

**Semisyntese von  
*reactive site-* und *backbone-*Varianten  
des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors**

**Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Universität Bielefeld**

**vorgelegt von  
Michael Deitermann**

**Bielefeld  
2000**



Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Februar 1995 bis Dezember 1999 in den Laboratorien der Fakultät für Chemie an der Universität Bielefeld durchgeführt.

Die Arbeit stand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Tschesche, dem ich für das interessante Thema und die großzügige Unterstützung meiner Arbeit danken möchte.

Für zahlreiche Ratschläge und Diskussionen danke ich Herrn Dr. H.R. Wenzel und Dr. C. Groeger sowie meinen Laborkollegen Herrn D. Krumme, Herrn K. Reiche und Herrn T. Fischer.

Den Praktikanten Herrn T. Kühler, Herrn D. Vos, Herrn U. Strijowski, Herrn H. Schulz, Herrn H. Wartig, Herrn A. Bockholt, Herrn S. Kleinebekel und Frau M. Buchholz danke ich für die von ihnen erbrachte Leistung im Rahmen ihres sechswöchigen Blockpraktikums.

Gedankt sei weiterhin Frau S. Klösener, Frau S. Grabolle und Herrn M.-O. Luther für die Durchführung von Sequenzanalysen, Herrn G. Lipinski und Herrn K.P. Mester für die Messung zahlreicher NMR-Spektren, den Mitarbeitern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. H.F. Grützmaker für die Aufnahme der MS-Spektren, sowie Herrn Dr. A. Mehlich und Herrn Dr. H. Sievers für die Erstellung der Ionenspray- bzw Maldi-Massenspektren.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Doris, meinen Eltern und allen Freunden, ohne deren Unterstützung die Entstehung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.



## 1. Einleitung und Aufgabenstellung

1.1. Abkürzungen	1
Allgemein	1
Aminosäuren	2
Peptidanaloga	2
TKI-Derivate	3
1.2 Einleitung	4
1.3 Zielsetzung	6
1.4 Zusammenfassung	7

## 2. Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse

2.1 Darstellung von Inhibitorfragmenten	9
2.2 Einbaustrategien	10
2.2.1 Austausch der P'-Positionen durch enzymatisch-chemische Semisynthese	10
2.2.2 Austausch der P <sub>1</sub> -Aminosäure und der P' <sub>1</sub> und P' <sub>2</sub> -Aminosäuren	11
2.2.3 Austausch von P'-Aminosäuren durch chemische Semisynthese	14
2.2.4 Chemisch-enzymatischer Austausch von P'-Aminosäuren durch pH-gesteuerte Acylierung.	15
2.2.5 Chemischer Austausch von P- oder P'-Aminosäuren durch pH-gesteuerte Acylierung	16
2.3 Semisynthesen und Hemmtests	18
2.3.1 Vergleich von [Gly <sup>16</sup> , Gly <sup>17</sup> ]TKI, [Doa <sup>15</sup> , Gly <sup>16</sup> , Gly <sup>17</sup> ]TKI und [Dcl <sup>15</sup> , Gly <sup>16</sup> , Gly <sup>17</sup> ]TKI	18
2.3.2 Die Ketomethylenfunktion als Ersatz für die <i>reactive site</i> -Bindung	23
2.3.3 [N-Me-Ava <sup>16,17</sup> ]TKI im Vergleich zu [N-Me-Ala <sup>16</sup> ]TKI und [Ava <sup>16,17</sup> ]TKI	30
2.3.4 Semisynthese von $\alpha$ -Ketoamid-TKI und $\alpha$ -Hydroxyamid-TKI	34
2.3.5 Semisynthese von [ $\alpha$ -Me-Ala <sup>16</sup> ]TKI und [ $\alpha$ -Hbs <sup>16</sup> ]TKI	37
2.3.6 Hemmeigenschaften der <i>backbone</i> -Derivate des TKI gegen Kallikrein	43
2.4 Analytik von TKI-Derivaten	48
2.4.1 HPLC	47
2.4.2 Massenspektrometrie	49

## 3. Experimenteller Teil

3.1 Semisynthesen	50
-------------------	----

Geräte	50
Materialien	51
Präparative Trennverfahren	52
HPLC	52
3.1.1 Darstellung von TKI-Fragmenten	53
TKI*	53
Des(Ala <sup>16</sup> )TKI*	53
Des(Ala <sup>16</sup> , Arg <sup>17</sup> )TKI*	54
Des(Ala <sup>16</sup> )TKI*(Me) <sub>6</sub> und Des(Ala <sup>16</sup> , Arg <sup>17</sup> )TKI*(Me) <sub>6</sub>	54
Hydrolyse des Lys <sup>15</sup> Methylesters in Des(Ala <sup>16</sup> )TKI*(Me) <sub>6</sub> oder Des(Ala <sup>16</sup> , Arg <sup>17</sup> )TKI*(Me) <sub>6</sub>	54
Abspaltung von Lys <sup>15</sup> in Des(Ala <sup>16</sup> )TKI*(Me) <sub>5</sub> oder Des(Ala <sup>16</sup> , Arg <sup>17</sup> )TKI*(Me) <sub>5</sub>	55
3.1.2 Einbau von Aminosäurederivaten, Peptiden oder Peptidanaloga	55
Chemische Semisynthese	55
Enzymatisch-chemische Semisynthese	56
Chemisch-enzymatische Semisynthese	58
3.2 Organisch-chemische Synthesen	60
Allgemeines	60
3.2.1 [Gly <sup>16</sup> , Gly <sup>17</sup> ]TKI, [Doa <sup>15</sup> , Gly <sup>16</sup> , Gly <sup>17</sup> ]TKI und [Dcl <sup>15</sup> , Gly <sup>16</sup> , Gly <sup>17</sup> ]TKI	61
3.2.1.1 Darstellung von Diaminoheptansäure (Doa, Homolysin)	61
5-Brompentylphthalimid	61
2-Acetamido-2-carbethoxy-7-phthalimidoheptanonitril	61
2,7-Diaminoheptansäure-monohydrochlorid	62
3.2.1.2 Darstellung von Diaminooctansäure (Dcl)	63
6-Bromhexylphthalimid	63
2-Acetamido-2-carbethoxy-8-phthalimidooctylonitril	63
2,8-Diaminooctansäure-monohydrochlorid	64
3.2.1.3 Darstellung von Aminosäuremethylestern	64
Lysinmethylester	64
2,7-Diaminoheptansäuremethylester	65
2,8-Diaminooctansäuremethylester	65
3.2.1.4 Darstellung der Tripeptide	66
Z-Lysin(Z)-OH	66

Z-Doa(Z)-OH	66
Z-Dcl(Z)-OH	67
Boc-Gly-Gly-OH	67
Gly-Gly-O <sup>t</sup> Bu	68
Z-Gly-Gly-O <sup>t</sup> Bu	68
Gly-Gly-O <sup>t</sup> Bu · HCl	69
Z-Doa(Z)-Gly-Gly-O <sup>t</sup> Bu	69
Doa-Gly-Gly-O <sup>t</sup> Bu · HCl	70
Z-Dcl(Z)-Gly-Gly-O <sup>t</sup> Bu	70
Dcl-Gly-Gly-O <sup>t</sup> Bu · HCl	71
3.2.2 [Lys <sup>15</sup> Ψ[COCH <sub>2</sub> ]Gly <sup>16</sup> ]TKI	72
Bz-Lys(Z)-OH	72
Bz-Lys(Z)Ψ[COCH <sub>2</sub> ]Gly-OMe	73
LysΨ[COCH <sub>2</sub> ]Gly-OH · HCl	73
Boc-Lys(Boc)Ψ[COCH <sub>2</sub> ]Gly-OH	74
LysΨ[COCH <sub>2</sub> ]GlyO <sup>t</sup> Bu	74
Z-Phe-Lys(Z)-OMe	75
Z-Phe-Lys(Z)-OH	75
Z-Phe-Lys(Z)Ψ[COCH <sub>2</sub> ]Gly-OMe	76
Phe-LysΨ[COCH <sub>2</sub> ]Gly-OMe	76
Boc-Phe-Lys(Boc)Ψ[COCH <sub>2</sub> ]Gly-OH	77
Boc-Phe-Lys(Boc)Ψ[COCH <sub>2</sub> ]Gly-OSu	77
3.2.3 [N-Me-Ava <sup>16,17</sup> ]TKI	78
Boc-N-Me-Ava	78
Boc-N-Me-Ava-OSu	79
N-Me-Ava-O <sup>t</sup> Bu · HCl	79
Z-Lys(Z)-OSu	80
Z-Lys(Z)-N-Me-Ava-O <sup>t</sup> Bu	80
Lys-N-Me-Ava-O <sup>t</sup> Bu · HCl	81
3.2.4 α-Ketoamid-TKI und α-Hydroxyamid-TKI	81
Z,Z-Lysinal	81
Z-Lys(Z)Ψ[CHOH]-CN	82
Z-Lys(Z)Ψ[CHOH]-COOMe	83
Z-Lys(Z)Ψ[CHOH]-COOH	83

Boc-4-Abu-OH	84
4-Abu-O <sup>t</sup> Bu · HCl	84
Z-Lys(Z)Ψ[CHOH]-CO-4-Abu- <sup>t</sup> Bu	85
LysΨ[CHOH]-CO-4-Abu-O <sup>t</sup> Bu	86
<b>3.2.5 [α-Me-Ala<sup>16</sup>]TKI und [α-Hbs<sup>16</sup>]TKI</b>	<b>86</b>
Boc-α-Me-Ala	86
Boc-α-Me-Ala-OSu	87
α-Me-Ala-O <sup>t</sup> Bu	87
Z-Lys(Z)-α-Me-Ala-O <sup>t</sup> Bu	88
Lys-α-Me-Ala-O <sup>t</sup> Bu · HCl	89
α-Hbs-OMe	89
α-Hbs-OSu	90
Z-Lys(Z)-α-Hbs-O <sup>t</sup> Bu	90
Z-Lys(Z)-α-Hbs-OMe	91
Boc-Gly-OTMSE	91
Gly-OTMSE	92
α-Hbs-Gly-OTMSE	92
Z-Lys(Z)-α-Hbs-Gly-OTMSE	93
Lys- α-Hbs-Gly-OTMSE	93
<b>3.3 Hemmtests</b>	<b>95</b>
Geräte	95
Materialien	96
Trypsintest	96
Chymotrypsintest	96
Kallikreintest	96
<b>4. Literaturverzeichnis</b>	<b>98</b>

## 1.1 Abkürzungen

### Allgemein

Ac	Acetyl
AcO <sup>t</sup> Bu	Essigsäure-tert.-butylester
Apa	5-Amino-trans-3-pentensäure
APK	Aminopeptidase K
arom.	aromatisch
Ava	5-Aminovaleriansäure
BAPA	Bz-Arg-Nan
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
(Boc) <sub>2</sub> O	Di-tert.-butyldicarbonat
br.	breit
Brop	Brom-tris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat
BuOH	Butanol
Bz	Benzoyl
c	Konzentration
C'pase B	Carboxypeptidase B
C <sub>q</sub>	quartärer Kohlenstoff
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCHA	Dicyclohexylamin
Dcl	2,8-Diaminooctansäure (2,8-Diaminocaprylsäure)
DIBAH	Diisobutylaluminiumhydrid
DMAP	4-Dimethylamino-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Doa	2,7-Diaminoheptansäure (2,7-Diaminoenanthensäure)
DPPA	Diphenylphosphorylazid
DSC	Di-(N-succinimidyl)-carbonat
EAACA	Ethyl-acetaminocyanoacetat
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Et	Ethyl
EtOAc	Ethylacetat
Fp	Festpunkt
HBs	α-Hydroxyisobuttersäure

HOAc	Essigsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	N-Hydroxysuccinimid
HOTMSE	2-(Trimethylsilyl)-ethanol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kp	Kochpunkt
Lsg.	Lösung
m	Multipllett
M	Molekulargewicht
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MMS	Monomethylsuccinat
MS	Massenspektrum
mU	nmol Substratumsatz/min
Nan	4-Nitroanilid
PEG	Polyethylenglycol
PTH	Phenylthiohydantoin
s	Singulett
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
<sup>t</sup> Bu	tert.-Butyl
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Tetramethylsilan
Tra	Triethanolamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Z-Cl	Chlorameisensäurebenzylester

### **Aminosäuren**

Aminosäuren werden mit Trivialnamen bzw. mit dem Drei- oder Ein-Buchstaben-Code bezeichnet (IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature, 1972).

### **Peptidanaloga**

Peptidanaloga werden in der psi-bracket-Schreibweise dargestellt (Spatola, 1983) oder werden mit ihren systematischen Namen bezeichnet.

