55 (br. s, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 7.25–7.42 (m, 4H, CH<sub>aryl</sub>), 7.59 (m, 2H, CH<sub>aryl</sub>), 7.75 (m, 2H, CH<sub>aryl</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ = 26.6 (p, CH<sub>3</sub>), 28.4 (p, CH<sub>3</sub>), 34.8 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>CCH), 39.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 40.7 (s, Boc-NHCH<sub>2</sub>), 47.3 (t, OCOCH<sub>2</sub>CH), 62.9 (t, OCCHNH), 67.1 (s, OCOCH<sub>2</sub>CH), 69.8 (s, Boc-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.2 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.4 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 79.5 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>COCO), 119.9 (t, CH<sub>aryl</sub>), 125.1 (t, CH<sub>aryl</sub>), 127.1 (t, CH<sub>aryl</sub>), 127.7 (t, CH<sub>aryl</sub>), 141.3 (q, C<sub>aryl</sub>), 143.9 (q, CH<sub>aryl</sub>), 156.2 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>COCONH), 156.4 (q, NHCOOCH<sub>2</sub>CH), 170.6 (q, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH).

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3333, 3066, 2964, 1715, 1654, 1531, 1453, 1398, 1366, 1260, 1165, 1104, 1014, 865, 799, 758, 740.

MS (ESI): *m/z* (%) = 606.4 (100, [M+Na]<sup>+</sup>, berechnet 606.3), 622.4 (60, [M+K]<sup>+</sup>, berechnet 622.3)

#### *N'*-(8-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl)-*tert*-L-leucinamid **41**



453 mg (0.77 mmol) **40** werden in 20 ml THF gelöst. Dann werden 1.15 g (2.31 mmol) *N*-(2-Mercaptoethyl)aminoethyl-polystyrolharz (2.00 mmol/g) und 59  $\mu$ l (0.39 mmol) DBU hinzugefügt. Nach 20 h Rühren bei RT wird das Harz abfiltriert und dreimal mit 5 ml THF gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden eingengt und durch Kieselgel filtriert (DCM/MeOH 20:1). Das Harz kann durch mehrmaliges Waschen mit 20 % Piperidin in DMF und abschließendes

Waschen mit MeOH regeneriert werden. Dabei wird solange gewaschen, bis das Filtrat keine Absorption bei 290 nm mehr zeigt.

**Ausbeute:** 253 mg (0.69 mmol, 91 %), farbloses Öl.

**Molmasse:** 361.48 g/mol

**Summenformel:** C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>O<sub>5</sub>N<sub>3</sub>

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, D<sub>4</sub>-MeOH, TMS):**  $\delta$  = 0.96 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.43 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2.99 (s, 1H, OCCHNH), 3.21 (t, 2H, <sup>3</sup>J=5.7 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 3.26–3.63 (m, 10H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, D<sub>4</sub>-MeOH, TMS):**  $\delta$  = 26.9 (p, CH<sub>3</sub>), 28.8 (p, CH<sub>3</sub>), 35.0 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>CCH), 40.0 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 41.2 (s, Boc-NHCH<sub>2</sub>), 64.9 (t, OCCHNH), 70.6 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 71.1 (s, Boc-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 71.2 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 71.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 79.6 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>COCO), 158.3 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>COCONH), 175.9 (q, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH).

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):**  $\tilde{\nu}$  = 3331, 2955, 2870, 2488, 1694, 1650, 1529, 1425, 1366, 1280, 1249, 1162, 1040, 980, 864, 815.

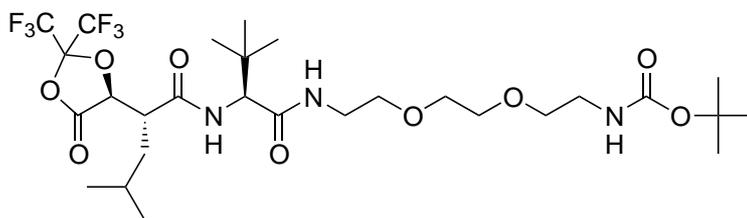
**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 362.1 (85, [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 362.3), 722.6 (100, [2M+H]<sup>+</sup>, berechnet 723.5) )

### Kupplung mit dem HFA-geschützten Säurechlorid 17

***N*-[(8-*tert*-Butyloxycarbonylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl]-2-[(2*R*)-4-methyl-2-(4*S*)-5-oxo-2,2-bis(trifluormethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]pentanoyl-(2*S*)-*tert*-leucinamid 42**

Eine Lösung von 119 mg (0.33 mmol) **41** und 46  $\mu$ l (0.33 mmol) Triethylamin in 20 ml trockenem THF wird zu einer auf -75 °C gekühlten Lösung von 142 mg

(0.40 mmol) **17** in 20 ml trockenem THF wird unter Schutzgas innerhalb von 4 h getropft. Anschließend wird auf 0 °C erwärmt. Die Lösung wird filtriert und im Vakuum eingedunstet. Dann wird der Rückstand in 20 ml DCM aufgenommen und einmal mit wenig Eiswasser und einmal mit wenig gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die Lösung wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Solvens wird anschließend im Vakuum entfernt. Das Produkt weist eine hohe thermische Instabilität auf und wird daher sofort weiter eingesetzt.



**Ausbeute:** 218 mg (0.32 mmol, 98 %), farbloses Öl.

**Molmasse:** 681.31 g/mol

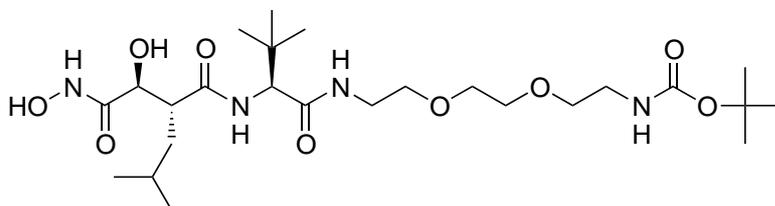
**Summenformel:** C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>F<sub>6</sub>O<sub>9</sub>N<sub>3</sub>

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):** δ = 0.91 (d, 6H, <sup>3</sup>J=6.4 Hz, HC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.98 (s, 9H, CC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.45 (s, 9H, OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.51–1.70 (m, 3H, CHCH<sub>A</sub>-H<sub>B</sub>), 3.22–3.40 (m, 3H, OC(O)CHCH, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 3.41–3.60 (m, 10H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 4.29 (s, 1H, OCCHNH), 4.77 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.9 Hz, OC(O)CHCH), 5.10 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 6.58 (m, 1H, Boc-NH), 6.87 (m, 1H, OCCHNH).

**<sup>19</sup>F-NMR (470.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CFCl<sub>3</sub> extern):** δ = -80.9 (q, <sup>3</sup>J=7.5 Hz), -81.5 (q, <sup>3</sup>J=7.5 Hz).

**MS (MALDI-ToF, CHCA):** m/z (%) = 581.9 (85, [M+H-Boc]<sup>+</sup>, berechnet 582.2), 703.8 (48, [M+Na]<sup>+</sup>, berechnet 704.3), 719.8 (32, [M+K]<sup>+</sup>, berechnet 720.3).

## Ringöffnung mit Hydroxylammoniumchlorid



Eine Lösung von 94 mg (0.14 mmol) **42** wird zu einer Lösung von 70 mg (1.0 mmol) Hydroxylammoniumchlorid und 110  $\mu$ l NMM in 5 ml DMF getropft und 2 h lang bei RT gerührt. Das Solvens wird entfernt und der Rückstand mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

**Ausbeute:** 33 mg (0.06 mmol, 43 %), farbloses Öl.

**Molmasse:** 548.67 g/mol

**Summenformel:** C<sub>25</sub>H<sub>48</sub>O<sub>9</sub>N<sub>4</sub>

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>4</sub>-MeOH):**  $\delta$  = 0.89 (d, 3H, <sup>3</sup>J=6.6 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 0.92 (d, 3H, <sup>3</sup>J=6.6 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 0.99 (s, 9H, CC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.27 (m, 1H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 1.43 (s, 9H, OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.54 (m, 1H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 1.62 (m, 1H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 2.85 (dt, 1H, <sup>3</sup>J=5.6 Hz, <sup>3</sup>J=10.2 Hz, HOCHCH), 3.21 (t, 2H, <sup>3</sup>J=5.6 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 3.27–3.61 (m, 10H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 4.04 (d, 1H, <sup>3</sup>J=6.0 Hz, HOCHCH), 4.26 (s, 1H, OCCHNH).

**<sup>13</sup>C-NMR (125.8 MHz, D<sub>4</sub>-MeOH):**  $\delta$  = 22.4 (p, CHCH<sub>3</sub>), 23.6 (p, CHCH<sub>3</sub>), 26.8 (t, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 27.2 (p, CC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.8 (p, OCO(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 35.5 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>C-CH), 39.6 (s, CHCH<sub>2</sub>), 40.2 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 41.2 (s, Boc-NHCH<sub>2</sub>), 48.8 (t, HOCHCH), 61.9 (t, OCCHNH), 70.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.4 (s, Boc-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 71.0 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 71.5 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 73.0 (t, HOCHCH), 80.8 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>COCO), 158.4 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>COCONH), 171.5 (q, HOCHCHCO), 172.6 (q, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 175.4 (q, HONCO).

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 449.3 (85,  $[M+H-Boc]^+$ , berechnet 449.3), 549.2 (20,  $[M+H]^+$ , berechnet 549.3), 571.3 (100,  $[M+Na]^+$ , berechnet 571.3), 996.8 (21,  $[2M+H-Boc]^+$ , berechnet 996.7).

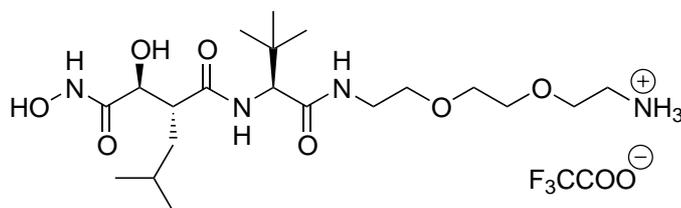
**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 549.34947, monoisotopische Masse berechnet für das Kation  $C_{25}H_{49}O_9N_4^+$  549.34941.

**präparative HPLC:**  $t_R = 35.5$  min.

**analytische HPLC:**  $t_R = 31.6$  min.

### Entfernen der Boc-Schutzgruppe

*N*-(8-Amino-3,6-dioxaoct-1-yl)-(2*R*,3*S*)-*N*-(hydroxy)-3-hydroxy-2-(2-methylpropyl)succinamoyl-(2*S*)-*tert*-leucinamid Trifluoracetat **18**



40 mg (73  $\mu\text{mol}$ ) **43** werden in 15 ml DCM/TFA (2:1) gelöst und 3 h lang bei RT gerührt. Anschließend wird das Solvens im Vakuum entfernt und mittels präparativer RP-HPLC gereinigt. Das Produkt wird als Trifluoracetat erhalten.

**Ausbeute:** 32 mg (57  $\mu\text{mol}$ , 78 %), farbloser, amorpher Feststoff.

**Molmasse:** 562.58 g/mol

**Summenformel:**  $C_{22}H_{41}F_3O_9N_4$

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_4\text{-MeOH}$ , TMS):**  $\delta = 0.91$  (d, 3H,  $^3J=6.6$  Hz,  $\text{CHCH}_3$ ), 0.79 (d, 3H,  $^3J=6.6$  Hz,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.00 (s, 9H,  $\text{CC}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.33 (m, 1H,  $\text{CHCH}_A\text{H}_B$ ),

1.56 (m, 1H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 1.64 (m, 1H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 2.86 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J=5.0 Hz, <sup>3</sup>J=9.9 Hz, HOCHCH), 3.08–3.16 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 3.36–3.42 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 3.50–3.76 (m, 8H, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 4.10 (d, 1H, <sup>3</sup>J=5.3 Hz, HOCHCH), 4.23 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.1 Hz, OCCHNH), 7.86 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.1 Hz, OCCHNH) 8.14 (t, 1H, <sup>3</sup>J=5.3 Hz, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O).

<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, D<sub>4</sub>-MeOH, TMS): δ = 22.4 (p, CHCH<sub>3</sub>), 23.5 (p, CHCH<sub>3</sub>), 26.9 (t, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 27.2 (p, CC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 35.2 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>CCH), 39.9 (s, CHCH<sub>2</sub>), 40.1 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 40.7 (s, H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>), 49.4 (t, HOCHCH), 62.0 (t, OCCHNH), 67.9 (s, H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 71.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 71.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 72.7 (t, HOCHCH), 171.6 (q, HOCHCHCO), 172.8 (q, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 175.5 (q, HONHCO).

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3297, 3089, 2961, 2878, 1780, 1673, 1536, 1471, 1430, 1370, 1203, 1138, 1096, 981, 836, 800, 722.

MS (MALDI-ToF, CHCA):  $m/z$  (%) = 449.5 (95, [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 449.3), 471.5 (100, [M+Na]<sup>+</sup>, berechnet 471.3), 577.2 (30, [M+K]<sup>+</sup>, berechnet 577.3).

MS (ESI-FT-ICR):  $m/z$  gemessen 449.29707, monoisotopische Masse berechnet für das Kation C<sub>20</sub>H<sub>41</sub>O<sub>7</sub>N<sub>4</sub><sup>+</sup> 449.29698.

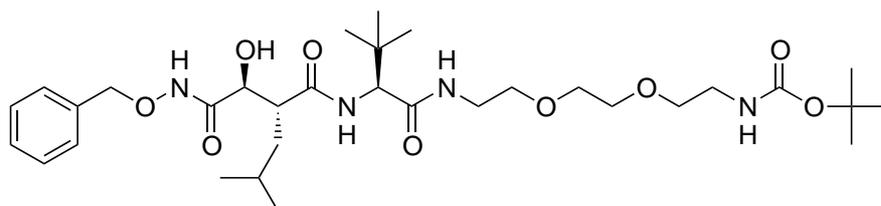
Drehwert:  $[\alpha]_D^{25} = -5.35 \pm 0.29$  ( $c = 1.7$ ; MeOH).

analytische HPLC:  $t_R = 22.8$  min.

präparative HPLC:  $t_R = 25.6$  min.

## Ringöffnung mit O-Benzylhydroxylamin

*N*-(8-*tert*-Butyloxycarbonylamino-3,6-dioxaoct-1-yl)-(2*R*,3*S*)-*N*-(benzyloxy)-3-hydroxy-2-(2-methylpropyl)-succinamoyl-(2*S*)-*tert*-leucinamid 44



319 mg (2.00 mmol) O-Benzylhydroxylammoniumchlorid werden zusammen mit 277  $\mu$ l (2.00 mmol) Triethylamin in 20 DMF gelöst. Dann wird eine Lösung von 218 mg (0.32 mmol) **42** in 5 ml DMF hinzuge tropft und über Nacht bei RT gerührt. Das Solvens wird entfernt und der erhaltene Rückstand wird in 50 ml EE aufgenommen. Die organische Phase wird dreimal mit 5 % KHSO<sub>4</sub>-Lösung, dreimal mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und zum Schluß einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Dann wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM/MeOH 30:1).

**Ausbeute:** 134 mg (0.21 mmol, 64 %), farbloses Öl.

**Molmasse:** 638.79 g/mol

**Summenformel:** C<sub>32</sub>H<sub>54</sub>O<sub>9</sub>N<sub>4</sub>

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.43 (DCM/MeOH 20:1)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):**  $\delta$  = 0.89 (d, 3H, <sup>3</sup>J=6.3 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 0.93 (d, 3H, <sup>3</sup>J=6.3 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 0.99 (s, 9H, CC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.44 (s, 9H, OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.48–1.70 (m, 3H, CHCH<sub>A</sub>CH<sub>B</sub>), 3.04 (m, 1H, HOCHCH), 3.20–3.66 (m, 12H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.15 (m, 1H, OCCHNH), 4.20 (d, 1H, <sup>3</sup>J=8.8 Hz,

HOCHCH), 4.84 (d, 1H,  $^3J=11.0$  Hz, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 4.91 (d, 1H,  $^3J=11.0$  Hz, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 5.10 (m, 1H, NH), 6.53 (m, 1H, NH), 6.79 (d, 1H,  $^3J=9.1$  Hz, NH), 7.33–7.41 (m, 5H, CH<sub>aryl</sub>), 9.58 (s, 1H, Bn-ONHCO).

<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):  $\delta$  = 22.5 (p, CHCH<sub>3</sub>), 22.6 (p, CHCH<sub>3</sub>), 25.6 (t, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26.7 (p, CC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.5 (p, OCO(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 34.6 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>C-CH), 38.4 (s, CHCH<sub>2</sub>), 39.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 40.4 (s, Boc-NHCH<sub>2</sub>), 45.3 (t, HOCHCH), 60.6 (t, OCCHNH), 69.7 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.1 (s, Boc-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.2 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 72.9 (t, HOCHCH), 78.4 (s, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>), 79.5 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>COCO), 128.6 (t, CH<sub>aryl</sub>), 128.8 (t, CH<sub>aryl</sub>), 129.1 (t, CH<sub>aryl</sub>), 135.1 (q, C<sub>aryl</sub>), 156.2 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>COCOONH), 169.8 (q, HOCHCHCO), 169.9 (q, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 174.3 (q, Bn-ONHCO).

IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3313, 2957, 2872, 1690, 1650, 1538, 1452, 1392, 1367, 1272, 1252, 1096, 1020, 970, 910, 863, 806, 752

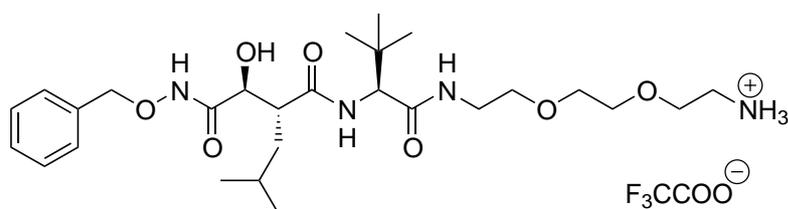
MS (ESI):  $m/z$  (%) = 539.4 (32, [M+H-Boc]<sup>+</sup>, berechnet 539.3), 639.2 (100, [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 639.4), 661.4 (20, [M+Na]<sup>+</sup>, berechnet 661.4).

MS (ESI-FT-ICR):  $m/z$  gemessen 639.39489, monoisotopische Masse berechnet für das Kation C<sub>32</sub>H<sub>55</sub>O<sub>9</sub>N<sub>4</sub><sup>+</sup> 639.39636.

Drehwert:  $[\alpha]_D^{25} = -0.20 \pm 0.05$  ( $c = 1$ ; DCM).