**TKI-Derivate**

TKI	Trypsin-Kallikrein-Inhibitor
TKI*	"Modifizierter" Inhibitor (die Peptidbindung zwischen Lys <sup>15</sup> und Ala <sup>16</sup> ist hydrolysiert).
TKI*(Me) <sub>6</sub>	Alle freien Carboxylgruppen des TKI* sind mit Methanol verestert.
TKI*(Me) <sub>5</sub>	Alle freien Carboxylgruppen des TKI mit Ausnahme der an Lys <sup>15</sup> sind mit Methanol verestert.
Des(Ala <sup>16</sup> , Arg <sup>17</sup> )TKI*	Die in Klammern angegebenen Aminosäuren fehlen.
[Gly <sup>16</sup> , Gly <sup>17</sup> ]TKI	Die Aminosäuren 16 und 17 des TKI sind jeweils durch Glycin ersetzt.
[Gly <sup>16</sup> Ψ[XX]Gly <sup>17</sup> ]TKI	Die Positionen 16 und 17 des TKI sind durch ein vom GlyGly abgeleitetes Dipeptidanalogen ersetzt, [XX] steht für die veränderte Peptidbindung.
[Gly <sup>16</sup> Ψ[XX]Gly <sup>17</sup> ]TKI* <sup>(17,18)</sup>	Die Positionen 16 und 17 des TKI sind durch ein vom GlyGly abgeleitetes Dipeptidanalogen ersetzt und die Bindung Gly <sup>17</sup> -Ile <sup>18</sup> ist hydrolysiert.

## 1.2 Einleitung

Der Trypsin-Kallikrein-Inhibitor wurde 1930 von Kraut et al. entdeckt und bereits 1936 isoliert und kristallisiert (Kunitz & Northrop, 1936). Die tatsächliche Struktur des Inhibitors wurde aber erst durch Sequenzanalyse von Kassel et al. (1965) und zeitgleich von Anderer (1965) sowie durch Röntgenkristallstrukturanalyse von Huber et al. (1970) bestimmt (Tschesche, 1989). Das TKI-Molekül hat eine kompakte Raumstruktur, die durch eine ausgedehnte antiparallele  $\beta$ -Faltblattregion von Ile<sup>18</sup> bis Tyr<sup>35</sup> sowie zwei kurze  $\alpha$ -helikale Bereiche, Pro<sup>2</sup> bis Glu<sup>7</sup> und Ser<sup>47</sup> bis Gly<sup>56</sup>, bestimmt wird. Das aus 58 Aminosäuren bestehende Molekül hat annähernd birnenförmige Gestalt und wird durch drei Disulfidbrücken stabilisiert.

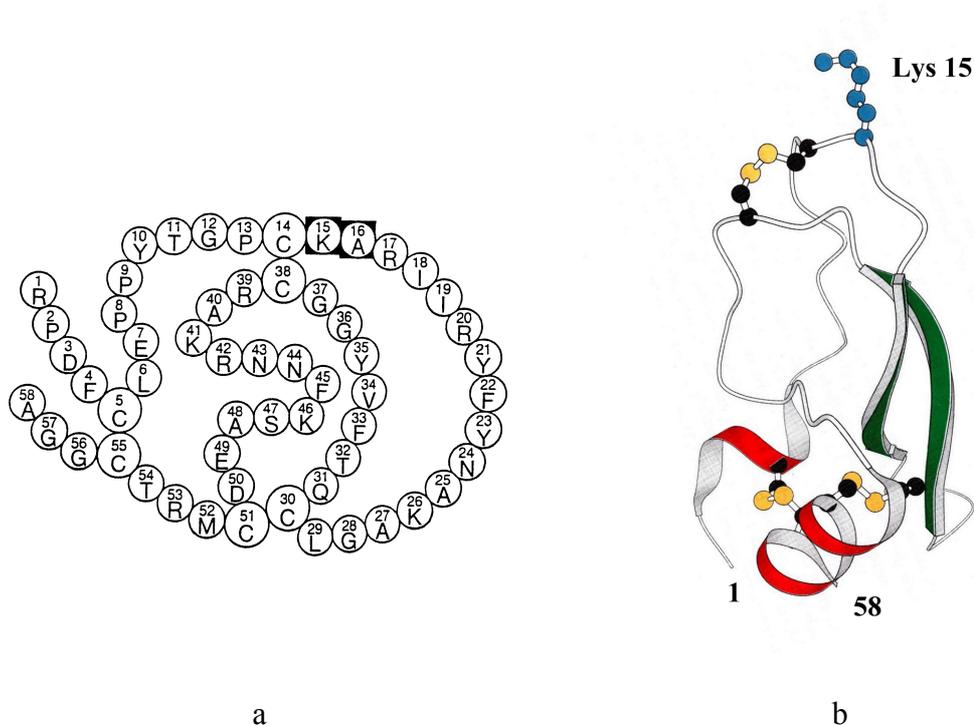


Abb. 1: Primärstruktur des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors (a) und schematische Darstellung (b) (nach Wlodawer et al. 1987).

Der Trypsin-Kallikrein-Inhibitor ist ein substratanaloger Proteinaseinhibitor. Die *reactive site*-Bindung  $P_1$ - $P'_1$  (Nomenklatur nach Schechter und Berger, 1967) des Inhibitors entspricht der zu spaltenden Bindung des Substrats (in Abb. 1 a schwarz markiert). Im Gegensatz zu Substraten bilden substratanaloge Inhibitoren mit dem Enzym einen stabilen Komplex, wobei die *reactive site*-Bindung nur sehr langsam gespalten wird. Auch der gespaltene Inhibitor verliert nicht die Befähigung mit dem Enzym zu komplexieren.

Darüberhinaus wird die hydrolysierte Bindung vom Enzym nach dem sogenannten Standardmechanismus (Laskowski & Kato, 1980) resynthetisiert. Röntgenstrukturanalysen von Rühlmann et al. (1973) und Huber et al. (1974) beschreiben die Wechselwirkungen im Enzym-Inhibitor-Komplex. Elf intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen, 2-3 charge transfer-Wechselwirkungen und über 200 Van der Waal's-Kontakte ermöglichen die feste Bindung zwischen Inhibitor und Proteinase, die durch eine extrem niedrige Dissoziationskonstante von  $6 \times 10^{-14}$  M (Vincent & Lazdunski, 1972) bzw.  $3 \times 10^{-13}$  M (Schnabel et al., 1986) zum Ausdruck kommt.

Neben Trypsin werden auch die Proteinasen Plasmin, Kallikrein und Chymotrypsin gehemmt, so dass man beim TKI von einem "polyvalenten" Inhibitor spricht.

Durch Austausch der spezifitätsbestimmenden Aminosäure Lys<sup>15</sup>, zunächst nach semisynthetischen (Jering & Tschesche, 1976b) und später nach rekombinanten Methoden (Auerswald et al., 1988), können Inhibitorhomologe mit völlig veränderten Hemmeigenschaften entstehen. Dass solche Varianten zu pharmakologisch interessanten Wirkstoffen führen können, zeigt das Beispiel des Val<sup>15</sup> TKI, welches ein spezifischer Inhibitor der Leukozyten-Elastase ist (Wenzel & Tschesche, 1981; Beckmann, 1987).

Durch den Austausch von Lys<sup>15</sup> durch entsprechende Aminosäuren mit verlängerten Seitenketten entstehen sogar Inhibitoren für Trypsin, deren Dissoziationskonstanten noch kleiner als die des nativen Inhibitors zu sein scheinen, was mit herkömmlichen Messmethoden aber nicht mehr nachweisbar ist (Groeger, 1994b).

Auch der Ersatz der Amidfunktion der potentiellen Spaltstellen in Inhibitoren und Enzymsubstraten ist Gegenstand aktueller Forschung (Lu et al., 1997a; Casimir et al., 1995). Durch das Einführen einer Ketomethylenfunktion als nicht enzymatisch spaltbare Einheit gelingt es einen relativ kleinen substratanaolgen Thrombininhibitor zu synthetisieren (Di Maio et al., 1991). Das Einbringen des Bausteins AlaΨ[COCH<sub>2</sub>]Gly in Position 15 und 16 des TKI führt allerdings nicht zu dem geplanten Elastase-Hemmstoff und dieses Derivat ist auch gegen andere Serinproteasen inhibitorisch nicht aktiv (Groeger, 1994b). Hier bleibt die Frage offen ob ein entsprechendes Lysin-Derivat, LysΨ[COCH<sub>2</sub>]Gly, in Position 15 und 16 des Inhibitors bessere Hemmeigenschaften aufweist oder sogar einen kovalenten Acyl-Enzym-Komplex durch Reaktion der Ketofunktion des Inhibitors mit der Hydroxylfunktion des Serin<sup>195</sup> im Trypsin ausbildet, wie er für kleinere peptidische Inhibitoren mit Methyl- und Halogenmethylketonderivaten in entsprechenden Protease-Inhibitor-Komplexen bereits nachgewiesen wurde (McMurray & Dykes, 1986).

Kovalente Bindungen zwischen Serinproteasen und peptidischen Inhibitoren sind auch durch Beispiele aus der Natur bekannt. So werden immer wieder biologisch aktive meist cyclische Peptide aus maritimen Lebewesen und Pflanzen isoliert, die unter anderem die Rolle von Proteaseinhibitoren übernehmen und zum Teil recht ungewöhnliche peptidanaloge Funktionselemente aufweisen. Eine der Ketomethylen verwandte Funktion ist die α-Ketoamidfunktion, bekannt aus dem cyclischen Peptid Cylotheonamid, welches aus einem maritimen Schwamm isoliert wurde (Fusetani et al., 1990) und dessen Peptidbackbone an

Stelle einer *reactive site*-Amidbindung dieses Element aufweist (Hagihara & Schreiber, 1992). Dieser Peptidinhibitor hemmt eine Reihe von Serinproteasen wie auch Trypsin mit einem  $K_d$  von  $2 \times 10^{-8}$  M (Ganesh et al., 1996), so dass es vorstellbar ist ein solches Strukturelement ins TKI zu übernehmen, um auf diese Weise einen kovalenten Proteinase-Inhibitor-Komplex zu erhalten. Ein peptidischer Thrombininhibitor mit kovalenter Bindung zwischen der  $\alpha$ -Ketofunktion und dem Enzym ist bereits bekannt (Krishnan et al., 1996).

Neben der  $P_1$ -Position der Proteinaseinhibitoren ist auch der Einfluss der P- und der P'-Region von großer Bedeutung. TKI-Homologe mit veränderten Aminosäuren in den P'<sub>1</sub>- und P'<sub>2</sub>-Positionen zeigen, abhängig von der Größe der Seitenketten der neu eingeführten Aminosäuren, eine zum Teil erheblich veränderte Inhibitorbandbreite (Groeger et al., 1991). Durch Veränderung des *backbone* und der Seitenketten in der P'-Region des TKI ist es möglich Informationen über die Wechselwirkungen im Kontaktbereich zwischen Enzym und Inhibitor zu gewinnen. Die meisten Wasserstoffbrücken bei der Protein-Protein-Wechselwirkung werden von der NH-Funktion als Donor und der CO-Funktion der backbone-Amidbindung als Akzeptor ausgebildet. Durch gezielte Variationen des *backbone*, wie Ersatz dieser Amidbindungen durch Ester-, Ketomethylen-, Ethylen-Bindungen oder Methylierung der Amidfunktion lassen sich die Beiträge einzelner Wechselwirkungen selektiv erfassen (Groeger, 1994b; Lu et al, 1997a).

Selektive Variationen von Proteinasen und ihren Inhibitoren und die Beobachtung der resultierenden Effekte, wie Änderung der Enzymaktivitäten bzw. Hemmeigenschaften, sind neben kinetischen Betrachtungen zu einem viel verwendeten Instrument der Mechanismenaufklärung in der Biochemie geworden. Ergänzt wird dieses durch zahlreiche Informationen aus Kristallstrukturen verschiedener Proteinase-Inhibitor-Komplexe (Bode & Huber, 1992; Ganesh et al, 1996), Struktur-Funktion-Beziehungen (Kowalski & Laskowski, 1976; Tschesche et al., 1987; Beckmann et al., 1988, 1989; Bigler et al., 1993; Bode & Huber 1994; Lu et al., 1997b; Song & Suh, 1998) und theoretischen Betrachtungen (Krystek et al., 1993; Denisov et al., 1995). Sie alle leisten einen Beitrag zum Verständniss enzymkatalysierter Reaktionen und substratanaloger Hemmung. Letztendlich konnten aber nicht alle Fragen geklärt werden.

### 1.3 Zielsetzung

Ein großer Beitrag zum besseren Verständniss der Wechselwirkungen zwischen Trypsin bzw-Kallikrein und dem Trypsin-Kallikrein-Inhibitor ist bereits geleistet worden (Groeger, 1994b). Allerdings bleiben noch Fragen offen, die es durch gezielte semisynthetische Variation der Kontaktregion des TKI zu klären gilt.

Zur Überprüfung einzelner Wechselwirkungen im Kontaktbereich der Enzym-Inhibitor-Komplexe sollen entsprechende Inhibitor-Derivate dargestellt werden, die zu einer

abschließenden Betrachtung dieses Enzym-Inhibitor-Systems führen sollen. Dazu sind geeignete Synthesestrategien zu entwickeln, die die Darstellung der für den Einbau in das Inhibitorfragment erforderlichen Peptide bzw. Peptidanaloga ermöglichen.

Die zur Verfügung stehenden semisynthetischen Strategien müssen dementsprechend weiterentwickelt und verfeinert werden.

Die Hemmeigenschaften dieser neu entwickelten TKI-Derivate gegenüber Trypsin und Kallikrein sollen abschließend bestimmt und mit dem Hemmverhalten einer Reihe von beschriebenen Strukturvarianten verglichen werden, um so das Verständnis der Funktion substratanaloger Inhibitoren zu ergänzen.

## 1.4 Zusammenfassung

Durch Optimierung und Kombination der bekannten semisynthetischen Methoden gelingt die Darstellung einer Reihe von Homologen und Derivaten des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors, die zur Klärung offen stehender Sachverhalte erheblich beitragen.

Sowohl mit Hilfe der präparativen organischen Chemie, als auch mit den Methoden der klassischen Peptidchemie, werden Synthesestrategien zur Darstellung verschiedener peptidanaloger Strukturelemente und nicht proteinogener Fragmente entwickelt, die den Bereich des Bindungsloops zwischen der P<sub>1</sub>- und der P'<sub>2</sub>-Aminosäure des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors ersetzen sollen.

Die Verlängerung der P<sub>1</sub>-Seitenketten des TKI und die gleichzeitige Kombination mit GlyGly als Ersatz der P'-Region gelingt, entgegen der zuvor zu erwartenden Kombination aus chemischem Einbau von Doa-OMe und anschließender enzymatisch-chemischer Semisynthese, ausschließlich durch den Einbau des Tripeptids Doa-Gly-Gly-O<sup>t</sup>Bu bzw. Dcl-Gly-Gly-O<sup>t</sup>Bu. Damit wird die früher vermutete, aber nicht nachweisbare Steigerung des Hemmverhaltens dieser Derivate, klar widerlegt. Durch das "schlechter" machen des Inhibitors reichen normale Messmethoden zum Nachweis der tatsächlichen Dissoziationskonstanten aus. Es stellt sich heraus, dass eine direkte Salzbrücke nicht ausgebildet wird, das Wassermolekül wird nicht verdrängt.

Die *reactive site*-Bindung war ebenfalls Ziel der semisynthetischen Veränderung. Durch entsprechende Derivatisierung sollten permanente TKI-Homologe mit nicht spaltbarer Bindung entstehen. Der Ersatz dieser Bindung durch Keto- bzw Ketoamidfunktion erinnert an aus der Natur bekannte Strukturen, die kovalente Bindungen mit Enzymen ausbilden können, die einem Acyl-Enzym-Komplex ähnlich sind. Die Darstellung der Strukturelemente gelingt durch aufwendige Synthesebemühungen. Diese Peptidmimetika erweisen sich bei der Semisynthese als nicht einbaubar. Mit zunehmender Größe der einzubauenden Spezies bzw. abnehmender peptidischer Strukturähnlichkeit des Inserts wird die Integration in das vorbereitete Inhibitorfragment erschwert.

Erstmals gelingt es ein Derivat mit methylierter *reactive site*-Bindung in den Trypsin-Kallikrein-Inhibitor einzubringen. Frühere Bemühungen scheiterten am zu großen sterischen Anspruch einer Methylfunktion in dieser Position (Groeger 1994a), was sich aber durch die völlige Entfernung der Seitenketten im P'-Bereich kompensieren lässt. Die fehlende inhibitorische Aktivität dieses Derivates unterstreicht die komplexe Bedeutung dieser Bindung.

Die Methylierung von Ala<sup>16</sup> in der  $\alpha$ -Position führt zu [ $\alpha$ -Me-Ala<sup>16</sup>]TKI, welches dem nativen Inhibitor in der inhibitorischen Aktivität gleichkommt. Dieses dient als Ausgangspunkt für eine Estervariante mit sterisch nicht zugänglicher *reactive site*-Bindung. Die zusätzliche Methylfunktion erfüllt die an sie gestellten Ansprüche, nämlich gleichbleibende Akzeptanz vom Enzym bei gleichzeitiger sterischer Abschirmung der *reactive site*-Bindung.

Durch Entwicklung verschiedener *backbone*-Derivate des TKI mit systematischer Veränderung einzelner Wechselwirkungsmöglichkeiten lassen sich Übergänge zwischen substratanalogem Inhibitor und Enzymsubstrat charakterisieren und die energetischen Beiträge einzelner H-Brücken in den Systemen TKI-Trypsin und TKI-Kallikrein abschätzen. bzw. Aussagen über einzelne Wechselwirkung treffen.

Insgesamt konnten die hier vorgestellten TKI-Derivate wesentliche Aspekte der Funktionsweise substratanaloger Proteinase-Inhibitoren erhellen und damit das derzeitige Struktur-Funktions-Verständnis für diese Proteinklasse erheblich verbessern.

## 2. Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse

### 2.1 Darstellung von Inhibitorfragmenten

Voraussetzung für den semisynthetischen Einbau von verschiedenen Peptidanaloga in den Bindungsloop des TKI ist die Verfügbarkeit entsprechender Inhibitorfragmente. Schlüsselverbindung zur Darstellung dieser Fragmente ist der "modifizierte" Inhibitor mit hydrolysierter *reactive site*-Bindung, das TKI\*. Trypsin katalysiert die Spaltung dieser Bindung des nativen Inhibitors nur extrem langsam. Dieses Problem lässt sich lösen, indem man die Disulfidbrücke Cys<sup>14</sup>/Cys<sup>38</sup> selektiv mit Natriumborhydrid reduziert. Die *reactive site*-Bindung des Inhibitors wird dann rasch von Trypsin gespalten. Die *reactive site*-Bindung des Inhibitors wird dann rasch von Trypsin gespalten.

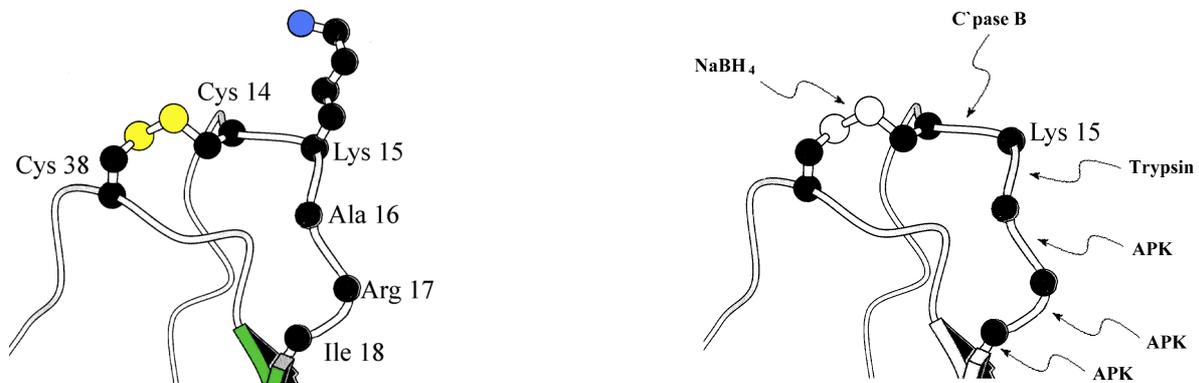


Abb. 2: *Backbone* des TKI-Bindungsloops (links: mit Disulfidbrücke Cys<sup>14</sup>/Cys<sup>38</sup> (gelb), beginnende β-Faltblattstruktur (grün) und Lys<sup>15</sup>-Seitenkette; rechts: enzymatisch zugängliche Spaltstellen zur Darstellung von TKI-Fragmenten)

Anschließend Reoxidation der Disulfidbrücke mit Luftsauerstoff liefert das "modifizierte" TKI (Jering & Tschesche, 1976 a). Die Umsetzung von TKI\* mit Aminopeptidase K führt zu Inhibitorderivaten, bei denen eine, zwei oder drei (Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>, Ile<sup>18</sup>) Aminosäuren fehlen. Die nach Ile<sup>18</sup> beginnende β-Faltblattstruktur verhindert einen weiteren Abbau in P'-Richtung außerdem ist der N-Terminus für Aminopeptidase K nicht zugänglich, so dass durch geeignete Reaktionsbedingungen (Mehlich, 1988; Groeger, 1991a) nur die gewünschten Produkte Des(Ala<sup>16</sup>)TKI\*, Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\* und Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>, Ile<sup>18</sup>)TKI\* entstehen. Die Exopeptidase Carboxypeptidase B eignet sich besonders zur Abspaltung von Lys<sup>15</sup> in P-Richtung. Hier verhindert die Spezifität des Enzyms, aber auch eine sterische Gegebenheit, die Disulfidbrücke Cys<sup>14</sup>/Cys<sup>38</sup>, das Entfernen weiterer Aminosäuren. Der Reaktionsverlauf der Abspaltung der Aminosäuren wird stets per HPLC verfolgt, so dass das jeweilige Produkt in optimalen Ausbeuten erhalten werden kann.

## 2.2 Einbaustrategien

Um Aminosäuren im reaktiven Zentrum des TKI auszutauschen stehen verschiedene Synthesestrategien zur Verfügung. Alle sind im Prinzip auf die klassische peptidchemische Methode zum Austausch der P<sub>1</sub>-Aminosäure (Wenzel & Tschesche, 1981b) zurückzuführen und sind der jeweiligen Position des Einbaus und der Art der einzubauenden Spezies angepasst worden (vgl. Groeger, 1994b).

### 2.2.1 Austausch der P'-Positionen durch enzymatisch-chemische Semisynthese

Der Austausch der P'-Aminosäuren Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup> und Ile<sup>18</sup> gelingt durch enzymatisch-chemische Semisynthese (Groeger et al., 1994a). Aminosäuren, Dipeptide, Tripeptide und Peptidmimetica können, als tert.-Butylester geschützt, enzymatisch an den freien C-Terminus Lys<sup>15</sup> von Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI gekoppelt werden (I). Die thermodynamisch kontrollierte Knüpfung der Peptidbindung ist die direkte Umkehrung der proteasekatalysierten hydrolytischen Spaltung. Durch Verwendung eines hohen Überschusses an Nukleophil und eines Cosolvensanteils von 88%, bestehend aus 1,4-Butandiol und DMSO im Verhältnis 2:1, gelingt es, den konkurrierenden enzymatischen Abbau des TKI-Fragments völlig zu unterdrücken. Die Kopplungsausbeuten der Peptidanaloga betragen bis zu 70%. Im Vergleich dazu können Dipeptidester und Aminosäureester mit bis zu 90%iger Ausbeute gekoppelt werden (Groeger, 1994b). Die Produkte werden durch Ionenaustauschchromatographie von nicht umgesetztem Edukt getrennt. Bevor die Bindung 17-18 durch EDC geschlossen werden kann, müssen die freien Carboxylgruppen der Seitenketten von Asp und Glu sowie des C-terminalen Ala<sup>58</sup> geschützt werden, um eine Aktivierung dieser Gruppen durch das Carbodiimid zu vermeiden. Die Kopplungsprodukte werden in methanolischer Salzsäure verestert (II). Dabei wird trotz saurer Bedingungen der tert.-Butylester der angekoppelten Peptide oder Peptidmimetica nicht gespalten. Die nachfolgende Hydrolyse des tert.-Butylesters durch konzentrierte Trifluoressigsäure (III) übersteht das Inhibitorderivat ohne Schaden. Die Synthese der noch offenen Bindung (IV) gelingt in wässriger Lösung unter Verwendung des wasserlöslichen Carbodiimids EDC und von 1-Hydroxybenzotriazol bei pH 4,75. Eine Reaktion mit ε-Aminogruppen der Lysinreste wird durch ihre Protonierung bei diesem pH weitgehend ausgeschlossen. Das so gewonnene Inhibitorderivat wird durch Verseifung der Methylester bei pH 10,5 entschützt (V) und durch Kationenaustauschchromatographie gereinigt. Der Vorteil der enzymatisch-chemischen Semisynthese liegt in der weitgehenden Unabhängigkeit von der Basizität der einzubauenden Nukleophile. Da sich die Peptidanaloga in diesem Punkt erheblich von Peptiden unterscheiden können, ist eine chemische Kopplung mit Carbodiimid bei pH 4,75 in manchen Fällen nicht möglich, während die enzymatische Methode gute Ausbeuten liefert.