### Entfernen der Boc-Schutzgruppe

*N*-(8-Amino-3,6-dioxaoct-1-yl)-(2*R*,3*S*)-*N*-(benzyloxy)-3-hydroxy-2-(2-methylpropyl)-succinamoyl-(2*S*)-*tert*-leucinamid trifluoracetat 45



112 mg (0.17 mmol) **44** werden in 10 ml DCM/TFA (2:1) gelöst und 2 h lang bei RT gerührt. Dann wird das Solvens im Vakuum entfernt und der Rückstand wird lyophilisiert.

**Ausbeute:** 110 mg (0.17 mmol, 99 %), farbloser, amorpher Feststoff.

**Molmasse:** 652.70 g/mol

**Summenformel:** C<sub>29</sub>H<sub>47</sub>F<sub>3</sub>O<sub>9</sub>N<sub>4</sub>

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>4</sub>-MeOH, TMS):**  $\delta$  = 0.94 (d, 3H, <sup>3</sup>J=6.1 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 0.96 (d, 3H, <sup>3</sup>J=6.5 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 1.00 (s, 9H, CC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.42 (m, 1H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 1.52–1.68 (m, 2H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 2.84 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J=5.3 Hz, <sup>3</sup>J=9.7 Hz, HOCHCH), 3.09 (t, 2H, <sup>3</sup>J=5.3 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 3.40–3.85 (m, 10H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 4.06 (d, 1H, <sup>3</sup>J=5.3 Hz, HOCHCH), 4.22 (m, 1H, OCCHNH), 4.85 (s, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>), 7.19 (m, 1H, NH), 7.33–7.39 (m, 3H, CH<sub>aryl</sub>), 7.42–7.47 (m, 2H, CH<sub>aryl</sub>), 7.83 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.1 Hz, NH), 7.89 (br. s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.13 (s, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):**  $\delta$  = 22.1 (p, CHCH<sub>3</sub>) 22.9 (p, CHCH<sub>3</sub>), 25.7 (t, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26.7 (p, CC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 33.8 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>CCH), 38.3 (s, CHCH<sub>2</sub>), 39.2 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 39.7 (s, H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>), 48.0 (t, HOCHCH), 61.4 (t, OCCHNH), 66.5 (s, H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 69.4 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 69.8 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 69.9 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 71.6 (t, HOCHCH), 78.3 (s, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>), 128.5 (t), 128.8 (t), 129.2 (t), 134.9 (q), 170.1 (q, HOCHCHCO), 171.3 (q, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO-CHNH), 174.4 (q, Bn-ONHCO).

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):**  $\tilde{\nu}$  = 3434, 2955, 2923, 1653, 1558, 1204, 1179, 1135, 1086, 835.

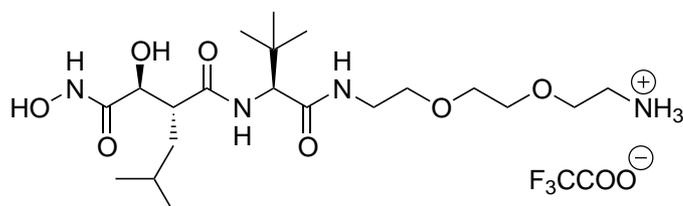
**MS (MALDI-ToF, CHCA):**  $m/z$  (%) = 539.2 (100, [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 539.3), 561.2 (81, [M+Na]<sup>+</sup>, berechnet 561.3), 577.2 (49, [M+K]<sup>+</sup>, berechnet 577.4).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{25} = -28.2 \pm 1.4$  ( $c = 0.25$ ; MeOH).

**analytische HPLC:**  $t_R$  (%) = 31.5 min (89).

## Hydrierung der benzylgeschützten Hydroxamsäure

*N*-(8-Amino-3,6-dioxaoct-1-yl)-(2*R*,3*S*)-*N*-(hydroxy)-3-hydroxy-2-(2-methylpropyl)succinamoyl-(2*S*)-*tert*-leucinamid Trifluoracetat **18**



70 mg (107  $\mu$ mmol) **45** werden in 15 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 2 mg Pd/C (10 %) 2 h lang in einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre bei RT hydriert. Es wird durch Kieselgel filtriert und mit MeOH nachgewaschen. Dann wird das Solvens im Vakuum entfernt. Das Produkt wird als Trifluoracetat erhalten.

**Ausbeute:** 49 mg (87  $\mu$ mol, 81 %), farbloser, amorpher Feststoff.

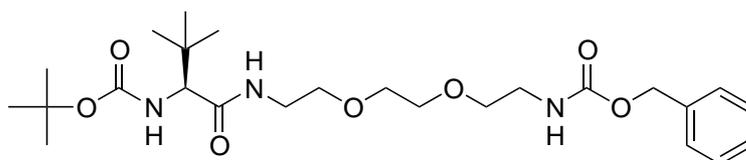
**Molmasse:** 562.58 g/mol

**Summenformel:** C<sub>22</sub>H<sub>41</sub>F<sub>3</sub>O<sub>9</sub>N<sub>4</sub>

*physikalische Daten auf Seite 132*

## 6.3.5 Synthese des Marimastat-Derivats 18 in Lösung (Methode 2)

*N'*-(8-(Benzyloxycarbonylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl)-(N-(*tert*-butyloxycarbonyl))-*tert*-L-leucinamid **46**



498 mg (2.15 mmol) Boc-*tert*-Leu-OH **20** werden zusammen mit 415 mg (2.15 mmol) EDC·HCl, 290 mg (2.15 mmol) HOBt und 240  $\mu$ l (2.15 mmol) NMM unter Eiskühlung in 12 ml trockenem DCM gelöst und 15 min lang gerührt. Dann wird eine Lösung von 606 mg (2.15) mono-*Z*-geschützten Linker **32** in 2 ml trockenem DCM hinzugefügt. Nach 20 h Rühren bei RT unter Schutzgas wird das Solvens entfernt. Das Rückstand wird in 100 ml EE/Wasser (5:1) aufgenommen und die Phasen werden getrennt. Die organische Phase wird zweimal mit 5 % KHSO<sub>4</sub>-Lösung, zweimal mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und zum Schluß einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die Lösung wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und anschließend bis zur Trockne eingengt. Rohprodukt wird flashchromatographisch an Kieselgel mit PE/EE (1:2) eluiert.

**Ausbeute:** 799 mg (1.61 mmol, 75 %), farbloses Öl.

**Molmasse:** 495.61 g/mol

**Summenformel:** C<sub>25</sub>H<sub>41</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):**  $\delta$  = 0.97 (s, 9H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.42 (s, 9H, O(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.29–3.44 (m, 2H, *Z*-NH-CH<sub>2</sub>), 3.49–3.67 (m, 10H, OCHCHNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 3.98 (d, 1H, <sup>3</sup>*J*=9.4 Hz, HNCHCO), 5.10 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5.32 (m, 1H, OCNHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 5.55 (d, 1H, <sup>3</sup>*J*=6.2 Hz, Boc-NH), 6.29 (m, 1H, *Z*-NH), 7.28–7.41 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):**  $\delta$  = 26.5 (p, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.3 (p, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 34.6 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>CCH), 39.0 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 40.8 (s, *Z*-NHCH<sub>2</sub>), 62.3 (t, OCCHNH), 66.6 (s, OCH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 69.6 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.1 (s, *Z*-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.2 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 79.6 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>COCO), 128.1 (t, CH<sub>aryl</sub>), 128.2 (t, CH<sub>aryl</sub>), 128.5 (t, CH<sub>aryl</sub>), 136.6 (q, C<sub>aryl</sub>), 155.8 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>COCONH), 156.6 (q, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>OCO), 170.8 (q, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH).

**IR (NaCl,  $\text{cm}^{-1}$ ):**  $\tilde{\nu} = 3326, 3066, 3033, 2967, 2871, 2246, 1712, 1658, 1517, 1455, 1392, 1367, 1322, 1249, 1170, 1054, 1010, 912, 732, 698.$

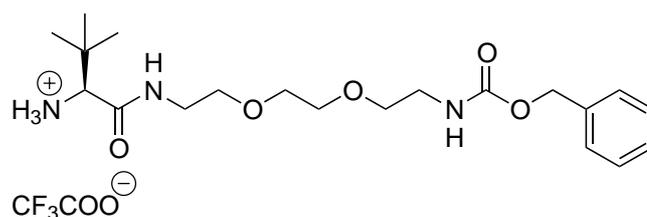
**MS (MALDI-ToF, CHCA):**  $m/z$  (%) = 396.3 (100,  $[\text{M-Boc}+\text{H}]^+$ ), 496.3 (28,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , berechnet 496.3), 518.3 (85,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , berechnet 518.3), 534.3 (50,  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , berechnet 534.3).

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -3.69 \pm 0.03$  ( $c = 1.24$ ; DCM).

Elementaranalyse:	C	H	N
berechnet	60.58 %	8.334 %	8.48 %
gemessen	60.58 %	8.42 %	8.05 %

***N'*-(8-(Benzyloxycarbonylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl)-*tert*-L-leucinamid**

**Trifluoracetat 47**



294 mg (0.59 mmol) **46** werden in 10 ml TFA/DCM (1:1) gelöst und 2 h lang bei RT gerührt. Anschließend wird das Solvens im Vakuum entfernt und der Rückstand wird lyophilisiert.

**Ausbeute:** 296 mg (0.59 mmol, 99 %), farbloser, amorpher Feststoff.

**Molmasse:** 509.52 g/mol

**Summenformel:**  $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{F}_3\text{O}_7\text{N}_3$

**Schmp.:** 89 °C

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_6\text{-DMSO}$ ):**  $\delta = 0.97$  (s, 9H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_3$ ), 3.07–3.20 (m, 2H, Z-NH- $\text{CH}_2$ ), 3.28–3.54 (m, 10H,  $\text{OCHCHNCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2$ ), 3.54 (s,

$^1\text{H}$ ,  $\text{HNCHCO}$ ), 5.00 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$ ), 7.22 (m, 1H,  $\text{OCNH}$ ), 7.27–7.39 (m, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 8.06 (br. s, 3H,  $\text{NH}_3^+$ ), 8.44 (m, 1H,  $\text{Z-NH}$ ).

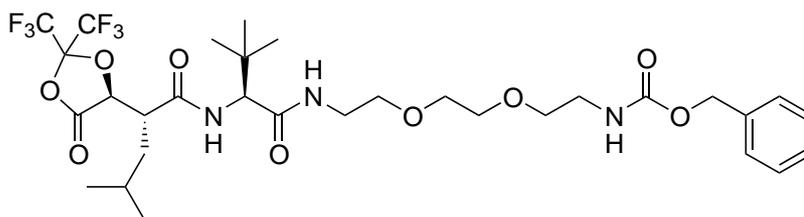
$^{13}\text{C}$ -NMR (125.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta$  = 26.2 (p,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 32.7 (q,  $(\text{H}_3\text{C})_3\text{CCH}$ ), 38.6 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCHNH}_3^+$ ), 39.0 (s,  $\text{Z-NHCH}_2$ ), 60.5 (t,  $\text{OCCHNH}_3^+$ ), 65.1 (s,  $\text{OCH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$ ), 69.1 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 69.3 (s,  $\text{Z-NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 69.4 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 69.5 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCHNH}_3^+$ ), 127.7 (t,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 127.8 (t,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 128.3 (t,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 137.2 (q,  $\text{C}_{\text{aryl}}$ ), 155.2 (q,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OCO}$ ), 167.2 (q,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCHNH}$ ).

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  = 3318, 3089, 3035, 2960, 2879, 1634, 2069, 1677, 1533, 1475, 1455, 1428, 1407, 1376, 1351, 1267, 1203, 1135, 1045, 1025, 835, 800.

MS (ESI):  $m/z$  (%) = 396.2 (55,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , berechnet 396.3), 418.2 (100,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , berechnet 418.3), 434.2 (15,  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , berechnet 434.4).

Drehwert:  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = 0.085 \pm 0.005$  ( $c = 1.35$ ; 1,4-Dioxan).

***N'*-(8-Benzyloxycarbonylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl-2-[(2*R*)-4-methyl-2-(4*S*)-5-oxo-2,2-bis(trifluormethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]pentanoyl-(2*S*)-*tert*-leucinamid 48**



Zu einer auf  $-75\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlten Lösung von 87 mg (0.24 mmol) **17** in 5 ml trockenem THF wird unter Schutzgas innerhalb von 4 h eine Lösung von 113 mg (0.22 mmol) **47** und 49  $\mu\text{l}$  (0.44 mmol) Triethylamin in 5 ml trockenem THF getropft. Nach Beendigung der Zugabe wird die Lösung auf  $0\text{ }^\circ\text{C}$  erwärmt, anschließend filtriert und

im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in 20 ml DCM aufgenommen und einmal mit wenig Eiswasser und einmal mit wenig gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Danach wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Das Produkt weist eine hohe Instabilität auf, daher wird es sofort weiter eingesetzt.

**Ausbeute:** 157 mg (0.22 mmol, 100 %), farbloses Öl.

**Molmasse:** 715.68 g/mol

**Summenformel:** C<sub>31</sub>H<sub>43</sub>F<sub>6</sub>O<sub>9</sub>N<sub>3</sub>

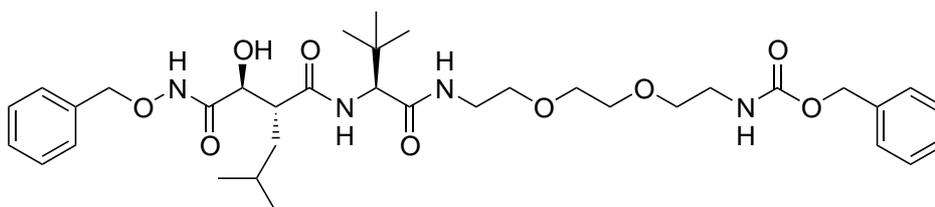
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):**  $\delta$  = 0.85 (d, 6H, <sup>3</sup>J=6.6 Hz, HC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.93 (s, 9H, CC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.40–1.73 (m, 3H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 2.68 (m, 1H, OCHCH), 3.26–3.64 (m, 12H, HNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 4.26 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.4 Hz, OCCHNH), 4.71 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.7 Hz, OCHCH), 5.27 (s, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>) 5.41 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 6.37 (m, 1H, Z-NH), 6.88 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.4 Hz, OCCHNH), 7.25–7.38 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**<sup>19</sup>F-NMR (470.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>, CFCl<sub>3</sub> extern):**  $\delta$  = -80.5 (q, <sup>3</sup>J=7.6 Hz), -81.0 (q, <sup>3</sup>J=7.6 Hz).

**MS (MALDI-ToF, CHCA):**  $m/z$  (%) = 739.2 (100, [M+Na]<sup>+</sup>, berechnet 738.3), 755.1 (48, [M+K]<sup>+</sup>, berechnet 754.3).

### Ringöffnung mit Benzylhydroxylamin

***N*-(8-Benzylloxycarbonylamino-3,6-dioxaoct-1-yl)-(2*R*,3*S*)-*N*-(benzyloxy)-3-hydroxy-2-(2-methylpropyl)-succinamoyl-(2*S*)-*tert*-leucinamid 49**



191 mg (1.20 mmol) Benzylhydroxylammoniumchlorid werden zusammen mit 166  $\mu$ l (1.20 mmol) Triethylamin in 20 ml DMF gelöst. Eine Lösung von 157 mg (0.22 mmol) **48** in 5 ml DMF wird hinzuge tropft und über Nacht bei RT gerührt. Dann wird das Solvens entfernt und der Rückstand wird in 50 ml EE aufgenommen. Die organische Phase wird dreimal mit 5 % KHSO<sub>4</sub>-Lösung, dreimal mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und zum Schluß einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Dann wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM/MeOH 20:1).

**Ausbeute:** 96 mg (0.14 mmol, 65 %), farbloses Öl.

**Molmasse:** 672.81 g/mol

**Summenformel:** C<sub>35</sub>H<sub>52</sub>O<sub>9</sub>N<sub>4</sub>

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.57 (DCM/MeOH 20:1)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):**  $\delta$  = 0.88 (d, 3H, <sup>3</sup>J=6.3 Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.92 (d, 3H, <sup>3</sup>J=6.3 Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.98 (s, 9H, CC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.42–1.72 (m, 3H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 3.04 (m, 1H, HOCHCH), 3.30–3.63 (m, 12H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.10–4.20 (m, 2H, OCCHNH, HOCHCH), 4.84 (d, 1H, <sup>3</sup>J=11.3 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 4.89 (d, 1H, <sup>3</sup>J=11.3 Hz, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 5.10 (s, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>), 5.48 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH) 6.43 (m, 1H, Z-NH), 6.78 (d, 1H, <sup>3</sup>J=8.8 Hz, OCCHNH), 7.28–7.42 (m, 10H, CH<sub>aryl</sub>), 9.45 (s, 1H, Bn-ONHCO).

**<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):**  $\delta$  = 22.5 (p, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.6 (p, CHCH<sub>3</sub>), 25.6 (t, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26.7 (p, CC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 34.6 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>CCH), 38.4 (s, CHCH<sub>2</sub>), 39.2 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 40.8 (s, Boc-NHCH<sub>2</sub>), 45.1 (t, HOCHCH), 60.7 (t, OCCHNH), 66.7 (s, OCH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 69.6 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.0 (s, Z-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.1 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 72.9 (t, HOCHCH), 78.4 (s, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub>ONH), 128.2 (t, CH<sub>aryl</sub>), 128.5 (t, CH<sub>aryl</sub>), 128.6 (t, CH<sub>aryl</sub>), 128.7 (t, CH<sub>aryl</sub>), 128.8 (t, CH<sub>aryl</sub>), 129.1 (t, CH<sub>aryl</sub>), 135.0 (q,

$C_{aryl}$ ), 135.5 (q,  $C_{aryl}$ ), 156.6 (q, Bn-OC(=O)NH), 169.7 (q, HOCHCHCO), 169.8 (q, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 174.8 (q, Bn-ONHCO).

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):**  $\tilde{\nu}$  = 3318, 2958, 1644, 1533, 1368, 1261, 1096, 804, 750.

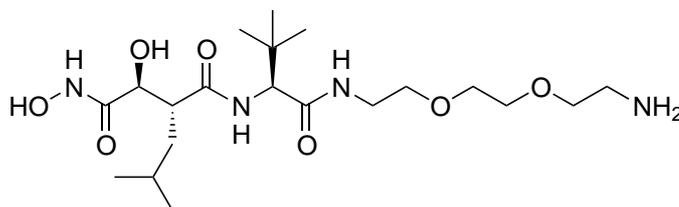
**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 673.2 (100, [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 673.4), 695.4 (30, [M+Na]<sup>+</sup>, berechnet 695.4).

**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 673.38027, monoisotopische Masse berechnet für das Kation C<sub>35</sub>H<sub>53</sub>O<sub>9</sub>N<sub>4</sub><sup>+</sup> 673.38071.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{25} = -17.5 \pm 0.3$  ( $c = 0.4$ ; DCM).

### Entfernen der Benzylschutzgruppen

#### *N*-(8-Amino-3,6-dioxaoct-1-yl)-(2*R*,3*S*)-*N*-(hydroxy)-3-hydroxy-2-(2-methylpropyl)succinamoyl-(2*S*)-*tert*-leucinamid **18**



70 mg (0.1 mmol) **49** werden in 15 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 2 mg Pd/C (10 %) 2 h lang bei RT in einer H<sub>2</sub>-Atmosphäre gerührt. Es wird durch Kieselgel filtriert und mit MeOH nachgewaschen. Das Solvens wird im Vakuum entfernt. Das Produkt kann mittels präparativer RP-HPLC gereinigt werden.

**Ausbeute:** 41 mg (91  $\mu$ mol, 91 %), farbloses Öl.

**Molmasse:** 448.55 g/mol

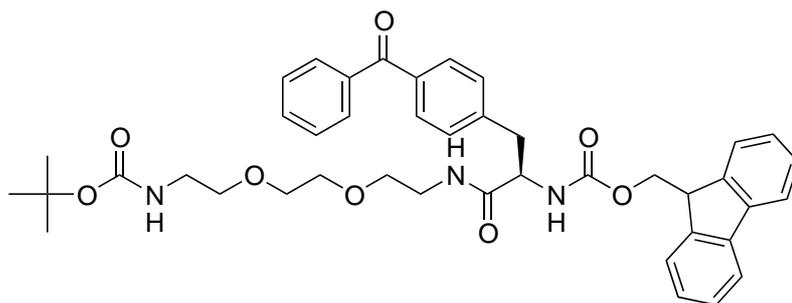
**Summenformel:** C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>O<sub>7</sub>N<sub>4</sub>

*physikalische Daten auf Seite 132*

## 6.4 Synthese eines Photoaffinitätsmarkers

### 6.4.1 Darstellung der Vorstufen

#### *N*-[9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl]-(*S*)-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-(*tert*-butyloxycarbonylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl]amid **51**



491 mg (1.00 mmol) Fmoc-L-Bpa-OH **50** werden zusammen mit 192 mg (1.00 mmol) EDC·HCl, 153 mg (1.00 mmol) HOBt und 110  $\mu$ l (1.00 mmol) NMM in 6 ml trockenem DCM gelöst. Nach 10 min Rühren bei 0 °C wird eine Lösung aus 248 mg (1.00 mmol) mono-Boc-geschützten Linker **30** in 2 ml DCM hinzugegeben. Es wird über Nacht bei RT gerührt. Das Solvens wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in 50 ml EE/Wasser (1:1) aufgenommen. Die organische Phase wird dreimal mit 5 % KHSO<sub>4</sub>-Lösung, einmal mit Wasser und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Es wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Solvens wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird aus PE (60–80 °C) mit wenig EE umkristallisiert.

**Ausbeute:** 598 mg (0.83 mmol, 83 %), farbloser Feststoff.

**Schmp.:** 132 °C

**Molmasse:** 721.84 g/mol

**Summenformel:** C<sub>42</sub>H<sub>47</sub>O<sub>8</sub>N<sub>3</sub>

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.44 (EE)

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_4\text{-MeOH}$ ):**  $\delta = 1.38$  (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 3.15–3.22 (m, 2H,  $\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$ ), 3.33–3.39 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCHNH}$ ), 3.41–3.56 (m, 10H,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\ddot{\text{O}}\text{CH}_2$ ), 4.09 (t, 1H,  $^3J=7.2$  Hz,  $\text{OCOCH}_2\text{CH}$ ), 4.37 (m, 1H,  $\text{OCOCH}_A\text{H}_B\text{CH}$ ), 4.45 (m, 1H,  $\text{OCOCH}_A\text{H}_B\text{CH}$ ), 4.60 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$ ), 7.21–7.27 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 7.30–7.36 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 7.37–7.44 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 7.51–7.55 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 7.55–7.60 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 7.60–7.66 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 7.72–7.76 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (125.7 MHz,  $\text{D}_4\text{-MeOH}$ ):**  $\delta = 28.7$  (p,  $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$ ), 39.2 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCHNH}$ ), 40.4 (s,  $\text{Boc-NHCH}_2$ ), 41.2 (s,  $\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$ ), 48.3 (t,  $\text{OCOCH}_2\text{CH}$ ) 57.4 (t,  $\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$ ), 67.9 (s,  $\text{OCOCH}_2\text{CH}$ ), 70.3 (s,  $\text{HCCONH-CH}_2\text{CH}_2$ ), 70.4 (s,  $\text{Boc-NHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 71.1 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 71.2 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 80.1 (q,  $(\text{H}_3\text{C})_3\text{COCO}$ ), 120.9 (t,  $\text{CH}_{\text{Fmoc}}$ ), 126.1 (t,  $\text{CH}_{\text{Fmoc}}$ ), 126.3 (t,  $\text{CH}_{\text{Fmoc}}$ ), 128.2 (t,  $\text{CH}_{\text{Fmoc}}$ ), 128.8 (t,  $\text{CH}_{\text{Benzoyl}}$ ), 129.4 (t,  $\text{CH}_{\text{Benzoyl}}$ ), 130.6 (t,  $\text{CH}_{\text{Benzoyl}}$ ), 130.8 (t,  $\text{CH}_{\text{Benzoyl}}$ ), 131.3 (t,  $\text{CH}_{\text{Benzoyl}}$ ), 137.1 (q,  $\text{C}_{\text{Benzoyl}}$ ), 138.9 (q,  $\text{C}_{\text{Benzoyl}}$ ), 142.6 (q,  $\text{C}_{\text{Fmoc}}$ ), 144.3 (q,  $\text{C}_{\text{Fmoc}}$ ), 145.1 (q,  $\text{C}_{\text{Benzoyl}}$ ), 158.1 (q,  $(\text{H}_3\text{C})_3\text{COCOONH}$ ), 158.4 (q,  $\text{NHCOOCH}_2\text{CH}$ ), 173.6 (q,  $\text{Bpa-CO}$ ), 198.3 (q,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{COC}_6\text{H}_5$ ).

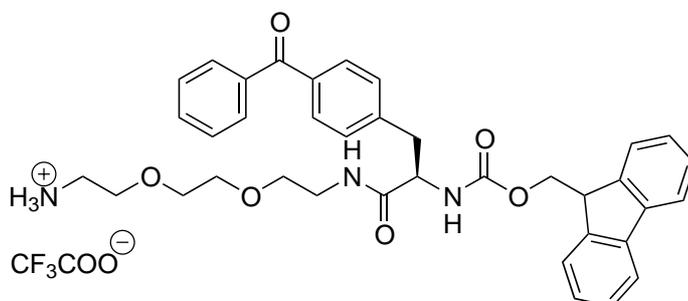
**IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):**  $\tilde{\nu} = 3293, 2938, 1687, 1646, 1538, 1446, 1392, 1365, 1278, 1245, 1170, 1106, 1031, 925, 854$ .

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 744.2 (100,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , berechnet 744.3).

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{28} = -2.1 \pm 0.1$  ( $c = 0.6$ ; Chloroform).

Elementaranalyse:	C	H	N
berechnet	69.76 %	6.55 %	5.81 %
gemessen	69.53 %	6.56 %	5.98 %

*N*-[9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl]-(*S*)-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-ammonio-3,6-dioxaoct-1-yl]amid Trifluoracetat **52**



425 mg (0.59 mmol) **51** werden in 10 ml TFA/DCM (1:1) gelöst und 1 h lang bei RT gerührt. Das Solvens wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird in Wasser/ACN aufgenommen und zur vollständigen Entfernung der TFA lyophilisiert.

**Ausbeute:** 426 mg (0.58 mmol, 98 %), hellgrauer Feststoff.

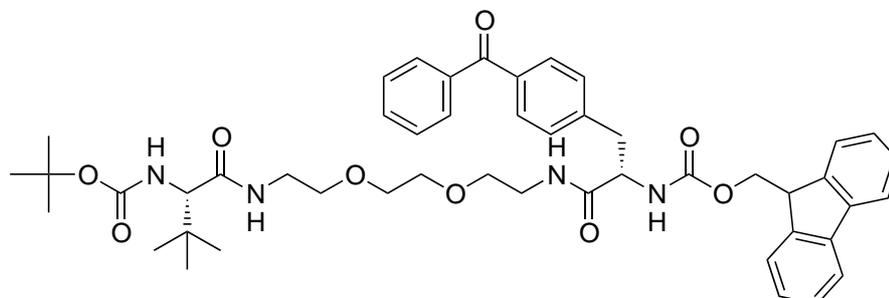
**Molmasse:** 735.75 g/mol

**Summenformel:** C<sub>39</sub>H<sub>40</sub>F<sub>3</sub>O<sub>8</sub>N<sub>3</sub>

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):**  $\tilde{\nu}$  = 3419, 3293, 3058, 2923, 1687, 1646, 1536, 1446, 1278, 1203, 1132, 1037, 925, 836, 798.

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 622.2 (100, [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 622.3).

***N*-[9*H*-Fluoren-9-ylmethyloxycarbonyl]-(*S*)-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-(*N*-*tert*-butyloxycarbonylamino-(2*S*)-*tert*-leucylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl]-amid **53****



268 mg (1.40 mmol) EDC·HCl, 215 mg (1.40 mmol) HOBt und 324 mg (1.40 mmol) Boc-*tert*-Leu-OH **20** werden zusammen mit 154  $\mu$ l (1.40 mmol) NMM in 8 ml trockenem DCM gelöst und 15 min lang unter Eisbadkühlung gerührt. Dann wird eine Lösung aus 1.03 g (1.40 mmol) **52** in 2 ml DCM langsam hinzuge tropft. Es wird über Nacht bei RT gerührt und anschließend wird das Solvens im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 100 ml EE aufgenommen und dreimal mit jeweils 15 ml 5 % KHSO<sub>4</sub>-Lösung, einmal mit Wasser und zum Abschluß einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Dann wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Solvens wird entfernt. Das Produkt wird aus Ethanol umkristallisiert.

**Ausbeute:** 951 mg (1.14 mmol, 82 %), farbloser Feststoff.

**Schmp.:** 152 °C

**Molmasse:** 835.00 g/mol

**Summenformel:** C<sub>48</sub>H<sub>58</sub>O<sub>9</sub>N<sub>4</sub>

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.36 (DCM/MeOH (20:1))

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):**  $\delta$  = 0.97 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.38 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 3.09–3.25 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 3.27–3.39 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 3.40–3.58 (m, 10H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 4.02 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.1 Hz, HCC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),

4.17 (m, 1H, OCOCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 4.27 (m, 1H, OCOCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 4.41 (m, 1H, OCOCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>CH), 4.57 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 5.41 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.7 Hz, OCHCNH), 6.00 (d, 1H, <sup>3</sup>J=8.4 Hz, OCHCNH), 6.82 (m, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 6.89 (m, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 7.21-7.32 (m, 2H, CH<sub>aryl</sub>), 7.33-7.41 (m, 3H, CH<sub>aryl</sub>), 7.42-7.47 (m, 2H, CH<sub>aryl</sub>), 7.50-7.55 (m, 2H, CH<sub>aryl</sub>), 7.55-7.60 (m, 1H, CH<sub>aryl</sub>), 7.69-7.77 (m, 7H, CH<sub>aryl</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS): δ = 27.0 (p, HCC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.3 (p, OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 34.6 (q, HCC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 38.7 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 39.2 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 39.6 (s, CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 47.1 (t, OCOCH<sub>2</sub>CH), 53.4 (t, HCC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 62.0 (t, CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 67.1 (s, OCOCH<sub>2</sub>CH), 69.4 (s, HCCONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 69.6 (s, HCCONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 70.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.4 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 79.6 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>COCO), 119.9 (t, CH<sub>Fmoc</sub>), 124.9 (t, CH<sub>Fmoc</sub>), 127.1 (t, CH<sub>Fmoc</sub>), 127.8 (t, CH<sub>Fmoc</sub>), 128.3 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 129.4 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 129.9 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 130.4 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 132.4 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 136.1 (q, C<sub>Benzoyl</sub>), 137.6 (q, C<sub>Benzoyl</sub>), 141.3 (q, C<sub>Fmoc</sub>), 141.9 (q, C<sub>Fmoc</sub>), 143.7 (q, C<sub>Benzoyl</sub>), 155.9 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>COCO<sub>NH</sub>), 156.1 (q, NHCOOCH<sub>2</sub>CH), 171.1 (NHCHCONH), 171.2 (q, NHCHCO), 196.3 (q, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

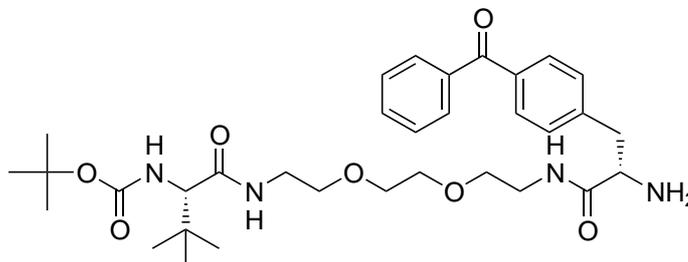
IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3295, 3064, 2931, 2879, 1687, 1648, 1608, 1538, 1448, 1392, 1367, 1317, 1278, 1245, 1172, 1106, 1049, 939, 925, 858.

MS (ESI):  $m/z$  (%) = 857.4 (100, [M+Na]<sup>+</sup>, berechnet 857.4), 873.3 (18, [M+K]<sup>+</sup>, berechnet 873.4)

MS (ESI-FT-ICR):  $m/z$  gemessen 857.40842, monoisotopische Masse berechnet für das Kation C<sub>48</sub>H<sub>59</sub>O<sub>9</sub>N<sub>4</sub><sup>+</sup> 857.40960.

Drehwert:  $[\alpha]_D^{26} = -0.9 \pm 0.2$  ( $c = 0.5$ ; EE).

1-Amino-(*S*)-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-(*N*-*tert*-butyloxycarbonylamino-  
(*S*)-*tert*-leucylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl]amid **54**



780 mg (0.93 mmol) **53** werden in 30 ml THF gelöst. Dann werden 1.53 g (3.06 mmol) *N*-(2-Mercaptoethyl)aminoethyl-polystyrolharz (2.00 mmol/g) und 75  $\mu$ l (0.50 mmol) DBU hinzugefügt. Es wird unter Schutzgas über Nacht bei RT gerührt. Das Harz wird abfiltriert und zweimal mit THF und zweimal mit MeOH gewaschen. Das Solvens wird im Vakuum entfernt. Anschließend wird das Rohprodukt durch Kieselgel mit DCM/MeOH (20:1) filtriert.

**Ausbeute:** 540 mg (0.88 mmol, 94 %), farbloses Öl.

**Molmasse:** 612.76 g/mol

**Summenformel:** C<sub>33</sub>H<sub>48</sub>O<sub>7</sub>N<sub>4</sub>

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.28 (DCM/MeOH 20:1)

**<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):**  $\delta$  = 0.97 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.42 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2.78–2.91 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 3.27–3.62 (m, 12H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.67 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 3.82 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.5 Hz, HCC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 5.31 (d, <sup>3</sup>J=9.1 Hz, NH), 6.36–6.40 (m, 2H, NH, NH), 7.31–7.39 (m, 2H, CH<sub>aryl</sub>), 7.43–7.63 (m, 4H, CH<sub>aryl</sub>), 7.72–7.83 (m, 3H, CH<sub>aryl</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (62.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):**  $\delta$  = 26.6 (p, HCC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.4 (p, OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 34.6 (q, HCC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 38.9 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 39.2 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH<sub>2</sub>), 41.2 (s, CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 56.4 (t, HCC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 62.4 (t,

CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 69.7 (s, HCCONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 69.9 (s, HCCONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 70.2 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 79.6 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>COCO), 128.3 (t, CH<sub>aryl</sub>), 129.3 (t, CH<sub>aryl</sub>), 129.9 (t, CH<sub>aryl</sub>), 130.5 (t, CH<sub>aryl</sub>), 132.4 (t, CH<sub>aryl</sub>), 136.2 (q, C<sub>aryl</sub>), 137.6 (q, C<sub>aryl</sub>), 143.2 (q, C<sub>aryl</sub>), 155.8 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>COCONH), 170.9 (q, Boc-NHCHCONH), 173.9 (q, H<sub>2</sub>NCHCONH), 196.3 (q, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):**  $\tilde{\nu}$  = 3384, 2935, 1722, 1519, 1454, 1407, 1265, 1238, 1135, 1079, 989, 912, 877, 732.

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 513.3 (15, [M+H-Boc]<sup>+</sup>, berechnet 513.2), 613.3 (100, [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 613.4).

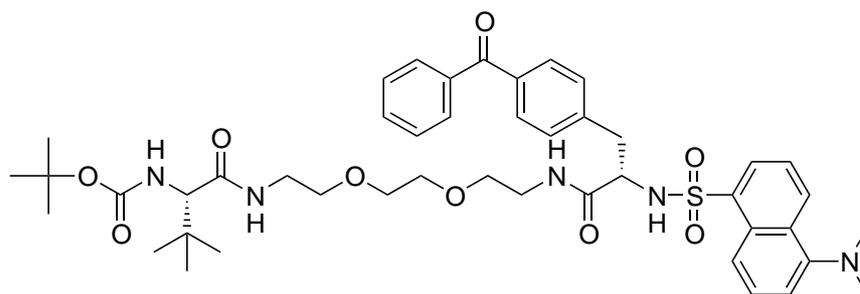
**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 613.35916, monoisotopische Masse berechnet für das Kation C<sub>33</sub>H<sub>49</sub>O<sub>7</sub>N<sub>4</sub><sup>+</sup> 613.35958.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{28} = -0.6 \pm 0.1$  ( $c = 3.5$ ; MeOH).

**analytische HPLC:**  $t_R$  (%) = 38.3 min (96).

#### 6.4.2 Kuppeln von Dansylchlorid 55

*N*-[5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl]-(*S*)-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-(*N*-*tert*-butyloxycarbonylamino-(*S*)-*tert*-leucylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl]-amid 58



111 mg (0.181 mmol) **54** werden zusammen mit 14.6  $\mu\text{l}$  (0.181) trockenem Pyridin in 10 ml trockenem DCM gelöst. Dann wird eine Lösung aus 49 mg (0.181 mmol)

Dansylchlorid **55** in 5 ml trockenem DCM zugetropft. Es wird über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird in 50 ml DCM aufgenommen und anschließend einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Solvens entfernt. Der Rückstand wird an Kieselgel säulenchromatographisch mit EE eluiert.