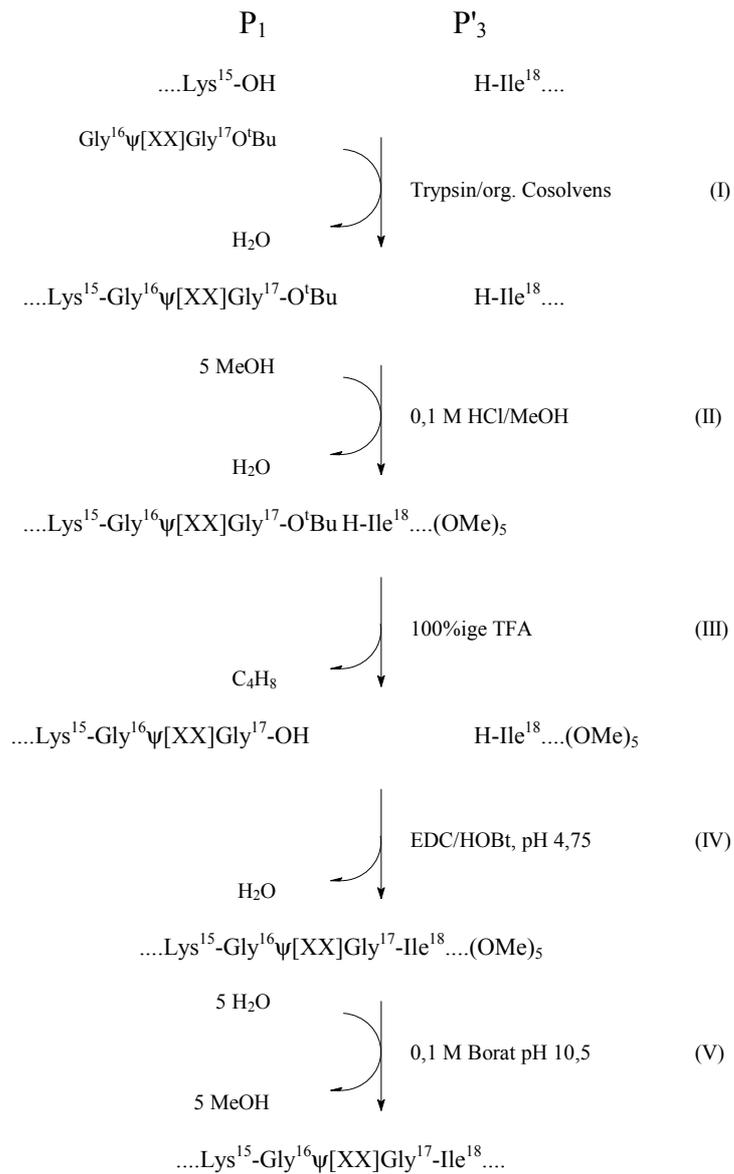


Abb. 3: Enzymatisch-chemische Semisynthese von P'-Homologen

### 2.2.2 Austausch der $P_1$ -Aminosäure und der $P_1'$ und $P_2'$ -Aminosäuren

Der Ersatz der *reactive site*-Amidbindungen durch ein Peptidanalogen vom Typ Lys $\Psi$ [XX]Gly oder Lys- $\Psi$ [XX]GlyGly macht es erforderlich zwei oder drei Aminosäuren gleichzeitig auszutauschen. Dazu lässt sich das Konzept der chemischen Semisynthese von  $P_1$ -Homologen (Wenzel & Tschesche, 1981) durch Verwendung von

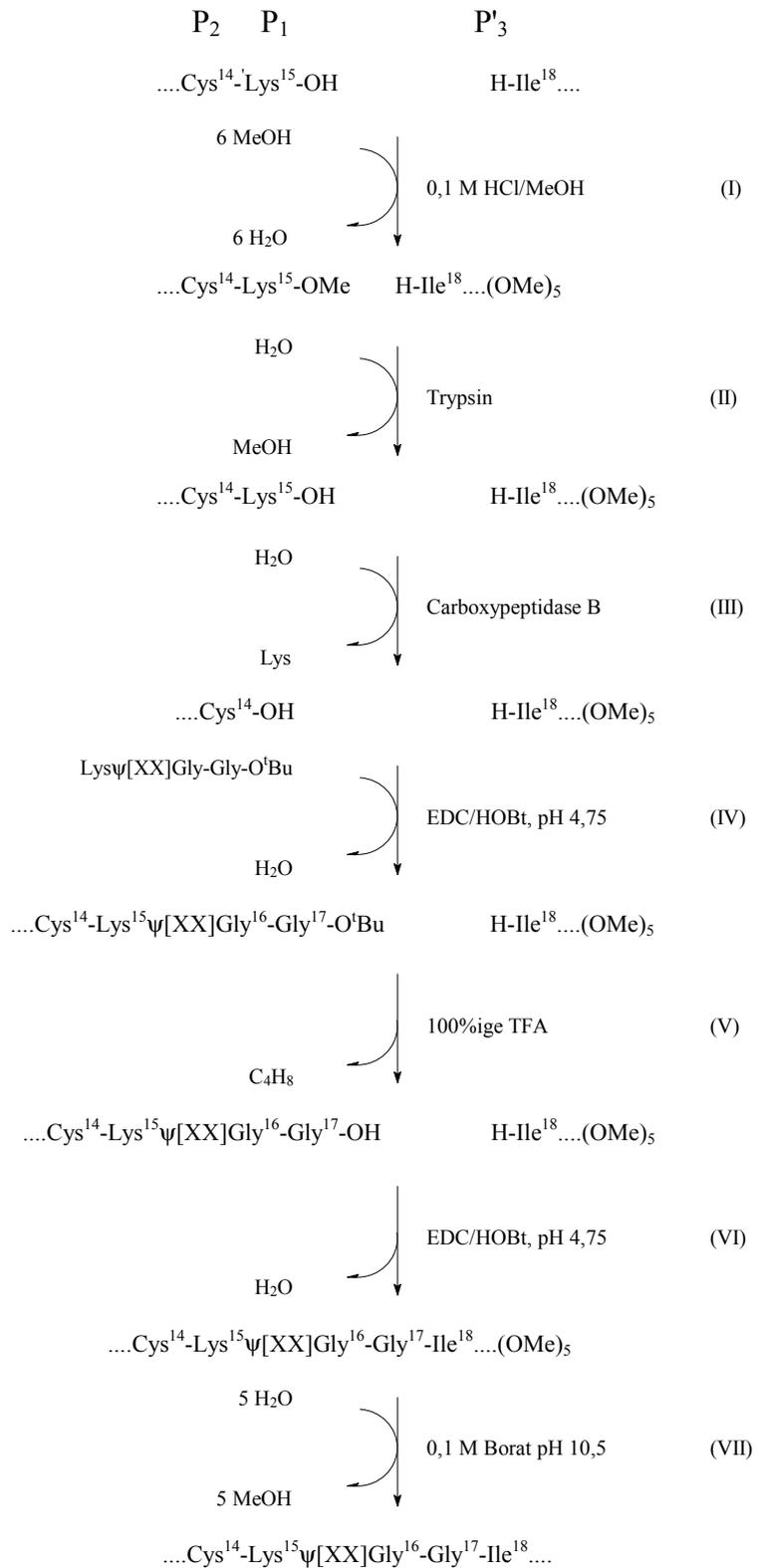


Abb. 4: Chemische Semisynthese von [Lys<sup>15</sup>ψ[XX]Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI-Homologen

Des(Ala<sup>16</sup>)TKI\* bzw. Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\* als Startmaterial entsprechend erweitern (Abb. 4). Zunächst werden die freien Carboxylgruppen durch 0,1 M methanolische HCl verestert (I). Die ursprünglich vorgesehene Spaltung des Lysin-15-Methylesters durch Endoproteinase Lys C, die unter Umständen mehrere Tage dauern kann, wird hier mit Hilfe des wesentlich reaktiveren Trypsin durchgeführt (II) und ist in wenigen Minuten vollständig abgelaufen. Eine konkurrierende Spaltung der Bindung Arginin<sup>39</sup>-Alanin<sup>40</sup>, die auch bei der Darstellung von TKI\* eine Rolle spielt, kann durch die sehr kurzen Reaktionszeiten oder durch Zusatz von Cosolvens weitgehend vermieden werden (Tschesche et al., 1991; Wenzel et al., 1993). Nach Entfernen von Lys<sup>15</sup> durch Carboxypeptidase B (III) wird das entsprechende Dipeptid- bzw. Tripeptidanalogen unter Verwendung von EDC und 1-Hydroxybenzotriazol an Cys<sup>14</sup> gekoppelt (IV). Eine Reaktion der ε-Aminofunktionen findet bei pH 4,75 wie beschrieben nicht statt. Nach Entfernen der tert-Butylesterschutzfunktion mit TFA (V) wird die noch offene Bindung mit Hilfe von EDC und 1-Hydroxybenzotriazol geschlossen (VI). Nachfolgende Verseifung der restlichen Methylester (VII) liefert das gewünschte TKI-Derivat.

### 2.2.3 Austausch von P'-Aminosäuren durch chemische Semisynthese

Der Austausch von eins, zwei oder drei P'-Aminosäuren, Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup> und Ile<sup>18</sup> erfolgt wie bereits oben erwähnt durch enzymatisch-chemische Semisynthese oder durch chemische Semisynthese die wiederum eine Weiterentwicklung der chemischen Semisynthese von P<sub>1</sub>-Homologen ist (Groeger, 1994b). Dabei wird Des(Ala<sup>16</sup>)TKI\* oder Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\* nacheinander mit methanolischer HCl (I) und mit Trypsin (II) behandelt (siehe oben).

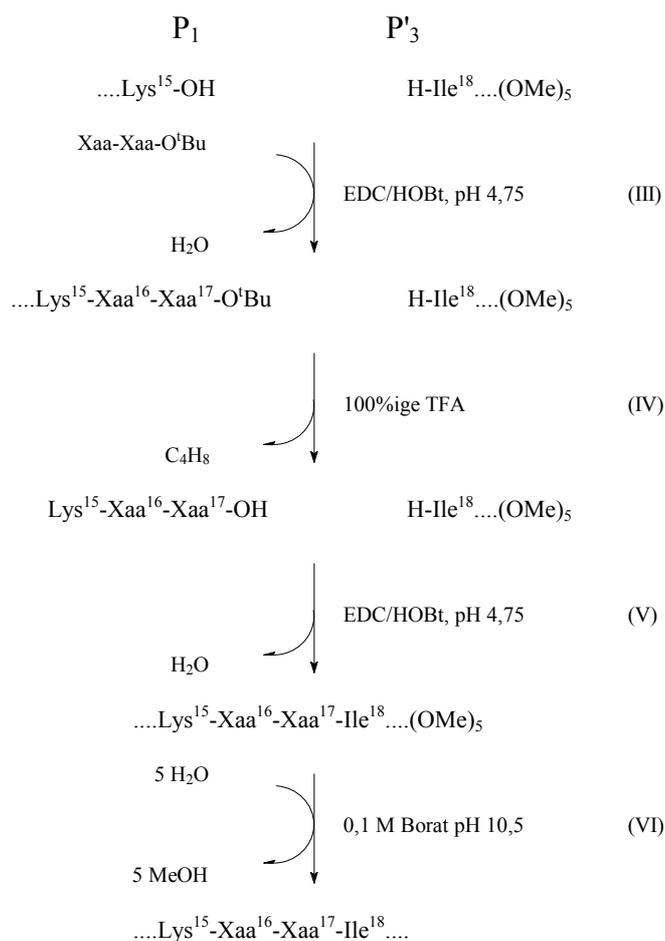


Abb. 5: Chemische Semisynthese von P'-Homologen

Die geschützten Aminosäuren, Dipeptide oder Peptitanaloga werden mit EDC und 1-Hydroxybenzotriazol an das Lys<sup>15</sup> des vorbereiteten Inhibitorfragmentes gekoppelt (III). Nach Abspalten des tert.-Butylesters in 100%iger Trifluoressigsäure (IV) wird auch die zweite Bindung mit EDC/HOBt geschlossen (V) und das TKI-Derivat nach abschließender Verseifung der Methylester durch Ionenaustauschchromatographie (VI) isoliert.

### 2.2.4 Chemisch-enzymatischer Austausch von P'-Aminosäuren durch pH-gesteuerte Acylierung.

Sehr reaktive Aktivester von geschützten Aminosäuren, Dipeptiden oder Dipeptidanaloga, vorzugsweise die N-Hydroxysuccinimidester, lassen sich an den N-Terminus von Arg<sup>17</sup> in Des(Ala<sup>16</sup>)TKI\* oder Ile<sup>18</sup> in Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\* koppeln (Groeger, 1994b).

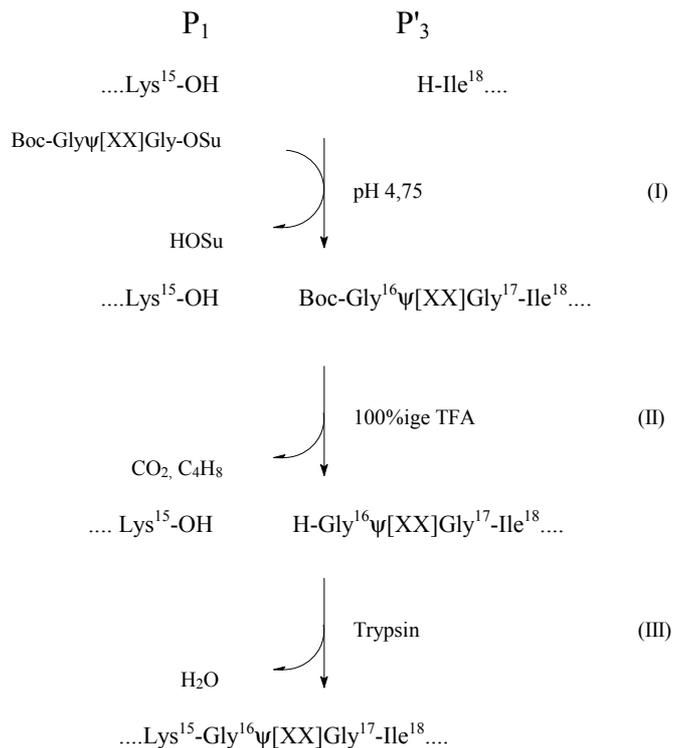


Abb. 6: Chemisch-enzymatische Semisynthese von P'-Homologen

Wie bei der gewohnten Kopplung mit EDC, verläuft die Acylierung (I) an die gewünschte Position, wenn man bei pH-Werten von 4,75 oder darunter arbeitet, in relativ guten Ausbeuten, da die ε-Aminofunktionen bei diesem pH zum größten Teil protoniert vorliegen und der N-Terminus Arg<sup>1</sup> offensichtlich sterisch schwerer zugänglich ist. Es lässt sich bei dieser Methode allerdings nicht ganz verhindern, dass auch mehrfach acylierte Produkte entstehen. Diese lassen sich üblicherweise aber nach Entfernen der Boc- oder Z-Schutzgruppe durch TFA (II) und Schließen der *reactive site*-Bindung mit Trypsin (III) durch Ionenaustauschchromatographie vom Monoacylierungsprodukt abtrennen.