**Ausbeute:** 104 mg (0.12 mmol, 67 %), gelbes Öl.

**Molmasse:** 846.04 g/mol

**Summenformel:** C<sub>45</sub>H<sub>59</sub>O<sub>9</sub>N<sub>5</sub>S

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.47 (EE)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>4</sub>-MeOH):** δ = 0.99 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.42 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2.79 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.87–3.06 (m, 2H, CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 3.31–3.69 (m, 12H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.97 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.7 Hz, HCC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 4.06 (m, 1H, CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 5.41 (d, 1H, <sup>3</sup>J=9.7 Hz, NH), 6.18 (d, 1H, <sup>3</sup>J=6.9 Hz, NH), 6.59 (m, 1H, NH), 6.90 (m, 2H, CH<sub>aryl</sub>), 7.07 (m, 2H, CH<sub>aryl</sub>), 7.11 (m, 1H, NH), 7.34 (m, 1H, CH<sub>aryl</sub>), 7.38–7.51 (m, 4H, CH<sub>aryl</sub>), 7.59 (m, 1H, CH<sub>aryl</sub>), 7.71 (m, 2H, CH<sub>aryl</sub>), 8.05 (m, 1H, CH<sub>aryl</sub>), 8.13 (m, 1H, CH<sub>aryl</sub>), 8.48 (m, 1H, CH<sub>aryl</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS):** δ = 26.6 (p, HCC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.4 (p, OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 34.7 (q, H<sub>3</sub>CCCH), 38.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 39.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH<sub>2</sub>), 39.6 (s, CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 45.3 (p, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 58.2 (t, CHC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 62.2 (t, CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 69.5 (s, HCCONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 69.6 (s, HCCONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 70.5 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.6 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 79.7 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>-COCO), 115.1 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 118.5 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 122.9 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 128.3 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 128.5 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 128.6 (q, C<sub>Dansyl</sub>), 128.9 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 129.4 (q, C<sub>Dansyl</sub>), 129.6 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 129.9 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 130.1 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 130.8 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 132.4 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 133.9 (q, C<sub>Benzoyl</sub>), 135.8 (q, C<sub>Benzoyl</sub>), 137.5 (q, C<sub>Dansyl</sub>), 140.8 (q, C<sub>Benzoyl</sub>), 151.7 (q, C<sub>Dansyl</sub>), 155.9 (q, (H<sub>3</sub>C)<sub>3</sub>COCOONH), 170.6

(q, Boc-HNCHCONH), 171.1 (q, Dansyl-NHCHCONH), 195.7 (q, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):**  $\tilde{\nu}$  = 3312, 3084, 2965, 2870, 1651, 1556, 1505, 1479, 1454, 1367, 1317, 1278, 1249, 1162, 1145, 1102, 939, 863.

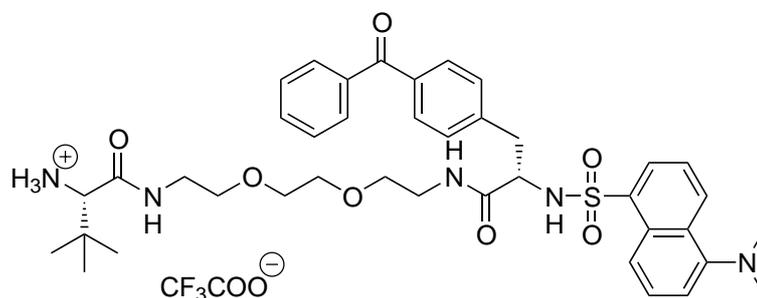
**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 846.5 (100, [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 846.4), 868.4 (60, [M+Na]<sup>+</sup>, berechnet 868.4).

**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 846.40923, monoisotopische Masse berechnet für das Kation C<sub>45</sub>H<sub>60</sub>O<sub>9</sub>N<sub>5</sub>S<sup>+</sup> 846.41063.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{28} = -24.9 \pm 1.8$  ( $c = 2$ ; Chloroform).

### Abspalten der Boc-Schutzgruppe von 58

***N*-[5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl]-(*S*)-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-(1-ammonio-(*S*)-*tert*-leucylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl]amid Trifluoracetat 74**



Verbindung **58** wird in 30 ml TFA/DCM (1:2) aufgenommen und 2 h lang bei RT gerührt. Das Solvens wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird in ACN/Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

**Ausbeute:** 103 mg (0.12 mmol, 99 %), gelber, amorpher Feststoff **74**.

**Schmp.:** 86 °C

**Molmasse:** 859.95 g/mol

**Summenformel:** C<sub>42</sub>H<sub>52</sub>F<sub>3</sub>O<sub>9</sub>N<sub>5</sub>S

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>4</sub>-MeOH, TMS):**  $\delta = 1.07$  (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2.75 (dd, 1H, <sup>3</sup>J=9.9 Hz, <sup>2</sup>J=13.9 Hz, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 2.97 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.99 (dd, 1H, <sup>3</sup>J=5.0 Hz, <sup>2</sup>J=14.0 Hz, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 3.22–3.62 (m, 13H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, HCC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 4.02 (dd, 1H, <sup>3</sup>J=5.0 Hz, <sup>3</sup>J=10.0 Hz, CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 6.95 (m, 2H, CH<sub>aryl</sub>), 7.18 (m, 2H, CH<sub>aryl</sub>), 7.37 (m, 1H, CH<sub>aryl</sub>), 7.48–7.57 (m, 4H, CH<sub>aryl</sub>), 7.60–7.69 (m, 3H, CH<sub>aryl</sub>), 8.13 (m, 1H, CH<sub>aryl</sub>), 8.27 (m, 1H, CH<sub>aryl</sub>), 8.43 (m, 1H, CH<sub>aryl</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, D<sub>4</sub>-MeOH, TMS):**  $\delta = 26.8$  (p, HCC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 34.1 (q, HCC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 39.5 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 40.4 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH<sub>2</sub>), 40.5 (s, CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 46.4 (p, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 59.6 (t, CHC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 62.9 (t, CH-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 70.2 (s, HCCONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 70.3 (s, HCCONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 71.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 71.4 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 117.4 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 122.9 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 125.1 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 128.8 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 129.5 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 129.7 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 129.9 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 130.6 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 130.7 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 131.0 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 133.8 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 136.5 (q, C<sub>Benzoyl</sub>), 136.9 (q, C<sub>Benzoyl</sub>), 138.7 (q, C<sub>Dansyl</sub>), 143.2 (q, C<sub>Benzoyl</sub>), 149.2 (q, C<sub>Dansyl</sub>), 161.8 (q, C<sub>Dansyl</sub>), 162.1 (q, C<sub>Dansyl</sub>), 168.9 (q, Dansyl-HNCHCONH), 173.5 (q, H<sub>2</sub>NCHCONH), 197.8 (q, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):**  $\tilde{\nu} = 3281, 3086, 2944, 2873, 1669, 1607, 1568, 1482, 1447, 1375, 1317, 1279, 1202, 1179, 1141, 1072, 940, 924, 867, 835.$

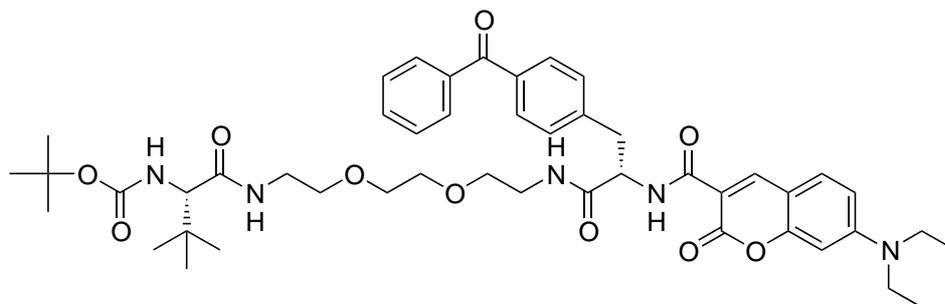
**MS (ESI):**  $m/z$  (%)= 746.3 (100, [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 746.4), 768.2 (10, [M+Na]<sup>+</sup>, berechnet 768.3).

**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 746.35785, monoisotopische Masse berechnet für das Kation C<sub>40</sub>H<sub>53</sub>O<sub>7</sub>N<sub>5</sub>S<sup>+</sup> 746.35820.

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{28} = -35.4 \pm 0.4$  ( $c = 1.3$ ; MeOH).

6.4.3 Kuppeln von 7-Diethylamino-coumarin-3-carbonsäure **56**

*N*-[7-Diethylaminocoumarin-carbonyl]-(*S*)-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-(*N*-*tert*-butyloxycarbonylamino-(*S*)-*tert*-leucylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl]amid **60**



45 mg (172  $\mu\text{mol}$ ) 7-Diethylamino-coumarin-3-carbonsäure **56** werden zusammen mit 38.0 mg (195  $\mu\text{mol}$ ) EDC·HCl, 30 mg (195  $\mu\text{mol}$ ) HOBt und 21.5  $\mu\text{l}$  (195  $\mu\text{mol}$ ) NMM in 5 ml DMF gelöst. Es wird 15 min lang bei 0 °C gerührt. Dann wird eine Lösung aus 100 mg (163  $\mu\text{mol}$ ) **54** in 2 ml DMF hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wird das Solvens im Vakuum entfernt und der Rückstand in 200 ml EE/Wasser (10:1) aufgenommen. Die organische Phase wird einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Das erhaltene Rohprodukt wird an Kieselgel mit EE flash-chromatographisch gereinigt.

**Ausbeute:** 133 mg (156  $\mu\text{mol}$ , 96 %), gelboranges Öl.

**Molmasse:** 856.01 g/mol

**Summenformel:**  $\text{C}_{47}\text{H}_{61}\text{O}_{10}\text{N}_5$

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):**  $\delta$  = 0.96 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 1.24 (t, 6H,  $^3J=7.2$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.42 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 3.21 (dd, 1H,  $^3J=8.2$  Hz,  $^2J=13.8$  Hz,  $\text{CHCH}_A\text{H}_B\text{C}_6\text{H}_4$ ), 3.37 (dd, 1H,  $^3J=6.4$  Hz,  $^2J=13.8$  Hz,  $\text{CHCH}_A\text{H}_B\text{C}_6\text{H}_4$ ), 3.39–3.62 (m, 16H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ), 4.03 (d, 1H,  $^3J=9.4$  Hz,

$\text{HCC}(\text{CH}_3)_3$ , 4.89 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$ ), 5.40 (d, 1H,  $^3J=9.4$  Hz, NH), 6.48 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 6.62 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 7.04 (m, 1H, NH), 7.21 (m, 1H, NH), 7.38–7.50 (m, 5H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 7.57 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 7.70–7.78 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 8.67 (s, 1H,  $\text{HC}=\text{CCO}$ ), 9.31 (m, 1H, NH).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):  $\delta = 12.4$  (p,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ), 26.6 (p,  $\text{HCC}(\text{CH}_3)_3$ ), 28.4 (p,  $\text{OCOC}(\text{CH}_3)_3$ ), 34.6 (q,  $\text{HCC}(\text{CH}_3)_3$ ), 38.0 (s,  $\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$ ), 39.3 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCHNH}$ ), 39.4 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCHNH}$ ), 45.5 (s,  $\text{NC}-\text{H}_2\text{CH}_3$ ), 55.0 (t,  $\text{CHC}(\text{CH}_3)_3$ ), 62.0 (t,  $\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$ ), 69.6 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 69.7 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 70.1 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 70.2 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 79.3 (q,  $(\text{H}_3\text{C})_3\text{COCO}$ ), 96.5 (t,  $\text{CH}_{\text{Coumarin}}$ ), 108.4 (q,  $\text{C}_{\text{Coumarin}}$ ), 109.0 (q,  $\text{C}_{\text{Coumarin}}$ ), 110.0 (t,  $\text{CH}_{\text{Coumarin}}$ ), 128.2 (t,  $\text{CH}_{\text{Benzoyl}}$ ), 129.4 (t,  $\text{CH}_{\text{Benzoyl}}$ ), 129.9 (t,  $\text{CH}_{\text{Benzoyl}}$ ), 130.4 (t,  $\text{CH}_{\text{Benzoyl}}$ ), 131.5 (t,  $\text{CH}_{\text{Coumarin}}$ ), 132.3 (t,  $\text{CH}_{\text{Benzoyl}}$ ), 136.0 (q,  $\text{C}_{\text{Benzoyl}}$ ), 137.7 (q,  $\text{C}_{\text{Benzoyl}}$ ), 142.2 (q,  $\text{C}_{\text{Benzoyl}}$ ), 148.6 (t,  $\text{CH}_{\text{Coumarin}}$ ), 152.9 (q,  $\text{C}_{\text{Coumarin}}$ ), 155.8 (q,  $(\text{H}_3\text{C})_3\text{COCONH}$ ), 157.8 (q,  $\text{C}_{\text{Coumarin}}$ ), 162.5 (q,  $\text{OC}(\text{O})\text{C}=\text{CH}$ ), 163.5 (q,  $\text{OC-Coumarin}$ ), 170.8 (q,  $\text{Boc-NHCHCONH}$ ), 171.2 (q,  $\text{HNCHCONH}$ ), 196.4 (q,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{COC}_6\text{H}_5$ ).

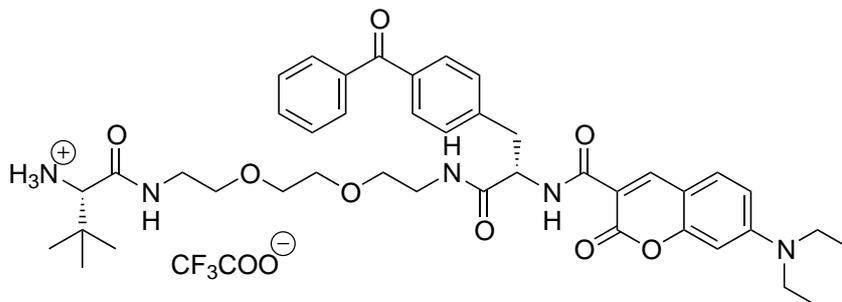
IR (NaCl,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu} = 3432, 2973, 1698, 1654, 1617, 1579, 1513, 1448, 1419, 1351, 1315, 1276, 1234, 1187, 1135, 1010, 923, 794, 754$ .

MS (ESI):  $m/z$  (%) = 856.3 (100,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , berechnet 856.4), 878.4 (22,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , berechnet 878.4).

Drehwert:  $[\alpha]_{\text{D}}^{28} = -69.0 \pm 0.1$  ( $c = 2$ ; Chloroform).

Abspalten der Boc-Schutzgruppe von **60**

*N*-[7-Diethylaminocoumarin-carbonyl]-(*S*)-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-(1-ammonio-(*S*)-*tert*-leucylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl]amid Trifluoracetat **75**



Verbindung **60** wird in 15 ml TFA/DCM (1:2) aufgenommen und 2 h lang bei RT gerührt. Das Solvens wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird in ACN/Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

**Ausbeute:** 135 mg (156  $\mu\text{mol}$ , 99 %), gelborangener, amorpher Feststoff **75**.

**Schmp.:** 134 °C (Zers.)

**Molmasse:** 869.92 g/mol

**Summenformel:**  $\text{C}_{44}\text{H}_{54}\text{F}_3\text{O}_{10}\text{N}_5$

**DC:**  $R_f = 0.27$  (EE)

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_4\text{-MeOH}$ , TMS):  $\delta = 1.07$  (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 1.22 (t, 6H,  $^3J=7.1$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ), 3.20 (dd, 1H,  $^3J=7.5$  Hz,  $^2J=13.5$  Hz,  $\text{CHCH}_A\text{H}_B\text{C}_6\text{H}_4$ ), 3.28 (dd, 1H,  $^3J=6.4$  Hz,  $^2J=13.6$  Hz,  $\text{CHCH}_A\text{H}_B\text{C}_6\text{H}_4$ ), 3.33–3.60 (m, 17H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{HCC}(\text{CH}_3)_3$ ), 4.87 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{-C}_6\text{H}_4$ ), 6.55 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 6.80 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 7.42–7.55 (m, 5H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 7.62 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 7.69–7.76 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 8.55 (s, 1H,  $\text{HC=CCO}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.7 MHz,  $\text{D}_4\text{-MeOH}$ , TMS):  $\delta = 12.7$  (p,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ), 26.8 (p,  $\text{HCC}(\text{CH}_3)_3$ ), 34.1 (q,  $\text{HCC}(\text{CH}_3)_3$ ), 39.7 (s,  $\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$ ), 40.4 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCHNH}$ ), 40.5 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCHNH}$ ), 46.1 (s,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ), 56.1 (t,  $\text{CHC}(\text{CH}_3)_3$ ), 63.0 (t,  $\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$ ), 70.3 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 70.4 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 71.3 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 71.3 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 97.3 (t,  $\text{CH}_{\text{Coumarin}}$ ), 109.5 (q,  $\text{C}_{\text{Coumarin}}$ ), 109.6 (q,  $\text{C}_{\text{Coumarin}}$ ), 111.8 (t,  $\text{CH}_{\text{Coumarin}}$ ), 129.5 (t,  $\text{CH}_{\text{Benzoyl}}$ ), 130.8 (t,  $\text{CH}_{\text{Benzoyl}}$ ), 131.0 (t,  $\text{CH}_{\text{Benzoyl}}$ ), 131.4 (t,  $\text{CH}_{\text{Benzoyl}}$ ), 132.8 (t,  $\text{CH}_{\text{Coumarin}}$ ), 133.8 (t,  $\text{CH}_{\text{Benzoyl}}$ ), 137.4 (q,  $\text{C}_{\text{Benzoyl}}$ ), 138.9 (q,  $\text{C}_{\text{Benzoyl}}$ ), 143.5 (q,  $\text{C}_{\text{Benzoyl}}$ ), 149.5 (t,  $\text{CH}_{\text{Coumarin}}$ ), 154.8 (q,  $\text{C}_{\text{Coumarin}}$ ), 159.3 (q,  $\text{OC}(\text{O})\text{C}=\text{CH}$ ), 164.1 (q,  $\text{C}_{\text{Coumarin}}$ ), 165.0 (q,  $\text{OC-Coumarin}$ ), 168.9 (q,  $\text{HNCHCONH}$ ), 173.1 (q,  $\text{HNCHCONH}$ ), 198.3 (q,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{COC}_6\text{H}_5$ ).

**IR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu} = 3604, 3587, 3307, 3085, 2975, 2869, 2711, 1781, 1661, 1617, 1577, 1511, 1476, 1446, 1422, 1383, 1352, 1318, 1280, 1168, 797$ .

**MS** (ESI):  $m/z$  (%) = 756.3 (100,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , berechnet 756.4).

**MS** (ESI-FT-ICR):  $m/z$  gemessen 756.39706, monoisotopische Masse berechnet für das Kation  $\text{C}_{42}\text{H}_{54}\text{O}_8\text{N}_5^+$  756.39669.

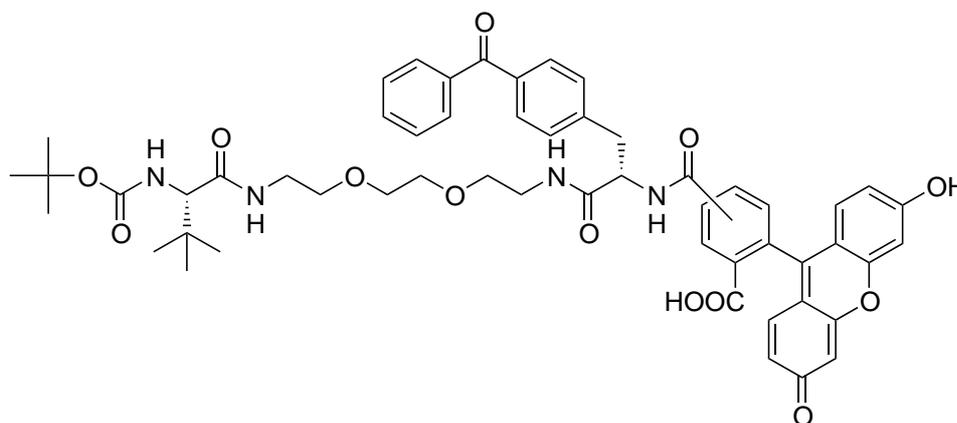
**Drehwert**:  $[\alpha]_{\text{D}}^{28} = -10.4 \pm 0.3$  ( $c = 1$ ; MeOH).

#### 6.4.4 Kuppeln von 5(6)-Carboxyfluorescein **57**

##### *N*-[Fluorescein-4(5)-carbonyl]-(*S*)-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-(*N-tert*-butyloxycarbonylamino-(*S*)-*tert*-leucylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl]amid **62**

61 mg (163  $\mu\text{mol}$ ) 5(6)-Carboxyfluorescein **57** (Isomerengemisch) werden zusammen mit 31.0 mg (163  $\mu\text{mol}$ ) EDC·HCl, 25 mg (163  $\mu\text{mol}$ ) HOBt und 19  $\mu\text{l}$  (163  $\mu\text{mol}$ ) NMM in 5 ml THF gelöst. Es wird 15 min lang bei 0 °C gerührt. Dann wird eine Lösung aus 100 mg (163  $\mu\text{mol}$ ) **54** in 5 ml THF hinzugegeben. Die Reaktionsmischung

wird über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wird das Solvens im Vakuum entfernt und der Rückstand wird an Kieselgel mit DCM/MeOH (9:1) flashchromatographisch gereinigt. Das Produkt liegt als Isomergemisch vor.



**Ausbeute:** 149 mg (153  $\mu\text{mol}$ , 94 %), gelbes Öl.

**Molmasse:** 971.06 g/mol

**Summenformel:**  $\text{C}_{54}\text{H}_{58}\text{O}_{13}\text{N}_4$

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_4\text{-MeOH}$ ):**  $\delta = 0.77\text{--}0.89$  (m, 18H,  $\text{CH}_3$ ), 1.26–1.34 (m, 18H,  $\text{CH}_3$ ), 2.92–3.52 (m, 26H,  $\text{CH}_2$ ), 3.79–3.87 (m, 2H, CH), 4.87–4.95 (m, 2H, CH), 6.35–6.62 (m, 12H, CH), 7.10–7.65 (m, 20H, CH), 7.88–8.03 (m, 3H, CH), 8.27 (m, 1H, CH).

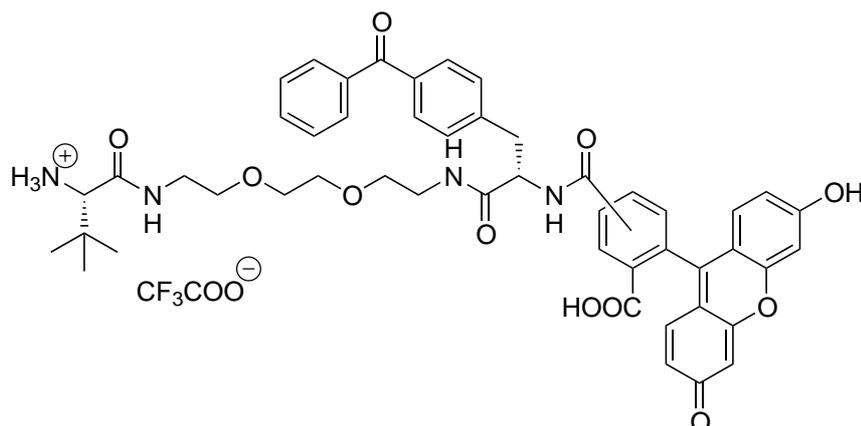
**IR (NaCl,  $\text{cm}^{-1}$ ):**  $\tilde{\nu} = 3327, 2965, 2870, 1750, 1652, 1608, 1540, 1507, 1450, 1368, 1317, 1279, 1246, 1177, 1113, 994, 924, 852, 790$ .

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 971.6 (70,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , berechnet 971.4), 993.6 (100,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , berechnet 993.4).

**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 993.38927, monoisotopische Masse berechnet für das Kation  $\text{C}_{54}\text{H}_{58}\text{O}_{13}\text{N}_4\text{Na}^+$  993.38948.

## Abspalten der Boc-Schutzgruppe von 62

*N*-[Fluorescein-4(5)-carbonyl]-(*S*)-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-(1-ammonio-*S*)-*tert*-leucylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl]amid Trifluoracetat 76



Die Verbindung **62** wird in 15 ml TFA/DCM (1:2) aufgenommen und 2 h lang bei RT gerührt. Das Solvens wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird in ACN/Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Das Produkt liegt als Isomerengemisch vor.

**Ausbeute:** 151 mg (153  $\mu$ mol, 99 %), gelber, amorpher Feststoff **76**.

**Molmasse:** 984.97 g/mol

**Summenformel:** C<sub>51</sub>H<sub>51</sub>F<sub>3</sub>O<sub>13</sub>N<sub>4</sub>

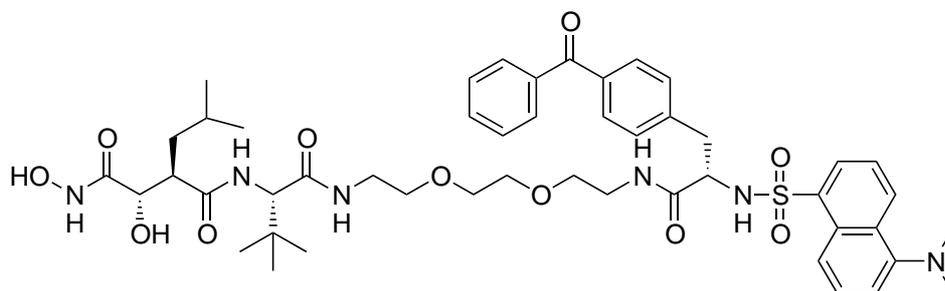
**MS (MALDI-ToF, CHCA):**  $m/z$  (%) = 871.6 (100, [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 871.4), 894.7 (71, [M+Na]<sup>+</sup>, berechnet 894.4).

### 6.4.5 Darstellung der Proteinsonden

#### Generelle Vorschrift zur Kupplung mit dem Dioxolanon **17** und Ringöffnung

Bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  wird zu einer Lösung von 1.2 Äquivalenten **17** in 10 ml trockenem THF innerhalb von 4 h gleichzeitig mit einer Zeikanal-Spritzenpumpe eine Lösung aus 1.0 Äquivalenten des entsprechend mit der Reportergruppe funktionalisierten Derivates (**74**, **75**, **76**) in 10 ml trockenem THF und eine Lösung aus 1.0 Äquivalenten Triethylamin in 10 ml trockenem THF getropft. Nach Beendigung der Zugabe wird noch 0.5 h lang gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf RT gebracht und das Solvens wird schnell im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in DCM aufgenommen und einmal mit gekühlter gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingengt. Das erhaltene Produkt wird sofort weiter eingesetzt. 4.0 Äquivalente Hydroxylammoniumchlorid werden zusammen mit 4.0 Äquivalenten NMM in DMF (1.5 ml/Äquivalent) gelöst und zu dem Produkt gegeben. Es wird über Nacht bei RT gerührt und anschließend wird das Solvens entfernt. Das Rückstand wird mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

#### *N*-[5-Dimethylamino-naphthalin-1-sulfonyl]-(*S*)-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-(((2*R*,3*S*)-*N*,3-dihydroxy-2-(2-methylpropyl)succinamoyl)-(*S*)-*tert*-leucylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl]amid **59**



**Ansatz:** 33 mg (93  $\mu\text{mol}$ ) **74**.

**Ausbeute:** 56 mg (60  $\mu$ mol, 65 %), oranger, amorpher Feststoff.

**Schmp.:** 121 °C (Zers.)

**Molmasse:** 933.12 g/mol

**Summenformel:** C<sub>48</sub>H<sub>64</sub>O<sub>11</sub>N<sub>6</sub>S

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>4</sub>-MeOH, TMS):**  $\delta$  = 0.88 (d, 3H, <sup>3</sup>J=6.9 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 0.92 (d, 3H, <sup>3</sup>J=6.9 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 0.98 (s, 9H, CC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.29 (m, 1H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 1.54 (m, 1H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 1.63 (m, 1H, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>), 2.79 (dd, 1H, <sup>3</sup>J=10.0 Hz, <sup>2</sup>J=13.8 Hz, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 2.86 (ddd, 1H, <sup>3</sup>J=5.6 Hz, <sup>3</sup>J=7.7 Hz, <sup>3</sup>J=7.7 Hz, HOCHCH), 3.03 (dd, 1H, <sup>3</sup>J=5.0 Hz, <sup>2</sup>J=13.8 Hz, CHCH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 3.08 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.20–3.62 (m, 12H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.03 (dd, 1H, <sup>3</sup>J=5.0 Hz, <sup>3</sup>J=9.7 Hz, CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 4.07 (d, 1H, <sup>3</sup>J=5.6 Hz, HOCHCH), 4.28 (s, 1H, HCC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 6.99 (m, 2H, CH<sub>aryl</sub>), 7.20 (m, 2H, CH<sub>aryl</sub>), 7.48–7.69 (m, 8H, CH<sub>aryl</sub>) 8.15 (m, 1H, CH<sub>aryl</sub>), 8.35 (m, 1H, CH<sub>aryl</sub>), 8.41 (m, 1H, CH<sub>aryl</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, D<sub>4</sub>-MeOH, TMS):**  $\delta$  = 22.4 (p, CHCH<sub>3</sub>), 23.6 (p, CHCH<sub>3</sub>), 26.8 (t, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 27.2 (p, HCC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 35.4 (q, HCC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 39.5 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 39.8 (s, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 40.2 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCOCHNH), 40.7 (s, CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 46.6 (p, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 49.3 (t, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 59.5 (t, HCC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 62.0 (t, CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 70.3 (s, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.4 (s, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 71.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 71.4 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 72.9 (t, HOCHCH), 117.7 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 123.8 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 125.5 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 128.7 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 129.4 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 129.5 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 130.0 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 130.7 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 130.8 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 131.0 (t, CH<sub>Dansyl</sub>), 133.8 (t, CH<sub>Benzoyl</sub>), 136.6 (q, C<sub>Benzoyl</sub>), 137.2 (q, C<sub>Benzoyl</sub>), 138.7 (q, C<sub>Dansyl</sub>), 143.2 (q, C<sub>Benzoyl</sub>), 147.7 (q, C<sub>Dansyl</sub>), 160.7 (q, C<sub>Dansyl</sub>), 160.9 (q, C<sub>Dansyl</sub>), 171.5 (q, Dansyl-HNCHCONH), 172.7 (q, HOCHCHCO), 173.4 (q, HNCH(C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)CONH), 175.4 (q, HONHCO), 197.8 (q, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

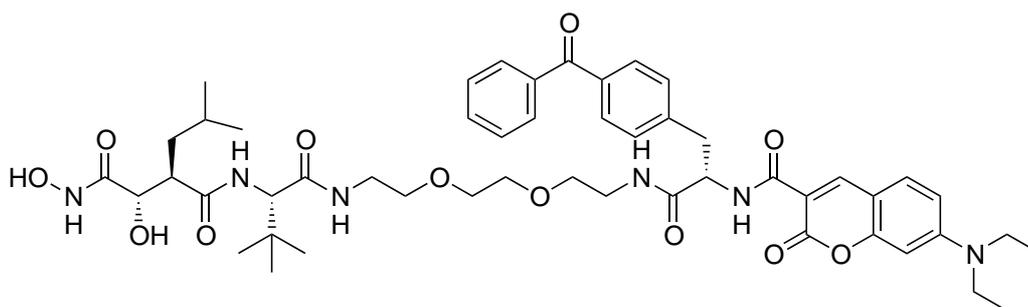
**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 933.4 (100,  $[M+H]^+$ , berechnet 933.4), 955.4 (40,  $[M+Na]^+$ , berechnet 955.4).

**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 933.44359, monoisotopische Masse berechnet für das Kation  $C_{48}H_{65}O_{11}N_6S^+$  933.44265.

**präparative HPLC:**  $t_R = 28.6$  min.

**analytische HPLC:**  $t_R = 26.2$  min.

***N*-[7-Diethylaminocoumarin-3-carbonyl]-(*S*)-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-(((2*R*,3*S*)-*N*,3-dihydroxy-2-(2-methylpropyl)succinamoyl)-(*S*)-*tert*-leucylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl]amid 61**



**Ansatz:** 42 mg (48  $\mu$ mol) **75**

**Ausbeute:** 20 mg (22  $\mu$ mol, 45 %), oranger, amorpher Feststoff.

**Schmp.:** 78 °C (Zers.)

**Molmasse:** 943.06 g/mol

**Summenformel:**  $C_{50}H_{66}O_{12}N_6$

**$^1H$ -NMR (500 MHz,  $D_4$ -MeOH, TMS):**  $\delta = 0.97$  (s, 9H,  $CH_3$ ), 0.87 (d, 3H,  $^3J=6.6$  Hz,  $CHCH_3$ ), 0.91 (d, 3H,  $^3J=6.6$  Hz,  $CHCH_3$ ), 1.22 (t, 6H,  $^3J=7.0$  Hz,  $NCH_2CH_3$ ), 1.28 (m, 1H,  $CHCH_AH_B$ ), 1.52 (m, 1H,  $CHCH_AH_B$ ), 1.60 (m,

$^1\text{H}$ ,  $\text{CHCH}_A\text{H}_B$ ), 2.92 (m, 1H,  $\text{HOCHCH}$ ), 3.20–3.55 (m, 18H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ), 4.02 (m, 1H,  $\text{HOCHCH}$ ), 4.26 (s, 1H,  $\text{HCC}(\text{CH}_3)_3$ ), 4.84 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4$ ), 6.57 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 6.81 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 7.44–7.55 (m, 5H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 7.62 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 7.70–7.74 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 8.60 (s, 1H,  $\text{HC=CCO}$ ).

**IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):**  $\tilde{\nu} = 2959, 2873, 2360, 2337, 1748, 1734, 1696, 1684, 1647, 1634, 1578, 1475, 1458, 1353, 1318, 1276, 1136, 1076, 941, 794$ .

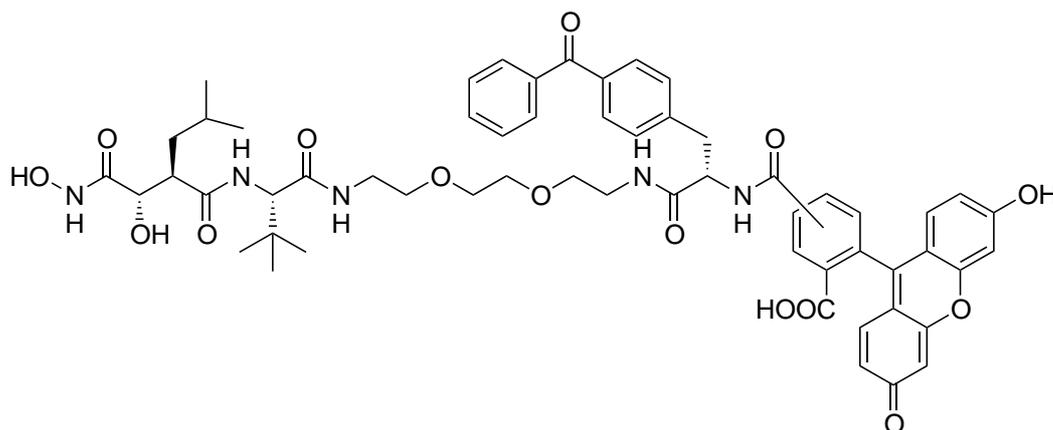
**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 943.3 (40,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , berechnet 943.5), 956.4 (100,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , berechnet 965.5).

**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 943.48253, monoisotopische Masse berechnet für das Kation  $\text{C}_{50}\text{H}_{67}\text{O}_{12}\text{N}_6^+$  943.48217.

**präparative HPLC:**  $t_R = 32.0$  min.

**analytische HPLC:**  $t_R = 28.7$  min.

***N*-[Fluorescein-4(5)-carbonyl]-(*S*)-(4-benzoylphenyl)alanin-[8-(((*2R,3S*)-*N,3*-dihydroxy-2-(2-methylpropyl)succinamoyl)-(*S*)-*tert*-leucylamino)-3,6-dioxaoct-1-yl]amid 63**



**Ansatz:** 72 mg (73  $\mu\text{mol}$ ) **76**

**Ausbeute:** 27 mg (26  $\mu\text{mol}$ , 36 %), amorpher, gelber Feststoff. Das Produkt wird als Isomerengemisch erhalten.

**Schmp.:** 132 °C (Zers.)

**Molmasse:** 1058.13 g/mol

**Summenformel:**  $\text{C}_{57}\text{H}_{63}\text{O}_{15}\text{N}_5$

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_4\text{-MeOH}$ ):**  $\delta$  = 0.81–1.01 (m, 30H,  $\text{CH}_3$ ), 1.21–1.31 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.45–1.66 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2.80–2.90 (m, 2H, CH), 3.04–3.60 (m, 26H,  $\text{CH}_2$ ), 4.01–4.08 (m, 2H, CH), 4.25–4.32 (m, 2H, CH), 4.98–5.05 (m, 2H, CH), 6.54–6.86 (m, 12H, CH), 7.17–7.74 (m, 20H, CH), 8.05 (m, 1H, CH), 8.09–8.16 (m, 2H, CH), 8.45 (m, 1H, CH).

**IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):**  $\tilde{\nu}$  = 3419, 2958, 2869, 2360, 1638, 1607, 1540, 1456, 1385, 1317, 1281, 1205, 1134, 1122, 926, 853.

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 1058.5 (100,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , berechnet 1058.4), 1080.4 (50,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , berechnet 1080.4).

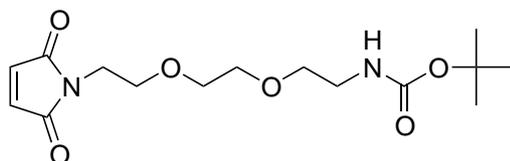
**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 1058.43983, monoisotopische Masse berechnet für das Kation  $\text{C}_{57}\text{H}_{64}\text{O}_{15}\text{N}_5^+$  1058.43934.