### 2.2.5 Chemischer Austausch von P- oder P'-Aminosäuren durch pH-gesteuerte Acylierung

Der rein chemische Austausch von P'-Aminosäuren durch pH-gesteuerte Acylierung kommt dann in Frage, wenn sich die *reactive site*-Bindung nicht enzymatisch knüpfen lässt, aber auch

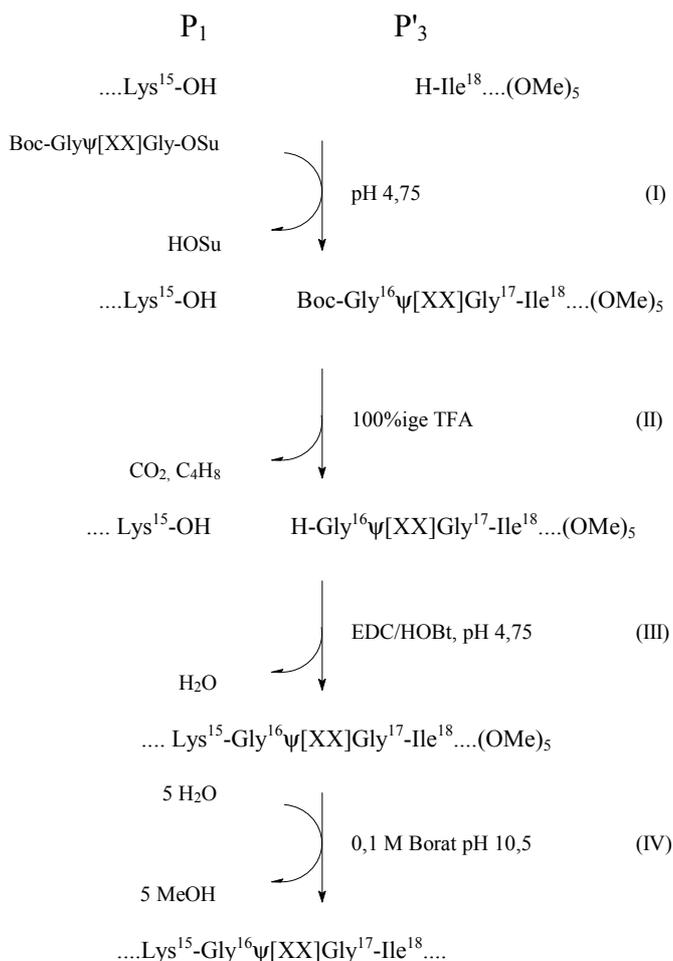


Abb. 7: Chemisch Semisynthese von P'-Homologen durch pH-gesteuerte Acylierung

dann, wenn ein Dipeptid, Tripeptid oder deren Analoga die P- und P'-Aminosäuren Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup> und Arg<sup>17</sup> ersetzen soll. Hierzu müssen die Methylester-geschützten TKI-Derivate Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub>, Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> oder Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> als Startmaterial eingesetzt werden. Die Acylierung an den N-Terminus von Arg<sup>17</sup> oder Ile<sup>18</sup> (I) erfolgt bei pH 4,75. Anschließend wird die Boc- oder Z-Schutzgruppe in

100 %iger TFA abgespalten. Die noch offene Bindung wird in wässrigem Milieu mit EDC und 1-Hydroxybenzotriazol bei pH 4,75 geschlossen. Nach abschließende Verseifung der Methylester in Natriumboratpuffer bei pH 10,5 und Reinigung kann das gewünschte TKI-Derivat isoliert werden.

## 2.3 Semisynthesen und Hemmtests

### 2.3.1 Vergleich von [Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI, [Doa<sup>15</sup>, Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI und [Dcl<sup>15</sup>, Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI

Die Spezifität von Trypsin wird durch die Seitenkette der Aminosäure Asp<sup>189</sup> bestimmt, die sich im Inneren der Substrat-Bindungstasche befindet. Dieser Rest kann mit positiv geladenen Seitenketten des Substrats in Wechselwirkung treten. Die Wechselwirkung mit TKI erfolgt durch die Lysin<sup>15</sup> Seitenkette und wird durch ein internes Wassermolekül vermittelt. Substituiert man Lys<sup>15</sup> durch Arginin, so stellt man fest, dass die Arginin-Seitenkette eine direkte Salzbrücke zum Asp<sup>189</sup> im Trypsin ausbildet. Eine Verlängerung der Lysin-Seitenkette um ein bzw. zwei CH<sub>2</sub>-Einheiten könnte dazu führen, dass im Komplex mit Trypsin durch Verdrängung des Wassermoleküls ebenfalls eine direkte Salzbrücke zum Enzym ausgebildet wird, was zu einem Energiegewinn von etwa 13 kJ/mol (Naray-Szabo & Nagy, 1986) und damit zu einer noch kleineren Dissoziationskonstanten führt. Messungen der Konstanten der entsprechend modifizierten TKI-Trypsin-Komplexe mit einem empfindlichen Substrat ergaben keine Unterschiede zwischen nativem TKI und den TKI-Homologen mit verlängerten Seitenketten (Groeger, 1994b). Da der K<sub>d</sub>-Wert allerdings am unteren Ende des Messbereiches liegt, sind eventuelle Verbesserungen der Hemmeigenschaften möglicherweise nicht erkennbar. Durch Variation des P'-Bereiches des Inhibitor sind Inhibitorvarianten bekannt, deren Dissoziationskonstanten deutlich höher liegen. Somit sollte es möglich sein einen Inhibitor zu synthetisieren, der durch die Verlängerung der Seitenkette Lys<sup>15</sup> und gleichzeitige Veränderung der P'-Region z. B. durch Gly<sup>16</sup>-Gly<sup>17</sup>, eine Dissoziationskonstante im Enzym-Komplexe aufweist, die mit den zur Verfügung stehenden Messmethoden leicht zu ermitteln ist. Abb. 8 zeigt einen Vergleich der Seitenketten der P<sub>1</sub>-Aminosäuren der geplanten TKI-Varianten [Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI, [Doa<sup>15</sup>, Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI und [Dcl<sup>15</sup>, Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI.

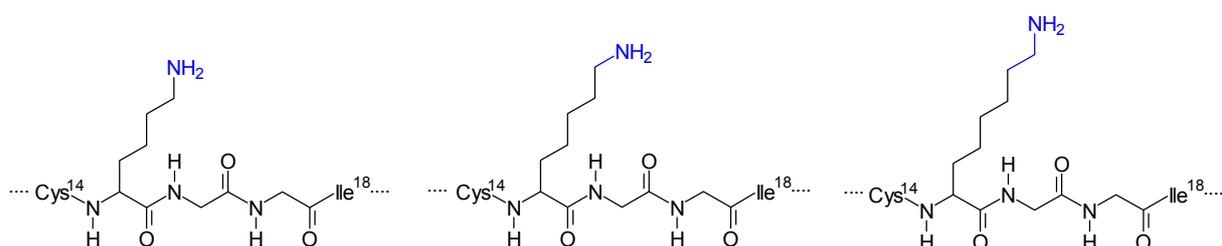
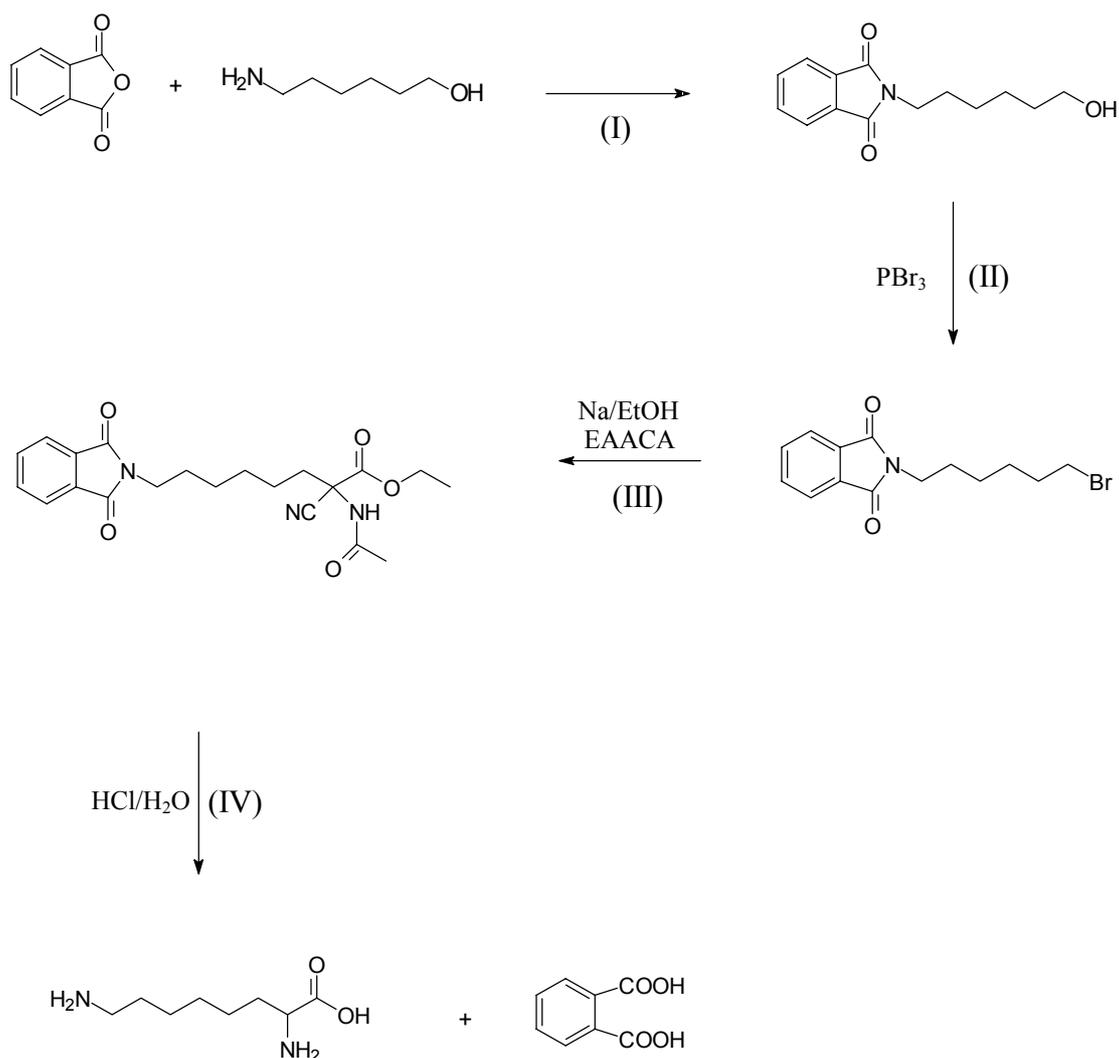


Abb. 8: Vergleich der Seitenketten der P<sub>1</sub>-Aminosäuren in [Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI, [Doa<sup>15</sup>, Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI und [Dcl<sup>15</sup>, Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI.

Die Synthese der Aminosäuren mit verlängerten Seitenketten erfolgt durch Kondensation von Ethyl-acetamidocyanoacetat mit den entsprechenden Bromalkylphthalimiden, in Anlehnung an eine so beschriebene Synthese von DL-Ornithin (Gaudry, 1953). Dabei wird zunächst der erforderliche Aminoalkylalkohol durch Phtalsäureanhydrid geschützt (I). Der so geschützte Alkohol wird, ohne isoliert zu werden, sofort zum Bromalkylphthalimid umgesetzt (II).



Nukleophile Substitution des Bromids mit dem Anion des Ethyl-acetaminocyanoacetats (EAACA), erzeugt durch Deprotonierung mit Natriumethanolat, liefert das verlängerte Kohlenstoffgerüst der neuen Aminosäure, die durch abschließende Hydrolyse und Decarboxylierung (IV) als Hydrochlorid isoliert werden kann. Durch Umsetzung in methanolischer HCl erhält man schließlich die entsprechenden Methylester als racemisches Gemisch. Diese werden durch chemische Semisynthese zunächst an Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> gekoppelt. Anschließend sollte es möglich sein GlyGlyO<sup>t</sup>Bu durch

enzymatisch-chemische Semisynthese in das so entstandene Intermediat einzubringen, da Trypsin wie beschrieben von C<sub>3</sub> (Orn) bis C<sub>6</sub> (Dcl)-Reste in P<sub>1</sub>-Position des TKI akzeptiert. Der enzymatische Weg bietet sich hier besonders an, da Trypsin eine Spezifität für L-Aminosäuren besitzt und die Kopplung somit nur an den TKI-Derivaten, die mit L-Doa bzw L-Dcl versehen wurden, erfolgt. Im weiteren Verlauf der Synthese ist es dann sehr einfach möglich die fehl gekoppelten TKI-Fragmente zu erkennen und durch Kationenaustauschchromatographie abzutrennen. Die enzymatische Kopplung erfolgt ohne vorher den Methylester der Lys<sup>15</sup>-Homologen zu entfernen. Abbildung 9 zeigt einen Ausschnitt aus dem denkbaren Syntheseweg.