**präparative HPLC:**  $t_R$  = 38.9 min.

**analytische HPLC:**  $t_R$  = 36.4 min (42 %), 36.7 (58 %) (Isomerengemisch).

## 6.5 Synthese von derivatisiertem Maleinimid

1-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)-8-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-3,6-dioxaoctan **69**



Zu einer Lösung von 200 mg (2.06 mmol) Maleinimid und 356  $\mu$ l (2.06 mmol) NMM in 10 ml EE werden langsam 235  $\mu$ l (2.47 mmol) Chlorameisensäureethylester unter Eiskühlung getropft. Nach 1 h Rühren wird abfiltriert und mit 30 ml EE nachgewaschen. Die organische Phase wird dreimal mit Wasser und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird dann sofort unter Eiskühlung zu einer Lösung von 312 mg (1.26 mmol) mono-Boc-Linker **30** in 20 ml THF/gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (1:1) getropft. Nach 10 min Rühren bei 0 °C werden nochmals 20 ml THF/gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (1:1) hinzugefügt. Nach weiteren 30 min wird dann das Eisbad entfernt und noch 1 h lang bei RT gerührt. Dann wird die Reaktionmischung mit 50 ml EE versetzt und die Phasen werden getrennt. Die wässrige Phase wird noch dreimal mit jeweils 25 ml EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wird an Kieselgel flashchromatographisch mit PE/EE (20:1) eluiert.

**Ausbeute:** 249 mg (0.76 mmol, 60 %), farbloses Öl.

**Molmasse:** 328.36 g/mol

**Summenformel:**  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_6\text{N}_2$

**DC:**  $R_f = 0.68$  (EE)

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):**  $\delta = 1.44$  (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 3.28–3.33 (m, 2H, Boc-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.49–3.75 (m, 10H, Boc-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 5.06 (br. s, 1H, NH), 6.72 (s, 2H, OCCH).

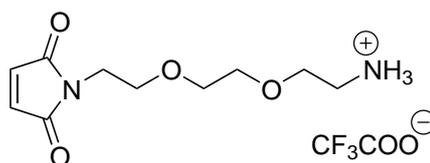
**$^{13}\text{C-NMR}$  (125.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):**  $\delta = 28.4$  (p,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 37.0 (s, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 40.4 (s, Boc-HNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 67.8 (s, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 69.9 (s, Boc-HNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.2 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 70.3 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 79.3 (q,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 134.1 (t, OCCH), 155.9 (q, Boc-CO), 170.7 (q, CHCO).

**IR (NaCl,  $\text{cm}^{-1}$ ):**  $\tilde{\nu} = 3365, 2975, 2932, 1709, 1519, 1435, 1331, 1273, 1250, 1172, 1107, 1043, 970$ .

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 229.0 (100,  $[\text{M}+\text{H}-\text{Boc}]^+$ , berechnet 229.1), 351.1 (10,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , berechnet 351.2).

**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 329.17022, monoisotopische Masse berechnet für das Kation  $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{O}_6\text{N}_2^+$  329.17071.

### 1-(Ammonio-)-8-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-3,6-dioxaoc-tan-trifluoracetat 72



72

249 g (0.76 mmol) **69** werden in 12 ml TFA/DCM (1:1) gelöst und 45 min lang bei RT gerührt. Das Solvens wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird zur vollständigen Entfernung der TFA lyophilisiert.

**Ausbeute:** 260 mg (0.76 mmol, 99 %), farbloses Harz.

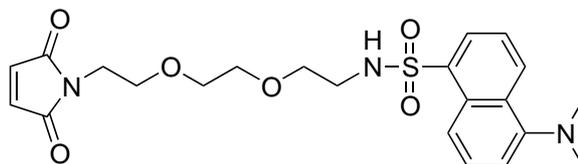
**Molmasse:** 342.27 g/mol

**Summenformel:** C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub>

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>4</sub>-MeOH): δ = 3.12–3.16 (m, 2H, H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.60–3.74 (m, 10H, H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 6.83 (s, 2H, OCCH).

<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, D<sub>4</sub>-MeOH): δ = 38.1 (s, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 40.6 (s, H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 67.9 (s, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 69.1 (s, H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 71.1 (s, OCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>O), 71.4 (s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 135.5 (t, OCCH), 172.6 (q, CHCO).

***N*-(8-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-pyrrol-1-yl)-3,6-dioxaoctanyl)-5-dimethylaminonaphthalen-1-sulfonamid 70**



Zu einer Lösung von 232 mg (0.86 mmol) Dansyl-Cl in 10 ml trockenem DCM wird unter Eiskühlung eine Lösung aus 294 mg (0.86 mmol) **72** und 248 µl (1.72 mmol) trockenem Triethylamin in 10 ml trockenem DCM getropft. Es wird 2 h lang bei 0 °C und anschließend 30 min lang bei RT gerührt. Dann werden 50 ml DCM der Reaktionsmischung zugefügt und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wird die Lösung über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Danach wird das Rohprodukt an Kieselgel flashchromatographisch gereinigt. Schnellaufende Verunreinigungen werden zunächst mit PE/EE (10:1) entfernt und anschließend wird das Produkt mit EE eluiert.

**Ausbeute:** 253 mg (0.55 mmol, 64 %), gelbes Öl.

**Molmasse:** 461.53 g/mol

**Summenformel:** C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>O<sub>6</sub>N<sub>3</sub>

DC:  $R_f = 0.83$  (EE)

**$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):**  $\delta = 2.88$  (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.04–3.13 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.28–3.74 (m, 10H,  $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 5.52 (t, 1H,  $^3J=5.5$  Hz, NH), 6.70 (s, 2H, OCCH), 7.19 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 7.47–7.61 (m, 2H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 8.24 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 8.34 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 8.51–8.56 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (62.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS):**  $\delta = 37.1$  (s,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 43.1 (s,  $\text{HNCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 45.5 (p,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 67.9 (s,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 69.7 (s,  $\text{HNCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 70.1 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 70.2 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 115.2 (t,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 119.2 (t,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 123.2 (t,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 128.3 (t,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 129.3 (t,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 129.8 (q,  $\text{C}_{\text{aryl}}$ ), 129.9 (q,  $\text{C}_{\text{aryl}}$ ), 130.3 (t,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 134.2 (t, OCCH), 135.3 (q,  $\text{O}_2\text{SC}$ ), 151.9 (q,  $\text{CN}(\text{CH}_3)_2$ ), 170.9 (q, CHCO).

**IR (NaCl,  $\text{cm}^{-1}$ ):**  $\tilde{\nu} = 3463, 3304, 3099, 2870, 2789, 2359, 2253, 1770, 1704, 1613, 1573, 1504, 1434, 1406, 1322, 1232, 1201, 1143, 943, 913, 829, 791, 729$ .

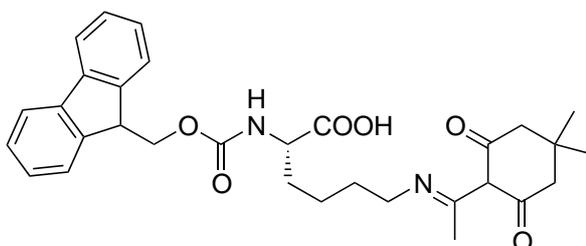
**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 462.1 (22,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , berechnet 462.2), 484.1 (100,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , berechnet 484.2), 500.1 (25,  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , berechnet 500.2).

**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 462.16811, monoisotopische Masse berechnet für das Kation  $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_6\text{N}_3\text{S}^+$  462.16933.

## 6.6 Peptidsynthese

### 6.6.1 Synthese von Lysinderivaten

#### Synthese von Fmoc-Lys(Dde)-OH **66**



643 mg (1.33 mmol) Fmoc-Lys-OH·TFA **64** werden zusammen mit 390  $\mu$ l (2.66 mmol) Triethylamin und 242 mg (1.33 mmol) 2-Acetyldimidon **65** in 10 ml DMF über Nacht bei RT gerührt. Das Solvens wird entfernt und der Rückstand in 200 ml DCM aufgenommen. Es wird mit 5 % KHSO<sub>4</sub>-Lösung auf pH 2 angesäuert. Nachdem die Phasen getrennt worden sind, wird die organische Phase mit wenig gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Anschließend wird das Solvens im Vakuum entfernt.

**Ausbeute:** 589 mg (1.09 mmol, 82 %), farbloser Feststoff.

**Molmasse:** 532.63 g/mol

**Summenformel:** C<sub>31</sub>H<sub>36</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub>

**Schmp.:** 150 °C (Zers.)

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.28 (DCM/MeOH 30:1); 0.74 (DCM/MeOH/AcOH 90:8:2)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>4</sub>-MeOH):**  $\delta$  = 0.96 (s, 6H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.45–1.58 (m, 3H, CH<sub>2</sub>), 1.61–1.78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.86–1.96 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.97 (s, 1H, N=CCH(CO)<sub>2</sub>), 2.26 (s, 4H, (H<sub>3</sub>C)<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 2.50 (s, 3H, N=CCH<sub>3</sub>) 3.46 (t, 2H, <sup>3</sup>J=6.9 Hz,

CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 4.14 (m, 1H, HNCHCOOH), 4.20 (t, 1H, <sup>3</sup>J=7.0 Hz, OCH<sub>2</sub>CH), 4.30 (d, 2H, <sup>3</sup>J=7.0 Hz, OCH<sub>2</sub>CH), 7.25–7.30 (m, 2H, AA'BB'), 7.34–7.39 (m, 2H, AA'BB'), 7.60–7.70 (m, 2H, AA'BB'), 7.77 (d, 2H, <sup>3</sup>J=7.5 Hz, AA'BB').

<sup>13</sup>C-NMR (125.7 MHz, D<sub>4</sub>-MeOH): δ = 18.4 (p, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.3 (s, CH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 28.3 (s, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 29.5 (s, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>NH), 30.9 (p, N=CCH<sub>3</sub>), 32.4 (s, CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 44.3 (t, OCH<sub>2</sub>CH), 48.4 (s, (H<sub>3</sub>C)<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>), 53.3 (t, HNCHCOOH), 55.4 (q, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) 67.9 (s, OCH<sub>2</sub>CH), 108.6 (t, N=CCH(CO)<sub>2</sub>), 120.9 (t, CH<sub>aryl</sub>), 126.3 (t, CH<sub>aryl</sub>), 128.2 (t, CH<sub>aryl</sub>), 128.8 (t, CH<sub>aryl</sub>), 142.6 (q, C<sub>aryl</sub>), 145.3 (q, C<sub>aryl</sub>), 145.5 (q, C=N) 158.6 (q, Fmoc-CO), 175.5 (q, COOH), 199.8 (q, Dde-CO).

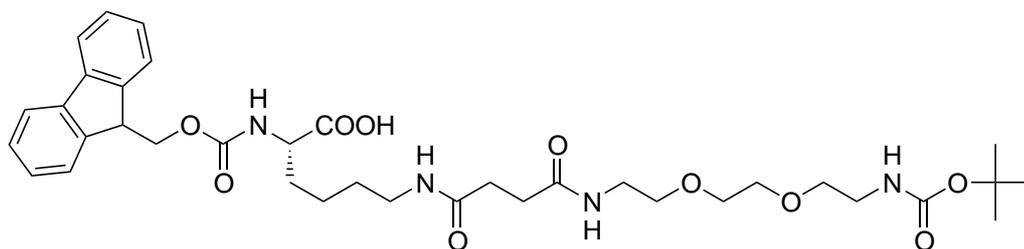
IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  = 3420, 2954, 2863, 1715, 1625, 1568, 1451, 1370, 1339, 1206, 1143, 760.

MS (ESI): *m/z* (%) = 533.2 (100, [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 533.3), 555.2 (20, [M+Na]<sup>+</sup>, berechnet 555.3).

MS (ESI-FT-ICR): *m/z* gemessen 533.26418, monoisotopische Masse berechnet für das Kation C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> 533.26461.

Drehwert:  $[\alpha]_D^{30} = +1.79 \pm 0.29$  (*c* = 1; MeOH).

### Synthese von Fmoc-Lys(Linker-Boc)-OH 67



Zu einer Lösung von 2.80 g (8.05 mmol) des Linkers **34** in 100 ml DCM werden 0.93 g (8.05 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid, 1.70 g (8.85 mmol) EDC·HCl und 900 μl

(8.05 mmol) NMM gegeben. Es wird 1 h lang bei 0 °C gerührt. Anschließend wird die organische Phase sukzessiv mit 5 ml 5 % KHSO<sub>4</sub>-Lösung, 5 ml Wasser, gesättigter NaCO<sub>3</sub>-Lösung und zum Schluß einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Dann wird die Lösung über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und anschließend im Vakuum eingedunstet. Der Rückstand wird zusammen mit 2.70 ml (16.0 mmol) DIPEA in 50 ml DMF gelöst. Zu dieser Lösung wird innerhalb von 2 h eine Lösung aus 2.91 g (8.09 mmol) Fmoc-Lys-OH·TFA **64** in 15 ml DMF getropft. Nach Beendigung der Zugabe wird noch 1 h lang bei RT gerührt. Das Solvens wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wird in 300 ml EE aufgenommen. Die organische Phase wird dreimal mit 5 % KHSO<sub>4</sub>-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden mit 5 % KHSO<sub>4</sub>-Lösung auf pH 1.5 eingestellt und fünfmal mit jeweils 50 ml EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Solvens wird entfernt und der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (DCM/MeOH 20:1→5:1).

**Ausbeute:** 4.44 g (6.35 mmol, 79 %), farbloser Feststoff.

**Molmasse:** 698.80 g/mol

**Summenformel:** C<sub>36</sub>H<sub>50</sub>O<sub>10</sub>N<sub>4</sub>

**Schmp.:** 104 °C (Zers.)

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.41 (DCM/MeOH/AcOH 90:8:2)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>4</sub>-MeOH):** δ = 1.42 (s, 9H, OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.48–1.56 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1.70 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.85 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.43–2.51 (m, 4H, HNOCC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>CONH), 3.17 (t, 2H, <sup>3</sup>J=7.0 Hz, CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 3.20 (t, 2H, <sup>3</sup>J=5.6 Hz, CH<sub>2</sub>CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.34 (t, 2H <sup>3</sup>J=5.5 Hz, Boc-NHCH<sub>2</sub>), 3.46–3.59 (m, 8H, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 4.14 (m, 1H, HNCHCOOH), 4.21 (t, 1H, <sup>3</sup>J=7.0 Hz, OCH<sub>2</sub>CH), 4.34 (d, 2H, <sup>3</sup>J=7.0 Hz, OCH<sub>2</sub>CH), 7.30 (dt, 2H, <sup>3</sup>J=1.2 Hz, <sup>3</sup>J=7.7 Hz,

AA'BB'), 7.36–7.40 (m, 2H, AA'BB'), 7.64–7.69 (m, 2H, AA'BB'), 7.78 (d, 2H,  $^3J=7.5$  Hz, AA'BB').

$^{13}\text{C-NMR}$  (125.7 MHz,  $\text{D}_4\text{-MeOH}$ ):  $\delta = 22.6$  (s,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 27.0 (s,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 27.1 (s,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 28.2 (p,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 30.5 (s,  $\text{OCCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 30.6 ( $\text{OCCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 38.4 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$ ), 38.7 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$ ), 39.5 (s,  $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 46.7 (t,  $\text{OCH}_2\text{CH}$ ), 53.6 (t,  $\text{HNCHCOOH}$ ), 66.3 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}$ ), 68.9 (s,  $\text{Boc-HNCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 69.4 (t,  $\text{OCH}_2\text{-CH}_2\text{O}$ ), 69.5 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 69.6 (s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2$ ), 78.4 (q,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 119.3 (t,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 124.6 (t,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 126.5 (t,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 127.1 (t,  $\text{CH}_{\text{aryl}}$ ), 140.9 (q,  $\text{C}_{\text{aryl}}$ ), 143.5 (q,  $\text{C}_{\text{aryl}}$ ), 156.7 (q,  $\text{Boc-CO}$ ), 157.0 (q,  $\text{Fmoc-CO}$ ), 172.9 (q,  $\text{HNCOCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ), 173.1 (q,  $\text{HNCOCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$ ), 174.3 (q,  $\text{COOH}$ ).

**IR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu} = 3320, 3068, 2932, 2870, 1700, 1660, 1539, 1450, 1421, 1391, 1366, 1342, 1252, 1205, 1175, 1134, 1105, 861, 830, 799, 761, 741$ .

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 599.3 (18,  $[\text{M}+\text{H}-\text{Boc}]^+$ , berechnet 599.3), 699.3 (100,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , berechnet 699.4), 721.3 (35,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , berechnet 721.3).

**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 699.35975, monoisotopische Masse berechnet für das Kation  $\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{O}_{10}\text{N}_4^+$  699.35997.

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +9.13 \pm 0.09$  ( $c = 1$ ; MeOH).

**analytische HPLC:**  $t_R$  (%) = 38.3 min (95).

## 6.6.2 Peptidsynthese-Protokoll

### Beladung des 2-Chlortritylharzes mit Fmoc-Glycin

2.0 Äquivalente (relativ zur Beladungskapazität des Harzes) der Aminosäure Fmoc-Glycin werden in trockenem DCM gelöst (10 ml/g Harz). Zur vollständigen Lösung

der AS ist oftmals eine kleine Menge DMF notwendig. Diese Lösung wird zusammen mit 2.0 Äquivalenten DIPEA (relativ zur Beladungskapazität) dem Harz schnell zugefügt und 5 min lang bei RT geschüttelt. Dann werden weitere 3.0 Äquivalente DIPEA hinzugefügt und die Reaktionsmischung wird 2 h lang bei RT geschüttelt. Anschließend wird MeOH (1 ml/g Harz) hinzugefügt und weitere 15 min lang geschüttelt. Das Harz wird auf eine D4-Filterfritte übergeführt und dreimal mit DCM, dreimal mit DMF, zweimal mit DCM und dreimal mit MeOH gewaschen. Nach der Beladungsbestimmung wird die Fmoc-Schutzgruppe für die Lagerung entfernt.<sup>[19, 123, 124]</sup>

### Beladungsbestimmung

In zwei UV-Meßküvetten werden jeweils 1–2 mg des gut getrockneten Harzes eingewogen. Zu diesen werden jeweils 3 ml einer 25%igen Piperidin/DMF-Lösung gegeben. Nach 30 min wird die Absorption gegen eine Referenzküvette, die mit einer 25%igen Piperidin/DMF-Lösung gefüllt ist, gemessen. Die Beladung des Harzes läßt sich nach Gleichung 6.1 bestimmen.<sup>[125]</sup>

$$z = \frac{A \cdot X}{\varepsilon \cdot Y \cdot l} \quad (6.1)$$

$X$ : Volumen in ml

$\varepsilon$ : 5800  $\frac{l}{mol \cdot cm}$  bei 590 nm

$Y$ : Einwaage Harz in mg

$l$ : Länge der Küvette in cm

$z$ : Beladung in mmol/g

$A$ : Absorption

### Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe

waschen	2× DMF	4 ml	2 min
entschützen	25 % Piperdin/DMF	4 ml	5 min
waschen	DMF	4 ml	1 min
entschützen	25 % Piperidin/DMF	4 ml	10 min
waschen	2× DMF	4 ml	2 min
waschen	75 % Dioxan/Wasser	4 ml	1 min
waschen	4× DMF	4 ml	4 min

### Kuppeln der nächsten Aminosäure

waschen	2× DMF	4 ml	5 min
kuppeln	3.0 Äq. AS, 3.0 Äq. TBTU, 6.0 Äq. DIPEA, DMF	3 ml	45 min
waschen	3× DMF	4 ml	5 min
waschen	3× DCM	4 ml	5 min

### Abspalten vom Harz

Das Harz wird zweimal mit DCM gewaschen und danach wird eine Lösung aus 1,1,1,3,3,3-Hexafluorpropan-2-ol/DCM (1:4) hinzugegeben. Nach 1 h bei RT wird die Lösung anschließend abfiltriert und das Harz wird dreimal mit 4 ml DCM und dreimal mit 4 ml MeOH gewaschen. Der Abspaltungsprozeß wird noch zweimal wiederholt. Anschließend wird das Solvens unter vermindertem Druck destillativ entfernt.

### Cyclisierung in Lösung

Zu einer Lösung von 3.0 Äquivalente DIPEA in DMF ( $275 \mu\text{l}/\mu\text{mol}$ ) werden gleichzeitig mit einer Zweikanal-Spritzenpumpe zwei Lösungen bestehend aus 1.0 Äq. des

linearen, geschützten Peptids in DMF (160  $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ ) und 1.0 Äquivalenten HATU mit 1.0 Äquivalenten HOAt in DMF (160  $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ ) mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/h getropft. Nach Beendigung der Zugabe wird noch 2 h lang bei RT gerührt. Danach wird das Solvens entfernt.

### Entfernen der permanenten Schutzgruppen und Etherfällung

Das geschützte Peptid wird in TFA/Wasser/Triisopropylsilan 95 %/2.5 %/2.5 % gelöst und 2 h lang bei RT gerührt. Anschließend wird zu der Lösung  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kalter Diethylether (300  $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$  Peptid) gegeben. Das ausgefallene, entschützte Peptid wird bei  $4000\times g$  45 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Pellet wird in  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltem Diethylether resuspendiert und abermals zentrifugiert. Anschließend wird wiederum der Überstand abdekantiert, das Pellet wird in Wasser/ACN aufgenommen und lyophilisiert.

#### 6.6.3 Synthese von cyclischen RGD-Peptiden

##### c-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) P1

Das lineare Peptid H-Asp(OtBu)-D-Phe-Val-Arg(Pbf)-Gly-OH wird an 200 mg 2-Chlortritylharz (Beladung mit Glycin: 0.6 mmol/g) synthetisiert, abgespalten und in Lösung cyclisiert. Nach dem Entschützen wird das Rohprodukt mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

**Ausbeute:** 40 mg (69  $\mu\text{mol}$ , 57 %, Lit.<sup>[126]</sup> 30–40 %), farbloser Feststoff.

**Molmasse:** 574.67 g/mol

**Summenformel:**  $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_7\text{N}_8$

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 575.3 (100,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , berechnet 575.3).

**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 575.29282, monoisotopische Masse berechnet für das Kation  $C_{26}H_{39}O_7N_8^+$  575.29362.

**analytische HPLC:**  $t_R$  (%) = 25.6 min (100).

**präparative HPLC:**  $t_R$  = 26.4 min.

### c-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- $\beta$ -Ala-) P2

Das lineare Peptid H-Asp(OtBu)-D-Phe-Val- $\beta$ -Ala-Arg(Pbf)-Gly-OH wird an 200 mg 2-Chlortritylharz (Beladung mit Glycin: 0.6 mmol/g) synthetisiert, abgespalten und in Lösung cyclisiert. Nach dem Entschützen wird das Rohprodukt mittels präparativer RP-HPLC gereinigt.

**Ausbeute:** 23 mg (35  $\mu$ mol, 29 %, Lit.<sup>[127]</sup> 36 %), farbloser Feststoff.

**Molmasse:** 645.65 g/mol

**Summenformel:**  $C_{29}H_{43}O_8N_9$

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 646.4 (100,  $[M+H]^+$ , berechnet 646.4).

**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 646.32908, monoisotopische Masse berechnet für das Kation  $C_{29}H_{44}O_8N_9^+$  646.33074.

**analytische HPLC:**  $t_R$  (%) = 25.5 min (100).

**präparative HPLC:**  $t_R$  = 26.7 min.

### c-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys-) P3

Das lineare Peptid H-Asp(OtBu)-D-Phe-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Gly-OH wird an 200 mg 2-Chlortritylharz (Beladung mit Glycin: 0.6 mmol/g) synthetisiert, abgespalten und in Lösung cyclisiert. Nach dem Entschützen wird das Rohprodukt mittels präparativer RP-HPLC gereinigt. Das Produkt wird als Trifluoracetat erhalten.

**Ausbeute:** 18 mg (24  $\mu$ mol, 20 %, Lit.<sup>[128]</sup> 44 %), farbloser Feststoff.

**Molmasse:** 717.74 g/mol

**Summenformel:** C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>F<sub>3</sub>O<sub>9</sub>N<sub>9</sub>

**MS (MALDI-ToF, CHCA):**  $m/z$  (%) = 604.2 (100, [M+H]<sup>+</sup>).

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 604.3 (100, [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 604.3).

**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 604.32033, monoisotopische Masse berechnet für das Kation C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>7</sub>N<sub>9</sub><sup>+</sup> 604.32017.

**analytische HPLC:**  $t_R$  (%) = 15.8 min (100).

**präparative HPLC:**  $t_R$  = 17.2 min.

#### c-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys- $\beta$ -Ala-) P4

Das lineare Peptid H-Asp(OtBu)-D-Phe-Lys(Boc)- $\beta$ -Ala-Arg(Pbf)-Gly-OH wird an 200 mg 2-Chlortritylharz (Beladung mit Glycin: 0.6 mmol/g) synthetisiert, abgespalten und in Lösung cyclisiert. Nach dem Entschützen wird das Rohprodukt mittels präparativer RP-HPLC gereinigt. Das Produkt wird als Trifluoracetat erhalten.

**Ausbeute:** 29 mg (36  $\mu$ mol, 30 %), farbloser Feststoff.

**Molmasse:** 788.72 g/mol

**Summenformel:** C<sub>32</sub>H<sub>47</sub>F<sub>3</sub>O<sub>10</sub>N<sub>10</sub>

**MS (MALDI-ToF, CHCA):**  $m/z$  (%) = 675.6 (100, [M+H]<sup>+</sup>), 675.6 (100, [M+Na]<sup>+</sup>)

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 675.4 (100, [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 675.3).

**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 675.35710, monoisotopische Masse berechnet für das Kation C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>O<sub>8</sub>N<sub>10</sub><sup>+</sup> 675.35728.

analytische HPLC:  $t_R$  (%) = 18.7 min (100).

präparative HPLC:  $t_R$  = 21.6 min.

#### 6.6.4 Synthese modifizierter cyclischer RGD-Peptide

##### Methode 1

An 2-Chlortritylharz wird zunächst die lineare Peptidsequenz bis zur Aminosäure Fmoc-Lys(Dde)-OH **66** synthetisiert. Vor Entfernung der terminalen Fmoc-Schutzgruppe wird zunächst mit 4 ml 2 % Hydrazin in DMF innerhalb von 45 min die Dde-Schutzgruppe abgespalten. Dann werden 3.0 Äquivalente – bezogen auf die Beladung des Harzes – des Linkermoleküls **34** unter Verwendung von 3.0 Äquivalenten TBTU und 6.0 Äquivalenten DIPEA in 4 ml DMF mit der freien Aminogruppe des Lysins verknüpft. Anschließend wird die Peptidsynthese wie oben beschrieben fortgeführt.

##### Methode 2

Die lineare Peptidsequenz wird unter Verwendung der derivatisierten Aminosäure Fmoc-Lys(Linker-Boc)-OH **67** an 2-Chlortritylharz aufgebaut.

##### c-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(Linker)-) P5

Das lineare Peptid H-Asp(OtBu)-D-Phe-Lys(Linker)-Arg(Pbf)-Gly-OH wird an 200 mg 2-Chlortritylharz (Beladung mit Glycin: 0.6 mmol/g) synthetisiert, abgespalten und in Lösung cyclisiert. Nach dem Entschützen wird das Rohprodukt mittels präparativer RP-HPLC gereinigt. Das Produkt wird als Trifluoracetat erhalten.

**Ausbeute:** 15 mg (16  $\mu$ mol, 13 %), farbloser Feststoff.

**Molmasse:** 947.91 g/mol

**Summenformel:** C<sub>39</sub>H<sub>60</sub>F<sub>3</sub>O<sub>13</sub>N<sub>11</sub>

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 417.7 (100, [M+2H]<sup>2+</sup>, berechnet 417.5), 834.3 (20, [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 834.4).

**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 834.44603, monoisotopische Masse berechnet für das Kation C<sub>37</sub>H<sub>60</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub><sup>+</sup> 834.44683.

**analytische HPLC:**  $t_R$  (%) = 18.1 min (95).

**präparative HPLC:**  $t_R$  = 20.7 min.

### c-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(Linker)- $\beta$ -Ala-) P6

Das lineare Peptid H-Asp(OtBu)-D-Phe-Lys(Linker)- $\beta$ -Ala-Arg(Pbf)-Gly-OH wird an 200 mg 2-Chlortritylharz (Beladung mit Glycin: 0.6 mmol/g) synthetisiert, abgespalten und in Lösung cyclisiert. Nachdem Entschützen wird das Rohprodukt mittels präparativer RP-HPLC gereinigt. Das Produkt wird als Trifluoracetat erhalten.

**Ausbeute:** 35 mg (34  $\mu$ mol, 29 %), farbloser Feststoff.

**Molmasse:** 1019.06 g/mol

**Summenformel:** C<sub>42</sub>H<sub>65</sub>F<sub>3</sub>O<sub>14</sub>N<sub>12</sub>

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 453.1 (100, [M+2H]<sup>2+</sup>, berechnet 453.2), 905.3 (5, [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 905.5).

**MS (ESI-FT-ICR):**  $m/z$  gemessen 905.48522, monoisotopische Masse berechnet für das Kation C<sub>40</sub>H<sub>65</sub>O<sub>12</sub>N<sub>12</sub><sup>+</sup> 905.45394.

**analytische HPLC:**  $t_R$  (%) = 18.3 min (92).

**präparative HPLC:**  $t_R$  = 21.8 min.

## 6.7 SPR-Messungen

### 6.7.1 Bindung von MMP-2 an das immobilisierte Marimastat-Derivat 18

#### Activation of MMP-2

3.0  $\mu\text{L}$  einer frisch präparierten 25 mM 4-Aminophenylquecksilberacetat-Lösung in 0.1 mM NaOH werden mit 30  $\mu\text{L}$  MMP-2-Lösung (Calbiochem, Lot B41215), 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) gemischt und 2 h lang bei 37 °C inkubiert.

#### Immobilisierung des Marimastat-Derivates 18

Die Immobilisierung des Marimastat-Derivates **18** an den Sensorchip CM5 wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Fluß 5  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; Kontaktzeit 7 min; HBS-EP als Laufpuffer. Der Sensorchip wird zunächst mit dem EDC/NHS-Kupplungskit sowohl in der Meß- als auch in der Referenzzelle aktiviert. Dann wird eine 1.8 mM Lösung **18** in HBS-EP-Puffer in die Meßzelle injiziert. Die abschließende Desaktivierung mit Ethanolamin findet wieder in beiden Flußzellen statt. Das erreichbare Immobilisierungsniveau liegt im Bereich 40–60 RU.

#### Bindungsstudien

Zunächst wird ein „Prime“ des Systems mit MMP-Puffer A durchgeführt und die Flußgeschwindigkeit auf 20  $\mu\text{L min}^{-1}$  gesetzt. Es wird sowohl in die Meß- als auch in die Referenzzelle injiziert, wobei die Referenzsubtraktion aktiviert ist. Verschiedene Konzentrationen von MMP-2 in MMP-Puffer werden injiziert (Kap. 4.3.4). Die Regeneration der Chipoberfläche ist mit einer zweimaligen Injektion von HBS-EP-Puffer für jeweils 10 min möglich.

### Kompetition in Lösung

Eine konstante Konzentration einer MMP-2-Lösung wird für jeweils 30 min mit verschiedenen Konzentrationen von **18** in MMP-Puffer A auf Eis inkubiert und entsprechend nacheinander injiziert. Nach jeder Injektion wird die Chipoberfläche mit HBS-EP-Puffer wie oben beschrieben regeneriert.

#### 6.7.2 Bindung von ADAM9 an das immobilisierte Marimastat-Derivat 18

##### Bindungsstudien

Nachdem ein „Prime“ des Systems mit ADAM-Puffer durchgeführt wurde, wird die Flußgeschwindigkeit auf  $25 \mu\text{L min}^{-1}$  gesetzt. Es wird sowohl in die Meß- als auch in die Referenzzelle injiziert, wobei die Referenzsubtraktion aktiviert ist. Verschiedene Konzentrationen von ADAM-9 in ADAM-Puffer werden injiziert (s. Kap. 4.3.5). Die Chipoberfläche wird mit einer zweimaligen Injektion von 0.5 % (w/v) SDS für jeweils 5 min regeneriert. Dann wird 15 min lang mit Laufpuffer gespült. Da das im Laufpuffer vorhandene Zn(II)-ion an Carboxylgruppen der Chipmatrix bindet wird vor jeder neuen Messung noch eine 0.35 M EDTA-Lösung 5 min lang injiziert.

##### Kompetition in Lösung

Eine konstante Konzentration einer ADAM-9-Lösung wird jeweils 30 min lang mit verschiedenen Konzentrationen von **18** in ADAM-Puffer auf Eis inkubiert und entsprechend nacheinander injiziert. Nach jeder Injektion wird die Chipoberfläche wie oben beschrieben regeneriert.

### 6.7.3 Studien mit Plazentamembranextrakt

#### Immobilisierung von P5

Die Immobilisierung von cRGDfK(Linker) **P5** an den Sensorchip CM5 wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Fluß  $5 \mu\text{L min}^{-1}$ ; Kontaktzeit 7 min; Borat-Puffer als Laufpuffer. Der Sensorchip wird zunächst mit dem EDC/NHS-Kupplungskit sowohl in der Meß- als auch in der Referenzzelle aktiviert. Dann wird eine 10 mM Lösung **P5** in Borat-Puffer in die Meßzelle injiziert. Die abschließende Desaktivierung mit Ethanolamin findet wieder in beiden Flußzellen statt. Das erreichbare Immobilisierungsniveau liegt bei 240 RU.

#### Bindungsstudien mit Plazentamembranextrakt

Nachdem ein „Prime“ des Systems mit Integrin-Puffer B durchgeführt wurde, wird die Flußgeschwindigkeit auf  $30 \mu\text{L min}^{-1}$  gesetzt. Es wird sowohl in die Meß- als auch in die Referenzzelle injiziert, wobei die Referenzsubtraktion aktiviert ist. Verschiedene Verdünnungen des Plazentamembranextraktes in Integrin-Puffer B werden injiziert (s. Kap. 4.5.3). Die Chipoberfläche wird mit einer zweimaligen Injektion von Integrin Elutionspuffer B für jeweils 10 min regeneriert.

#### Kompetitionstudien in Lösung

Eine konstante Verdünnung des Plazentamembranextraktes wird für jeweils 30 min mit verschiedenen Konzentrationen von cyclischen RGD-Peptiden in Integrin-Puffer B auf Eis inkubiert. Diese werden dann entsprechend nacheinander injiziert. Nach jeder Injektion wird die Chipoberfläche wie oben beschrieben regeneriert.

## 6.8 Plazentapräparation

Eine bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefrorene humane Plazenta wird im Kühlschrank bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  über Nacht aufgetaut. Dann wird sie in kleine Stücke geschnitten und in einem handelsüblichen Küchenmixer mit 1 l MMP-Puffer A versetzt und zerkleinert. Anschließend wird die Suspension mit einem Homogenisator (Ultraturrox) behandelt. Die erhaltene Suspension wird 1 h lang bei  $25000\times g$  zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert (MMP-Fraktion I) und das Pellet wird anschließend in 200 ml MMP-Puffer A resuspendiert. Nach 1 h Zentrifugieren bei  $25000\times g$  wird der Überstand mit der MMP-Fraktion I vereinigt.

Das Pellet wird halbiert und die eine Hälfte wird in der 5–10fachen Volumenmenge des Pellets in Integrin Extraktionspuffer A (Plazentaembranextrakt A) resuspendiert. Die andere Hälfte wird in der 5–10fachen Volumenmenge des Pellets in Integrin Extraktionspuffer A (Plazentaembranextrakt A) aufgenommen. Beide Suspensionen werden dann über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Anschließend werden die Suspensionen bei  $25000\times g$  2 h lang zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und kann bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

## 6.9 Affinitätschromatographie

### 6.9.1 Beladen der Säule

Eine 1 ml HiTrap NHS-activated HP-Säule ( $10\text{ }\mu\text{mol/ml}$ , Pharmacia) wird zunächst mit eiskalter 1 mM Salzsäure gewaschen. Dann wird die Säule mit HBS-EP-Puffer äquilibriert ( $3\times 2\text{ ml}$ ). Anschließend wird 1 ml einer Marimastat-Derivat-Lösung (20 mM) **18** in HBS-EP-Puffer zugegeben und 2 h lang bei RT reagieren gelassen. Der Erfolg der Kupplung wird mittels analytischer RP-HPLC kontrolliert. Zur Desaktivierung der NHS-Ester, die nicht mit **18** reagiert haben, wird die Säule mit

MMP-Puffer A gewaschen. Nach 2 h waschen kann die Säule für die weiteren Experimente eingesetzt werden.

### 6.9.2 Auftragen der MMP-Fraktion I-Lösung

Die MMP-Fraktion I-Lösung (600 ml) wird mit einem Fluß von 1 ml/min unter Zuhilfenahme einer P1-Pumpe „Äkta-prime“ auf die Säule aufgetragen.

### 6.9.3 Waschen und Eluieren

Die Säule wird mit 30 ml MMP-Waschpuffer A gewaschen (Fluß 0.5 ml/min). Anschließend wird mit 30 ml HPS-EP-Puffer (Elution I) und dann noch einmal mit 30 ml MMP-Elutionspuffer A (Elution II) eluiert, wobei 10 ml Fraktionen genommen werden.

Anschließend werden sowohl die Elutionsdurchläufe als auch der Waschdurchlauf mit Zentrifugenkonzentratoren (YM-50) 20-fach aufkonzentriert.