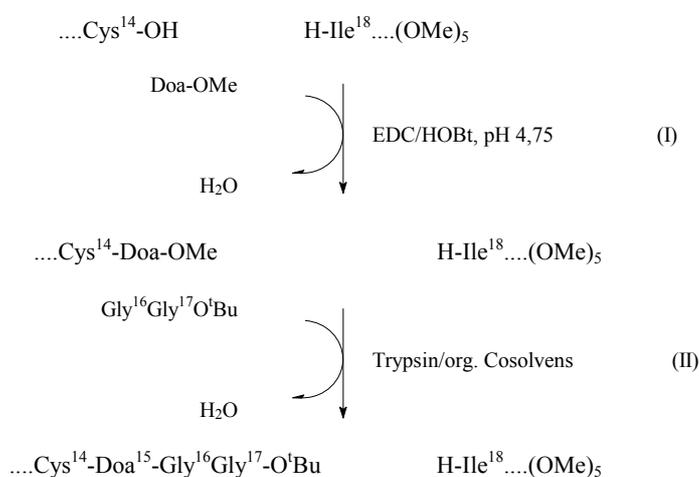


Abb. 9: Kombination von chemischer und enzymatischer Semisynthese

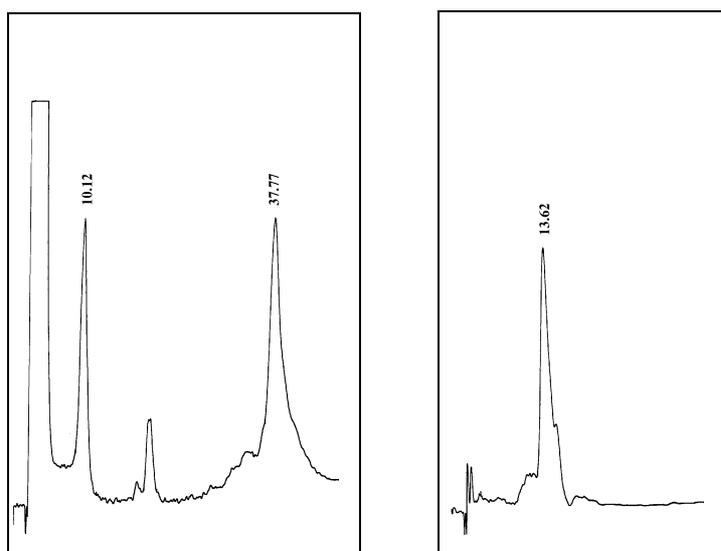
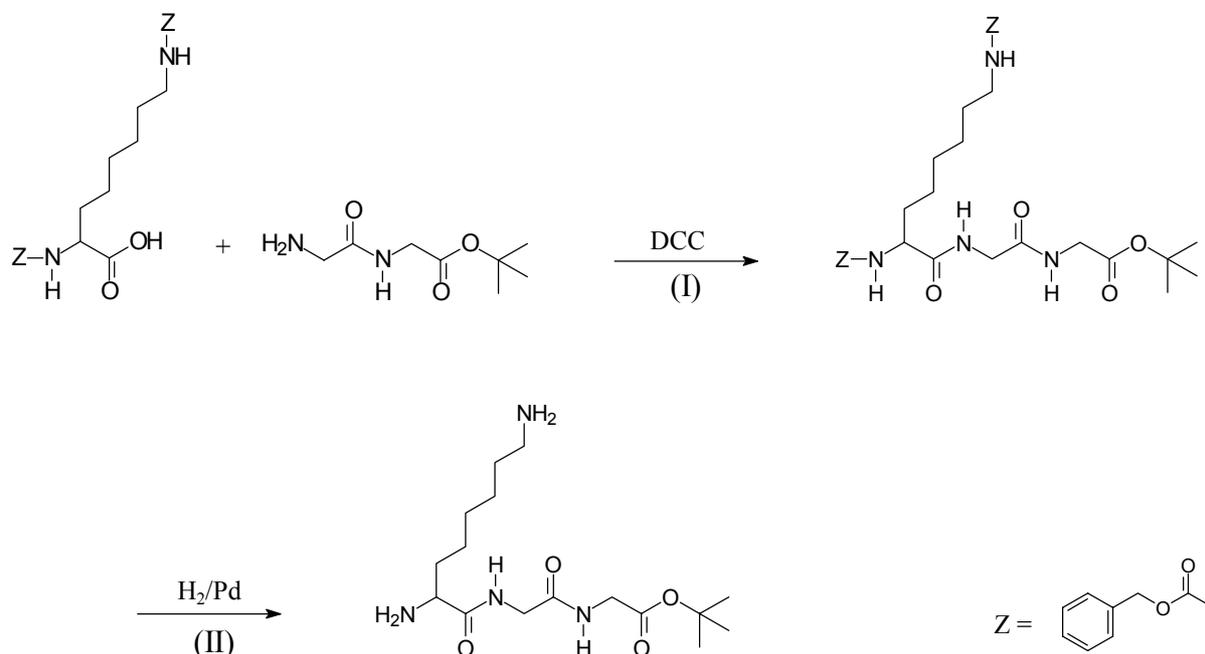


Abb. 10: links: HPLC-Analyse der chemischen Kopplung von Doa-OMe ( $R_t$  10,12 min) an Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> nach 2 h ( $R_t$  Produkt 37,77 min). rechts: HPLC von Doa<sup>15</sup>-Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\* nach der Verseifung

Die chemische Kopplung der Aminosäuremethylester an Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> (I) verläuft wie erwartet in guten Ausbeuten. Wie Abbildung 10 zeigt, ist das Edukt (R<sub>t</sub> 29,3 min) bereits nach 2 h vollständig umgesetzt. Allerdings gelingt es nicht den Baustein GlyGlyO<sup>t</sup>Bu enzymatisch mit Trypsin an Doa<sup>15</sup>-OMe des TKI-Derivates zu koppeln. Der Methylester-geschützte Kopplungspunkt ist dabei kein Hindernis, da die Esterschutzfunktion an dieser Position simultan zur Kopplung von Trypsin abgespalten wird.

Da die enzymatische Semisynthese so nicht gelingt, wird das TKI-Derivat mit dem Lys<sup>15</sup>-Homologen verseift. Man sieht in Abbildung 10, dass ein einheitliches Produkt entsteht, das von der Retentionszeit (13,6 min) Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\* entspricht. Sequenzanalysen über 18 Schritte bestätigen die Identität. Ein Versuch das verseifte Derivat durch enzymatische Semisynthese mit GlyGlyO<sup>t</sup>Bu umzusetzen, gelingt ebenfalls nicht, obwohl dieser Schritt mit Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\* als Edukt mit sehr guten Ausbeuten verläuft (Groeger, 1994b; Deitermann, 1994). Denkbar wäre nun noch den enzymatischen Schritt durch den chemischen Einbau zu ersetzen. Allerdings schwinden mit jedem weiteren chemischen Behandlungsschritt durch EDC die Ausbeuten an kostbarem TKI-Derivat. Daher soll das einzufügende fehlende Stück möglichst als ganzes in das TKI-Fragment eingebracht werden. Somit ergibt sich folgende Vorgehensweise. Die Aminosäuremethylester der Lysin-Homologen werden durch Umsetzung mit Chlorameisensäure-benzylester N-terminal geschützt. Dabei wird gleichzeitig der Methylester verseift.



DCC-Kopplung mit GlyGlyO<sup>t</sup>Bu (I) und abschließende Hydrierung (II) liefert das einbaufähige Tripeptid. Dieses wird zunächst per chemischer Semisynthese an Cys<sup>14</sup> in Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> gekoppelt. Nach Entfernen der tert-Butylester in 100%iger

TFA, wird mit Hilfe von EDC/HOBt die Bindung 17-18 geschlossen. Nach der Verseifung der Methylester wird das Produkt durch Kationenaustauschchromatographie an CM-Sephrose von den Nebenprodukten getrennt. Abbildung 11 zeigt das HPLC-Chromatogramm des gereinigten [Dcl<sup>15</sup>, Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI (R<sub>t</sub> 18,6 min).

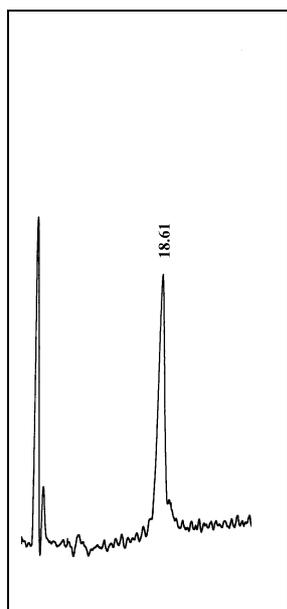


Abb. 11: HPLC-Spektrum von [Dcl<sup>15</sup>, Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI

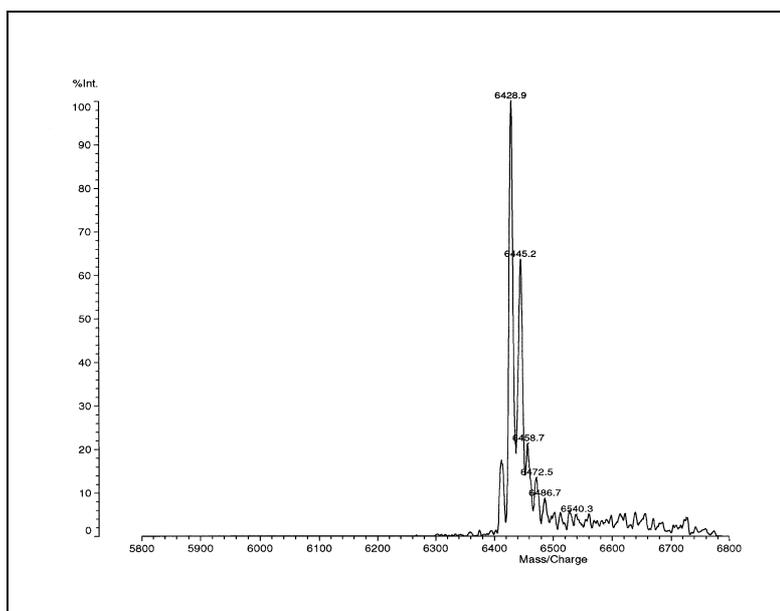


Abb. 12: Maldi-ToF-MS von [Dcl<sup>15</sup>, Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI; M: 6426,5 gemessen: M 6428,9

Die Synthesen von [Doa<sup>15</sup>, Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI und [Dcl<sup>15</sup>, Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI verlaufen wie erwartet weitgehend parallel. Zudem erhält man trotz des Einsatzes der racemischen Aminosäuremethylester Doa-OME und Dcl-OME ein einheitliches TKI-Derivat. Die Retentionszeiten der TKI-Derivate lassen den Schluss zu, dass es sich ausschließlich um die Variante mit den entsprechenden L-P<sub>1</sub>-Aminosäuren handelt. Experimentell wurde mehrfach bestätigt, dass TKI-Homologe, die D-Aminosäuren im Bindungsloop enthalten, eine um etwa eine Minute verschobene Retentionszeit aufweisen (Groeger, 1994b). Sequenzanalysen nach Edman über 18 Schritte sowie Maldi-Massenspektren (Abb. 12) bestätigen die Identität der TKI-Varianten, wobei insbesondere [Dcl<sup>15</sup>, Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI größere Mengen des TKI-Derivates mit oxidiertem Met<sup>52</sup> enthält. Dieses Derivat lässt sich nicht ohne weiteres durch Ionenaustauschchromatographie vom Produkt trennen. Da aber der Methioninrest kein Bestandteil der Kontaktregion des Inhibitors ist, werden die inhibitorischen Eigenschaften durch die Oxidation nicht beeinflusst.

Die Messungen der Hemmeigenschaften gegenüber Trypsin und Kallikrein sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Dissoziationskonstanten  $K_d$  [M]:

	Trypsin	Kallikrein
[Gly <sup>16</sup> , Gly <sup>17</sup> ]TKI	$4 \times 10^{-11}$	$4 \times 10^{-9}$
[Doa <sup>15</sup> , Gly <sup>16</sup> , Gly <sup>17</sup> ]TKI	$8 \times 10^{-10}$	$2 \times 10^{-8}$
[Dcl <sup>15</sup> , Gly <sup>16</sup> , Gly <sup>17</sup> ]TKI	$1 \times 10^{-8}$	$2 \times 10^{-7}$

Tabelle 1: Dissoziationskonstanten von [Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI, [Doa<sup>15</sup>, Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI und [Dcl<sup>15</sup>, Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI im Trypsin- und Kallikrein-Komplex.

Wie beschrieben war der Einfluss der Seitenkettenlänge auf das Hemmverhalten für Trypsin bisher nicht bestimmbar, da die Konstanten in einem Bereich liegen, an dem herkömmliche Messungen nicht mehr empfindlich genug sind. [Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI weist gegenüber nativen TKI eine um drei Zehnerpotenzen größere Konstante auf, so dass in Kombination mit Doa oder Dcl in Position 15 eine deutliche Veränderung messbar sein sollte. Ganz entgegen den Erwartungen stellt man fest, dass die Dissoziationskonstanten der TKI-Varianten sowohl im TKI-Trypsin- wie auch im TKI-Kallikrein-Komplex mit zunehmender Seitenkettenlänge größer werden. Die Differenzen betragen jeweils pro CH<sub>2</sub>-Einheit eine Zehnerpotenz. Angedeutet hat sich diese Tendenz bereits beim Versuch, Gly-Gly-O<sup>t</sup>Bu enzymatisch an das bereits mit Doa bzw. Dcl versehene TKI zu koppeln. Hier fand keine messbare Reaktion statt, obwohl Vergleichsansätze mit Lys in Position 15 zu guten Ergebnissen führten. Die verlängerten Seitenketten sind also nicht in der Lage das zwischen der NH-Funktion im Inhibitor und Asp<sup>189</sup> im Enzym vermittelnde Wassermolekül zu verdrängen und eine direkte Salzbrücke mit dem Enzym auszubilden. Es scheint vielmehr so zu sein, dass die Verlängerung der Lysinseitenkette dazu führt, dass der Inhibitor nicht mehr im Sinne des *perfect-fit* in die Substratbindungstasche passt und somit andere Wechselwirkungen geschwächt werden oder verloren gehen. Das führt letztendlich zum Verlust an Bindungsenergie und damit zu einer Erhöhung der Dissoziationskonstanten.

### 2.3.2 Die Ketomethylenfunktion als Ersatz für die *reactive site*-Bindung

Der Einbau des Ketomethylenderivates LysΨ[COCH<sub>2</sub>]Gly anstelle der *reactive site*-Bindung des TKI bietet die Möglichkeit einen nicht spaltbaren Inhibitor darzustellen. Sowohl halogenierte Aminosäure- oder Peptidhalogenketone sind als Serinproteaseinhibitoren bekannt (Rich 1991), als auch Dipeptidisostere mit Ketomethylenfunktionen, die als Peptidinhibitoren für diverse Proteasen wirken (Jean, 1995; Marinier, 1994; DiMaio, 1992).

Ala<sup>15</sup>Ψ[COCH<sub>2</sub>]Gly wurde bereits erfolgreich in TKI eingebaut, zeigte aber keinerlei Hemmeigenschaften gegenüber Trypsin. Auch Elastase, für das dieses TKI-Derivat ursprünglich *designed* wurde, wird nicht gehemmt.

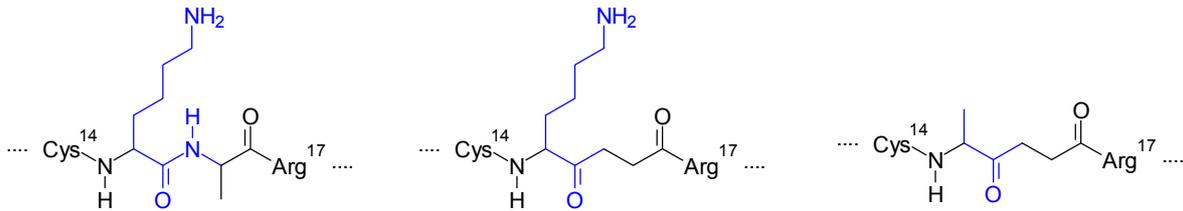
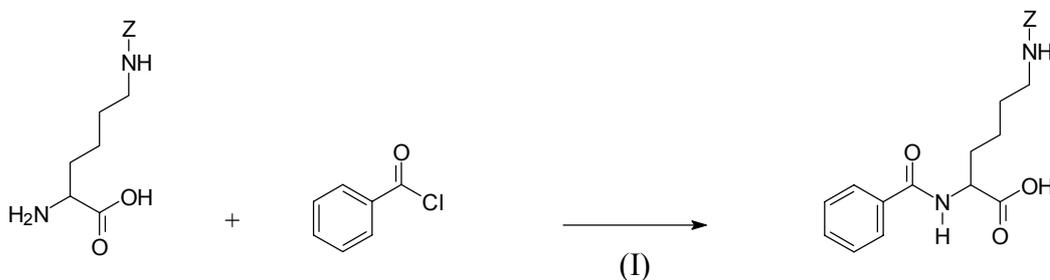
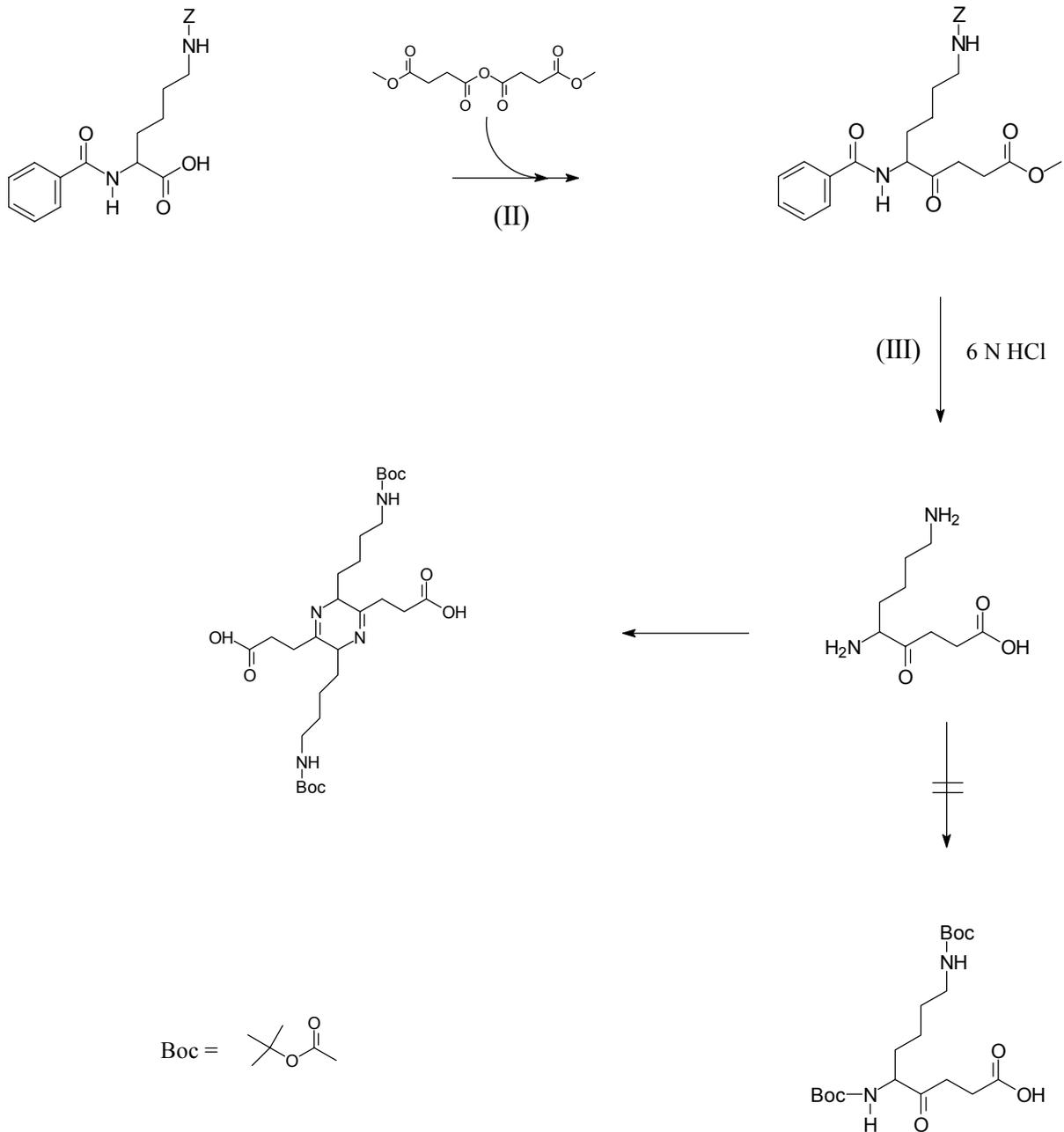


Abb. 13: Vergleich der *reactive site*-Bindung von nativem TKI, Lys<sup>15</sup>Ψ[COCH<sub>2</sub>]Gly<sup>16</sup> und Ala<sup>15</sup>Ψ[COCH<sub>2</sub>]Gly<sup>16</sup>TKI

Natürlich fehlt bei einer Substitution des Lysins durch Alanin die spezifitätsbestimmende Seitenkette, was zu einer Erhöhung der Dissoziationskonstanten führt. Der Verlust der kompletten Affinität des Inhibitors zum Enzym ist aber eher unwahrscheinlich. Daher ist es interessant zu erfahren, ob ein entsprechendes Lysinderivat hier bessere Hemmeigenschaften aufweist.

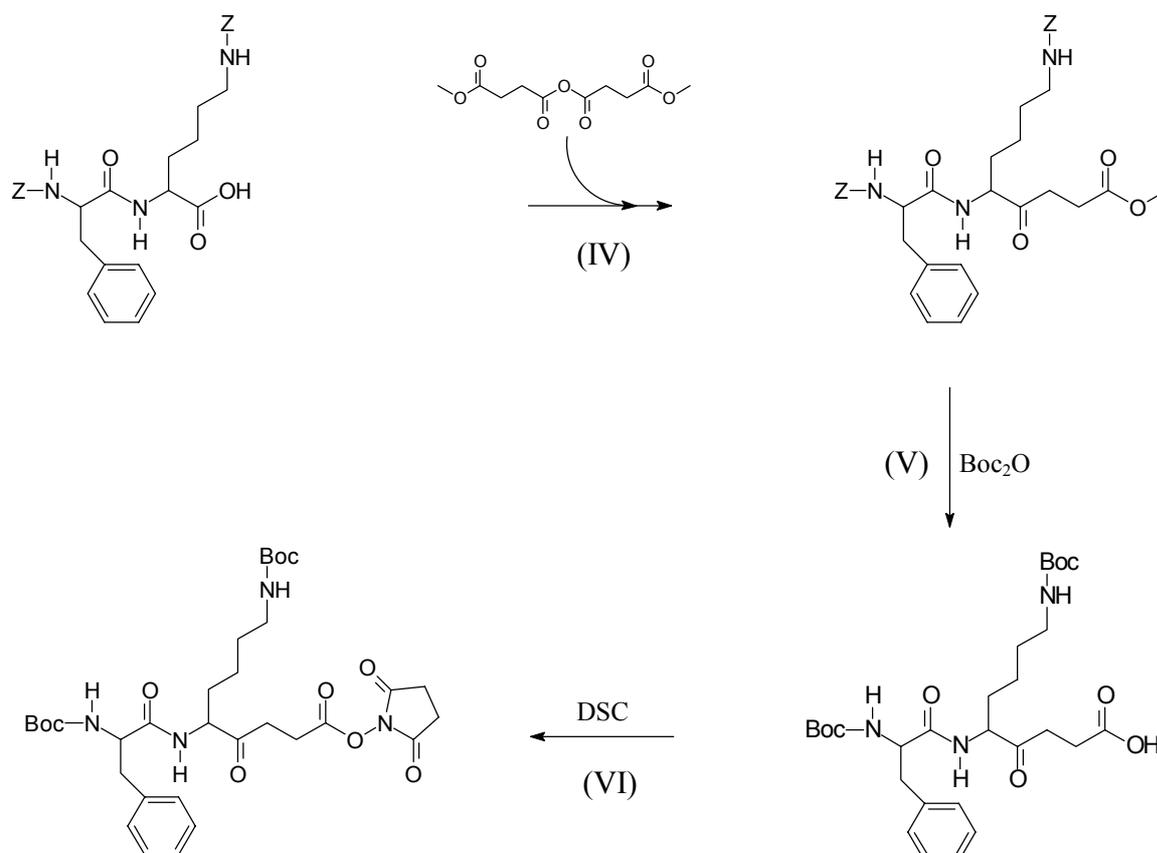
Die Synthese eines für den semisynthetischen Einbau geeigneten Peptidisoestern erweist sich als relativ schwierig. Folgt man der Dakin-West-Reaktion (McMurray & Dykes, 1985) wird zunächst die α-NH<sub>2</sub>-Funktion von N<sub>ε</sub>-Z-Lysin mit Benzoylchlorid behandelt (I). Anschließend wird die so geschützte Aminosäure mit dem Anhydrid von Monomethylsuccinat umgesetzt, wobei Bz-Lys(Z)Ψ[COCH<sub>2</sub>]Gly-OMe entsteht (II). Die Bz- und die Z-Schutzgruppe lassen sich durch Kochen in 6 N Salzsäure entfernen (III). Dabei geht auch der Methylester verloren.