## 6.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Herstellung der Gele wird zunächst die Trenngel-Lösung blasenfrei zwischen die zwei Glasplatten pipettiert, so daß diese 1.5 cm zum oberen Rand hin freibleiben. Die Lösung wird dann mit 2-Propanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wird das 2-Propanol entfernt und die Sammelgel-Lösung wird bis zur Plattenkante eingefüllt. Ein Probentaschenkamm (20  $\mu$ l pro Tasche) wird unverzüglich eingesetzt. Zur Gewährleistung einer vollständigen Polymerisation wird das Gel in zwei befeuchtete Tücher eingewickelt und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C belassen. Das polymerisierte Gel wird nach Entfernen des Kammes in die Elektro-

phoreseapparatur eingesetzt und diese wird dann mit Elektrophoresepuffer befüllt, wobei die Probenaschen mit dem Puffer gründlich gespült werden.

Das APS wird erst unmittelbar vor der Polymerisation zugegeben. Vor dem Auftragen der Proteinproben werden diese zunächst mit einem Drittel des Volumens an 3fach-Probenpuffer versetzt und 10 min lang bei 95 °C inkubiert. Zur Konzentrierung der Proben in den Probenaschen wird die Elektrophorese zuerst 5 min lang bei 60 V durchgeführt. Dann wird die Spannung auf 100 V erhöht. Nach 15 min wird die Spannung zur Auftrennung der Proben auf 200 V eingestellt.

	10 % Trenngel	4 % Sammelgel
Wasser	4.1 ml	2.89 ml
Trenngelpuffer	2.5 ml	–
Sammelgelpuffer	–	1.26 ml
10 % SDS	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
40 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	2.5 ml	0.5 ml
TEMED	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
1.5 % APS	0.8 ml	0.3 ml
ingesamt (für 2 Gele)	10 ml	10 ml

### 6.10.1 Coomassie Brilliant Blue-Färbung

Nach der Elektrophorese wird zunächst das Sammelgel entfernt. Dann wird das Trenngel in Fixierer-Lösung 30 min lang vorsichtig geschwenkt. Anschließend wird das Gel zweimal mit Wasser gewaschen und dann mit Coomassie-Lösung (ca. 100-200 ml) versetzt. Nach 2 h wird das Gel mehrmals mit Wasser gewaschen und über Nacht auf einem Horizontalschüttler bewegt.<sup>[129]</sup>

### 6.10.2 Silberfärbung

Nach der Elektrophorese wird das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel wird 20 min lang in Fixierer-Lösung bewegt. Anschließend wird das Gel zweimal für jeweils 10 min mit Wasser gewaschen. Zum Färben des Gels werden zunächst 5 ml Silberkomplex-Lösung, 5 ml Moderator und 5 ml Entwickler mit 35 ml Wasser gemischt. Die Lösung wird unmittelbar vor Beginn des Färbeprozesses zu 50 ml Beschleuniger-Lösung gegeben. Das Gel wird dann solange entwickelt, bis die entsprechenden Banden die gewünschte Intensität erreicht haben. Zum Beenden des Entwicklungsprozesses wird das Gel in 50 ml Stopp-Lösung übergeführt.

## Literaturverzeichnis

- [1] S. Nock, P. Wagner, *Chemie in unserer Zeit* **2000**, *34.6*, 348–354.
- [2] M. J. Hubbard, *Proteomics* **2002**, *2*, 1069–1078.
- [3] D. Figeys, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 413–419.
- [4] F. Lottspeich, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2630–2647.
- [5] J. D. Thomas, R. A. VanBogelen, *A Trends Guide Juli 2000*, S. 7–11.
- [6] D. Greenbaum, K. Medzihradzky, A. Burlingame, M. Bogyo, *Chemistry and Biology* **2000**, *7*, 569–581.
- [7] M. J. Page, B. Amess, C. Rohlf, C. Stubberfield, R. Parekh, *Drug Discovery Today* **1999**, *4.2*, 55–64.
- [8] H. Wang, S. Hanash, *J. Chromatogr., B* **2003**, S. 11–18.
- [9] Y. Liu, P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14694–14699.
- [10] L.-C. Lo, T.-L. Pang, C.-H. Kuo, Y.-L. Chiang, H.-Y. Wang, J.-J. Lin, *J. Proteome Research* **2002**, *1*, 35–40.
- [11] G. C. Adams, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Molecular and Cellular Proteomics* **2002**, *1*, 781–790.

- [12] M. C. Hagenstein, J. H. Mussnug, K. Lotte, R. Plessow, A. Brockhinke, O. Kruse, N. Sewald, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5793–5797.
- [13] M. Vidal, *Cell.* **2001**, *104*, 333–339.
- [14] H. Ge, A. J. Walhout, M. Vidal, *Trends Genet.* **2003**, *19*, 551–560.
- [15] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley-VCH, Weinheim **2002**.
- [16] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [17] G. B. Fields, R. L. Noble, *J. Peptide Protein Res.* **1989**, *35*, 161–214.
- [18] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748–5749.
- [19] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, Y. Wenging, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943–3950.
- [20] E. Y. Jones, K. Harlos, M. J. Bottomley, R. C. Robinson, P. C. Driscoll, R. M. Edwards, J. M. Clements, T. J. Dudgeon, D. I. Stuart, *Nature* **1995**, *373*, 539–544.
- [21] R. O. Hynes, *Cell* **1992**, *69*, 11–25.
- [22] J. M. D. Pereda, G. Wiche, R. C. Liddington, *EMBO J.* **1993**, *18*, 4087–4095.
- [23] J. Takagi, T. A. Springer, *Immunological Reviews* **2002**, *186*, 141–163.
- [24] R. O. Hynes, *Cell* **2002**, *110*, 673–687.
- [25] R. C. Casey, K. M. Bursleson, K. M. Skubitz, S. E. Pambuccian, T. R. Oegema, L. E. Ruff, A. P. N. Skubitz, *Am. J. Pathol.* **2001**, *159*, 2071–2080.
- [26] G. Peltz, *Leukocyte recruitment in inflammatory disease*, Springer-Verlag, Heidelberg **1996**.

- [27] B. Felding-Habermann, *Clinical and Experimental Metastasis* **2003**, *20*, 203–213.
- [28] J. A. Eble, K. Kühn, *Integrins - A versatile and old family of cell adhesion molecules in integrin-ligand interaction*, Springer-Verlag, Heidelberg **1997**.
- [29] E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697–715.
- [30] P. Schaffner, M. M. Dard, *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 119–132.
- [31] C. S. Elangbam, C. W. Q. jun., R. R. Dahlgren, *Vet. Pathol.* **1997**, *34*, 61–73.
- [32] F. G. Giancotti, E. Ruoslahti, *Science* **1999**, *285*, 1028–1032.
- [33] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461–7472.
- [34] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17294–17301.
- [35] N. Ass-Munt, X. Jia, P. Laakkonen, E. Ruoslahti, *Biochemistry* **2001**, *40*, 2373–2385.
- [36] M. Gurrath, G. Müller, M. Aumailly, R. Timpl, H. Kessler, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911–921.
- [37] M. Pfaff, K. Tangemann, M. Gurrath, B. Müller, R. Timpl, J. Engel, H. Kessler, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20233–20238.
- [38] S. Strömblad, D. A. Cheresh, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 881–886.
- [39] M. Yamamoto, J. E. Fisher, M. Gentile, J. G. Sedor, C. T. Leu, S. B. Rodan, G. A. Rodan, *Endocrinology* **1998**, *139*, 1411–1420.
- [40] V. Kähäri, U. Saarialho-Kere, *Ann. Med.* **1999**, *31*, 34–45.

- [41] H. Birkedahl-Hansen, W. G. Moore, M. K. Bodden, L. J. Windsor, B. Birkedahl-Hansen, A. Decarlo, J. A. Engler, *Crit. Rev. Oral. Med.* **1993**, *4*, 197–250.
- [42] T. G. Wolfsberg, P. Primakoff, D. G. Myles, J. M. White, *J. Cell Biol.* **1995**, *2*, 275–278.
- [43] H. Birkedahl-Hansen, *Curr. Opin. Cell. Biol.* **1995**, *7*, 728–735.
- [44] E. B. Springman, E. L. Angleton, H. Birkedahl-Hansen, H. E. V. Wart, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 364–368.
- [45] H. E. V. Wart, H. Birkedahl-Hansen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 5578–5582.
- [46] F. Blasi, M. P. Stoppelli, *Biochim. Biophys. Act.* **1998**, *1423*, 35–44.
- [47] R. Hirayama, M. Yamamoto, T. Tsukida, K. Matsuo, Y. Obata, F. Sakamoto, S. Ikeda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *5*, 765–778.
- [48] D. E. Levy, F. Lapierre, W. Liang, C. W. Lange, X. Li, D. Grobelny, M. Casabonne, D. Tyrrel, K. Holme, A. Nadzan, R. E. Galardy, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 199–223.
- [49] A. Amour, C. G. Knight, W. R. English, A. Webster, P. M. Slocombe, V. Knäuper, A. J. P. Docherty, J. D. Becherer, C. P. Blobel, G. Murphy, *FEBS Letters* **2002**, *524*, 154–158.
- [50] M. L. Moss, J. M. White, M. H. Lambert, R. C. Andrews, *Drug Discovery Today* **2001**, *6*, 417–426.
- [51] G. W. H. Cai, T. A. Brodie, S. Higashyama, K. Manova, T. Ludwig, C. P. Blobel, *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 1537–1544.

- [52] U. Schlomann, D. Wildeboer, A. Webster, O. Antropova, D. Zeuschner, C. G. Knight, A. J. P. Docherty, M. Lampert, L. Skelton, H. Jockusch, J. W. Bartsch, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 48210–48219.
- [53] M. Roghani, J. D. Becherer, M. L. Moss, R. E. Atherton, H. Erdjument-Bromage, J. Arribas, R. K. Blackburn, G. Weskamp, P. Tempst, C. P. Blobel, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 3531–3540.
- [54] N. M. Hooper, E. H. Karran, A. J. Turner, *Biochem. J.* **1997**, *321*, 265–279.
- [55] X. P. Zhang, T. Kamata, K. Yokoyama, W. Puzon-McLaughlin, Y. Takada, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 7345–7350.
- [56] D. Nath, P. M. Slocombe, P. E. Stephens, A. Warn, G. R. Hutchinson, K. M. Yamada, A. J. P. Docherty, G. Murphy, *J. Cell. Sci.* **1999**, *112*, 579–587.
- [57] H. S. Rasmussen, P. P. Cann, *Pharmacol. Ther.* **1997**, *75*, 69–75.
- [58] M. Whittaker, C. D. Floyd, P. Brown, A. J. H. Gearing, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2735–2776.
- [59] K. Burger, E. Windeisen, R. Pires, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7641–7645.
- [60] F. Weygand, K. Burger, *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 2880–2884.
- [61] E. Windeisen, Dissertation, Technische Universität München **1993**.
- [62] M. Yamamoto, H. Tsujishita, N. Hori, Y. Ohishi, S. Inoue, S. Ikeda, Y. Okada, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1209–1217.
- [63] B. E. Tomczuk, M. R. Gowravaram, J. S. Johnson, D. Delecki, E. R. Cook, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 343–348.
- [64] L. S. Hung, C. T. Campbell, T. Chinokowsky, M. N. Nar, S. S. Yee, *Langmuir* **1998**, *14*, 5636–5648.

- [65] C. E. H. Berger, T. Beumer, R. Kooyman, J. Greve, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 703–706.
- [66] D. G. Myszka, R. L. Rich, *Pharmaceutical Science + Technology Today* **2000**, *3*, 310–317.
- [67] H. Sota, Y. Hasegawa, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2019–2024.
- [68] J. Lahiri, L. Isaacs, J. Tien, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 777–790.
- [69] F. Kotzyba-Hilbert, I. Kapfer, M. Goeldner, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1391–1408.
- [70] G. Dorman, G. D. Prestwich, *Trends in Biotechnology* **2000**, *18*, 64–77.
- [71] G. Dorman, G. D. Prestwich, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5661–5673.
- [72] D. G. Griffiths, M. D. Partis, R. N. Sharp, R. B. Beechey, *FEBS Lett.* **1981**, *134*, 261–263.
- [73] O. Keller, J. Rudinger, *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*, 531–541.
- [74] W. Skorianetz, G. Ohloff, *Helv. Chim. Acta* **1973**, *56*, 2025–2032.
- [75] K. Jenssen, K. Sewald, N. Sewald, *Bioconj. Chem.* **2004**, *15*, 594–600.
- [76] K. Jenssen, *Diplomarbeit: Neue Synthese und Immobilisierung eines Hydroxamatsuccinyl Matrixmetalloproteinase-Inhibitors*, Universität Bielefeld **2001**.
- [77] K. Mori, H. Iwasawa, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 87–90.
- [78] M. Pirrung, H. Hang, D. Nunn, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2423–2429.
- [79] J. M. Humphrey, A. R. Chamberlin, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243–2264.

- [80] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927–1930.
- [81] L. Halab, W. D. Lubell, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3312–3321.
- [82] S. Nozaki, I. Muramatsu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 2646–2648.
- [83] J. Dickens, M. J. Crimmen, P. R. Beckett, *British Biotechnology Ltd., PCT Patent Application WO 9402447 A1 19940203*, **1994**.
- [84] R. J. Davenport, R. J. Watson, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7983–7986.
- [85] P. D. Beer, J. Cadman, J. M. Lloris, R. Martinez-Manez, J. Soto, T. Pardo, D. Marcos, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **200**, S. 1805–1812.
- [86] A. P. Krapcho, C. S. Kuell, *Synth. Commun.* **1990**, *20*, 2559–2564.
- [87] B. C. Roy, S. Mallik, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2969–2974.
- [88] P. Wipf, H. Heimgartner, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 140–154.
- [89] E. Felder, D. Pitre, S. Boverly, *Helv. Chim. Acta* **1969**, *52*, 329–333.
- [90] S. W. Jeong, D. F. O'Brien, *J. Org. Chem.* **2002**, *66*, 4799–4802.
- [91] D. Boumrah, M. M. Campbell, S. Fenner, R. G. Kinsman, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6977–6992.
- [92] L. A. Carpino, H. Imazumi, B. M. Foxman, M. J. Vela, P. Henklein, A. El-Faham, J. Klose, M. Bienert, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2253–2256.
- [93] J. E. Sheppeck, H. Kar, H. Hong, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5329–5333.
- [94] BIAcore, *BIAcore System 3000 Manual*, Upsala Schweden **2000**.
- [95] J. C. Kauert, S. Erickson-Viitanen, H. R. Wolfe, W. F. DeGrado, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 10695–10700.

- [96] G. F. Sigler, W. D. Fuller, *Biopolymers* **1983**, *22*, 2159–2162.
- [97] I. A. Nash, B. W. Bycroft, W. C. Chan, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2625–2628.
- [98] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell, *Chem. Commun.* **1994**, S. 2259–2260.
- [99] A. Ehrlich, H.-U. Heyne, R. Winter, M. Beyermann, H. H. M. Bienert, L. A. Carpino, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8831–8838.
- [100] M. Malesevic, U. Strijowski, D. Bächle, N. Sewald, *J. Biotechnol.* **2004**, *im Druck*.
- [101] D. Zimmermann, Dissertation, Universität Bielefeld **2004**.
- [102] F. Schumann, A. Müller, M. Kokschi, G. Müller, N. Sewald, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12009–12010.
- [103] T. Schulz, *Diplomarbeit: Strategien zur Reinigung des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  durch Affinitätschromatographie*, Universität Bielefeld **2003**.
- [104] M. Kantlehner, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 587–590.
- [105] J. Lee, J. H. Griffin, T. I. Nicas, *KJ. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3983–3986.
- [106] P. Gomez-Martinez, M. Dessolin, F. Guibe, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1999**, *1*, 2871–2874.
- [107] S. A. Kates, N. A. Sole, C. R. Johnson, D. Hudson, G. Barany, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1549–1552.
- [108] A. Loffet, H. X. Zhang, *Int. J. Peptide Res.* **1993**, *42*, 346–351.

- [109] C. M. Stevens, R. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 725–727.
- [110] J. A. Eble, F. Berditchevski, *Methods in Cell Biology* **2002**, *69*, 223–246.
- [111] J. G. Guoth, I. Sohar, M. Zarandi, T. Janaky, A. V. Schally, *Preparative Biochemistry* **1988**, *18*, 361–374.
- [112] K. Newman, A. M. Malon, R. D. Shin, J. V. Scholes, W. G. Ramey, M. D. Tilson, *Connective Tissue Res.* **1994**, *30*, 265–276.
- [113] H. Tschesche, H. W. MacCartney, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1981**, *362*, 1523–1531.
- [114] K. Shimokawa, H. Nagase, *Meth. Molecular Biol.* **2001**, *151*, 275–304.
- [115] T. Kobayashi, T. Nishikawa, S. Hattori, N. Yoshida, T. Takagi, H. Watanabe, H. Hori, Y. Nagai, *Protein Expression Purif.* **2001**, *22*, 45–51.
- [116] M. Pieper, M. Betz, N. Budisa, F.-X. Gomis-Rüth, W. Bode, H. Tschesche, *J. Protein Chem.* **1997**, *16*, 637–650.
- [117] V. M. Belkin, A. M. Belkin, V. E. Koteliansky, *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 2159–2170.
- [118] W. Moore, C. A. Spilburg, *Biochemistry* **1986**, *25*, 5189–5195.
- [119] M. Friedlander, P. C. Brooks, R. W. Shaffer, C. M. Kincaid, J. A. Varner, D. A. Cheresh, *Science* **1995**, *270*, 1500–1502.
- [120] M. Kantlehner, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, G. Hölzemann, S. L. Simon, B. Nies, H. Kessler, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 107–114.

- [121] J. C. Cheronis, E. T. Whalley, K. T. Ngyuen, S. R. Eubanks, L. G. Allen, M. J. Duggan, S. D. Loy, K. A. Bonham, J. K. Blodgett, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1563–1572.
- [122] T. Ye, M. A. McKervey, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 8013–8014.
- [123] Advanced Chemtech, *Handbook of combinatorial, organic and peptide chemistry*, Cambridge, United Kingdom **2003–2004**.
- [124] K. Barlos, D. Gatos, I. Kallitsis, D. Papaioannou, P. Sotiriu, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, S. 1079–1081.
- [125] Fluka Chemie GmbH, *Peptide and peptidomimetics synthesis*, Buchs **2000**.
- [126] J. Wermuth, S. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1328–1335.
- [127] A. Müller, Dissertation, Universität Leipzig **1999**.
- [128] R. Haubner, W. Schmitt, G. Hölzemann, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7881–7891.
- [129] C. R. Merrill, D. Goldman, S. A. Sedman, J. H. Ebert, *Science* **1981**, *211*, 1437–1438.