Um ein durch chemische Semisynthese einbaufähiges Peptidmimetikum zu erhalten soll C-terminal ein tert-Butylester eingeführt werden. Dazu bietet es sich an, zunächst mit Boc zu schützen und dann bei gleichzeitiger Abspaltung mittels Umesterung in Essigsäure-tert.-butylester LysΨ[COCH<sub>2</sub>]Gly-O<sup>t</sup>Bu zu erhalten. Beim Versuch der Darstellung von Boc-Lys(Boc)Ψ[COCH<sub>2</sub>]Gly-OH entsteht jedoch trotz mehrmaliger Versuche unter Schutzgas und neutralen Bedingungen ein Pyrazinderivat. Um zu verhindern, dass das Ketomethylderivat dimerisiert, muss die Strategie geändert werden. Die Aminofunktion soll bis nach dem Einbau

geschützt bleiben. Da aber für die Dakin-West Reaktion an einer Aminosäure nur eine Benzoylschutzgruppe in Frage kommt, diese aber nur unter härtesten Bedingungen wieder zu entfernen ist, muss mit einer weiteren Aminosäure als *quasi* Schutzgruppe gearbeitet werden. Sehr gute Ausbeuten erhält man, wenn Phenylalanin die Aufgabe dieser Schutzgruppe übernimmt. Dazu wird also Z-Phe-Lys(Z)-OH, dargestellt aus Z-Phe-OSu und Lys(Z)-OMe bei anschließender Abspaltung des Methylesters, mit dem Anhydrid des Monomethylsuccinats



umgesetzt (IV). Nach Entfernen der Z-Schutzgruppe werden unter basischen Bedingungen gleichzeitig tert.-Butyloxycarbonylfunktionen eingeführt und der Methylester abgespalten (V). Setzt man jetzt mit DSC um (VI), so erhält man Boc-Phe-Lys(Boc)- $\Psi$ [COCH<sub>2</sub>]Gly-OSu, welches durch pH-gesteuerte Acylierung in TKI eingebracht werden soll. Die weitere Planung sieht vor, die Schutzgruppen mittels TFA zu entfernen, dann mit Aminopeptidase K Phenylalanin abzuspalten und schließlich die noch offene Bindung mit EDC/HOBt zu schließen.

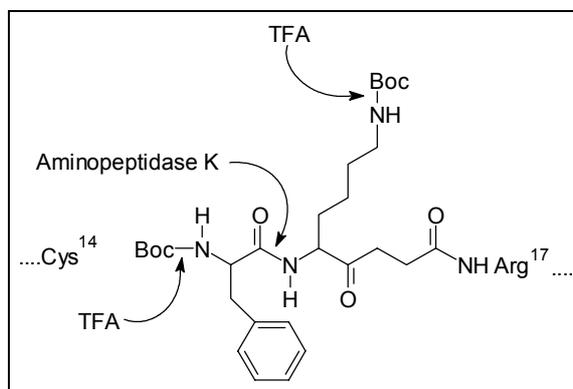


Abb. 14: Syntheschema zur Entfernung der Schutzgruppen nach der pH-gesteuerten Acylierung

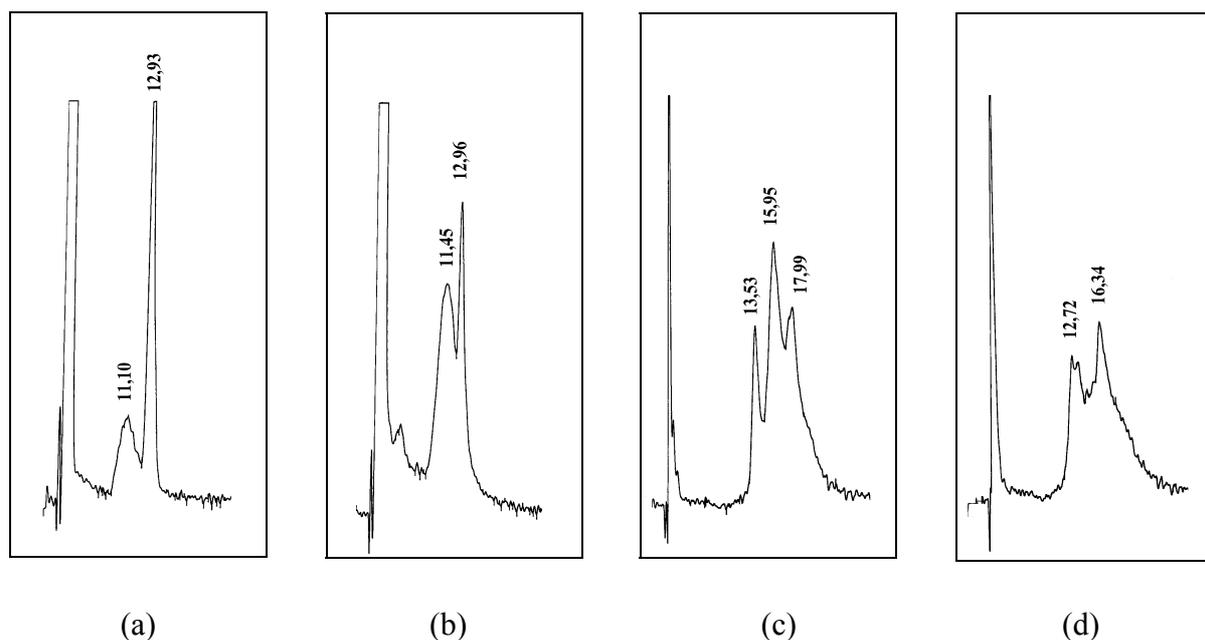


Abb. 15: HPLC-Spektren der Kopplung von Boc-Phe-Lys(Boc)- $\Psi$ [COCH<sub>2</sub>]Gly-OSu an Ile<sup>18</sup> von Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\* und Entfernen der Schutzgruppen

Ein Vorversuch soll zeigen, ob dieses Konzept Aussicht auf Erfolg hat. Dazu wird Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*, welches sehr viel leichter zugänglich ist als das Zielerivat Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub>, als Modells substanz verwendet. Das TKI-Derivat wird in Wasser DMF

gelöst, da sich gezeigt hat, dass die zu koppelnde organische Komponente nur mit dem entsprechenden Zusatz von organischem Solvens in Lösung bleibt. Abb. 15 zeigt die HPLC-Spektren des Vorversuchs. HPLC a zeigt die Umsetzung von Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\* (R<sub>t</sub> 12,93 min) mit Boc-Phe-Lys(Boc)-Ψ[COCH<sub>2</sub>]Gly-OSu bei pH 4,75 nach 1 h. HPLC b zeigt die Verhältnisse nach 2 h. Die Trennung des Reaktionsgemisches vom organischen Lösungsmittel und vom Überschuss der zu koppelnden Tripeptidanalogs durch Gelfiltration und anschließende Behandlung des TKI-Derivates mit TFA liefert ein Gemisch aus Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\* (R<sub>t</sub> 13,53 min) und zwei weiteren TKI-Derivaten mit Retentionszeiten (R<sub>t</sub> 15,95 und 17,99 min) die durchaus im Bereich des gewünschten TKI-Derivates liegen (HPLC c). Schließlich wird mit Aminopeptidase umgesetzt um das als Schutzgruppe fungierende Phenylalanin zu entfernen (HPLC d). Die geplante Synthese sollte also durchführbar sein. Bei der Umsetzung von Boc-Phe-Lys(Boc)-Ψ[COCH<sub>2</sub>]Gly-OSu mit Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> zeigt sich, dass bei den Standardbedingungen der pH-gesteuerten Acylierung eine Vielzahl an Kopplungsprodukten entsteht (sehr breiter Peak im HPLC-Spektrum, Abb. 16). Eine mögliche Ursache ist der hohe Anteil an Cosolvens der die Bedingungen, insbesondere den pH-Wert, stark beeinflussen kann. Um geeignete Bedingungen zu finden, die es möglich machen, die Acylierung in die richtige Richtung zu bewegen, wird zum Einen der pH-Wert stark variiert und zum Anderen wird mit verschiedenen Cosolvensien gearbeitet. Es stellt sich heraus, dass bei pH-Werten, die über 4,5 liegen, der Aktivester sehr schnell abreagiert, allerdings unter Entstehung von mehrfach acylierten Produkten. Bei pH-Werten unter 4 erfolgt praktisch keine Umsetzung. Das Cosolvens scheint keine bedeutende Rolle zu spielen. Verwendet wird letztlich Methanol, da hier sowohl der Aktivester wie auch das TKI-Fragment sehr gut löslich sind. Für den semisynthetischen Einbau von Boc-Phe-Lys(Boc)-Ψ[COCH<sub>2</sub>]Gly-OSu werden mehrere Versuche unternommen, bei denen der pH-Wert zwischen 4 und 4,5 langsam gesteigert wird. Letztendlich zeigt sich jedoch, dass es nicht möglich ist ein einheitliches Acylierungsprodukt zu erhalten. Das Produktgemisch wird aber weiter umgesetzt. Nach Abspalten der Boc-Schutzgruppen in 100%iger TFA folgt die Entfernung des Phenylalanins durch Inkubation mit Aminopeptidase K. Dann wird die noch offene Bindung mit Hilfe von EDC/HOBt geschlossen und schließlich werden die Methylester verseift. Mit jedem Reaktionsschritt entsteht eine deutliche Verschiebung des breiten Peaks im HPLC-Spektrum in die vorherberechnete Richtung, so dass man davon ausgehen kann, dass Reaktionen stattfinden. Nach der Verseifung verbleiben 10 mg (eingesetzt wurden 20 mg) TKI-Derivat. Unter Standardbedingungen (Wenzel et al. 1985) ist das TKI-Gemisch nicht als definierter Peak im HPLC mit der geschätzten Retentionszeit von etwa 18 Minuten zu sehen, sondern verbirgt sich unter einem sehr großen Einspritzpeak. Das deutet darauf hin, dass kein Monoacylierungsprodukt vorhanden ist und sämtliches TKI mindestens zweifach acyliert wurde. Auch ein RP-HPLC bringt keine Klarheit. Die Sequenzanalyse des so gewonnenen Materials lässt eine Haupt- und eine Nebensequenz erkennen.

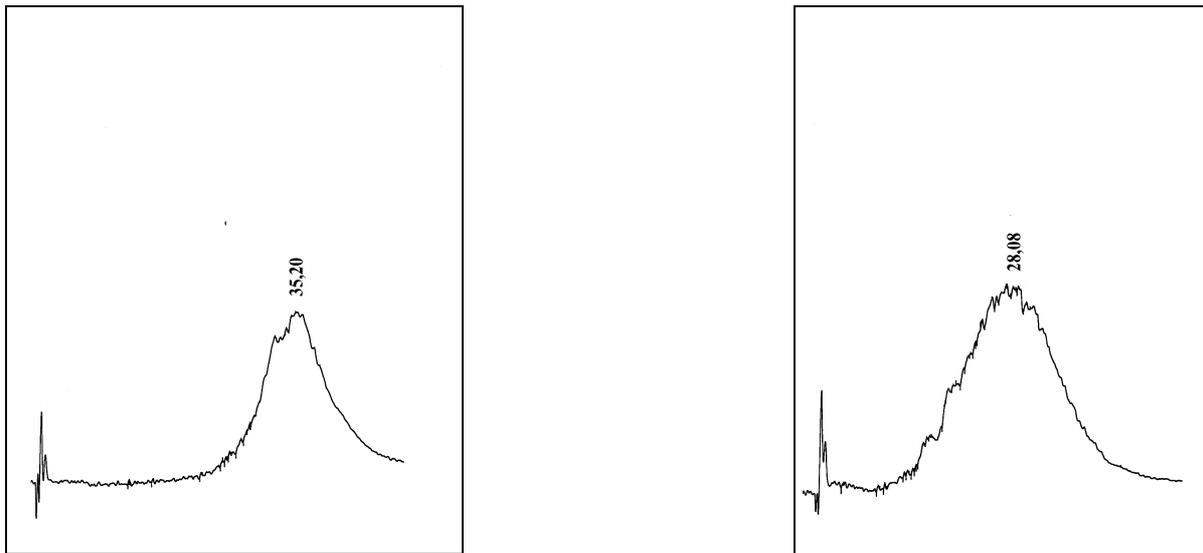


Abb. 16: HPLC-Spektren der Acylierung von Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> mit Boc-Phe-Lys(Boc)-Ψ[COCH<sub>2</sub>]Gly-OSu

Die Hauptsequenz startet bei Ile<sup>18</sup> und zeigt deutlich, dass sowohl Lys<sup>26</sup> als auch Lys<sup>41</sup> in der Seitenkette zum größten Teil acyliert worden sind. Zum anderen ist zu erkennen, dass durch die Behandlung mit Aminopeptidase K Arg<sup>17</sup> abgespalten wurde. Dieses deutet darauf hin, dass zum Teil der Ring nicht geschlossen vorliegt und auch Arg<sup>17</sup> in diesem Fall nicht acyliert wurde. Die Nebensequenz startet mit Arg<sup>1</sup> und läuft bis Cys<sup>14</sup>. Es kann kein Phenylalanin in Schritt eins der Sequenzierung nachgewiesen werden. Das zeigt, dass Phe tatsächlich durch Aminopeptidase abgespalten wurde. Es kann nicht geklärt werden, wie stark Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> in Position 17 acyliert wurde und ob der Bindungsloop teilweise geschlossen ist. Ein Maldi-ToF-Ms zeigt die Inhomogenität des TKI-Gemisches mit einer Massenverteilung zwischen 6400 und 7500, was dafür spricht, dass das eingesetzte TKI-Fragment mehrfach acyliert wurde. Ein Hemmtest lässt keinerlei inhibitorische Aktivität erkennen.

Ein weiterer Grund für das Scheitern der Synthese ist die Gefahr der Cyclisierung über die Ketofunktion und die freie NH-Funktion von Phenylalanin nach dem Abspalten der Boc-Schutzgruppe. Hier kann ein Ketopiperazin entstehen, das damit nicht mehr enzymatisch zugänglich ist (vgl. Jean et al., 1995).

Versuche nicht geschlossene Derivate durch Inkubation mit Carboxypeptidase P und Y soweit zu verdauen, dass letztlich nur das intakte Inhibitorderivat zurückbleibt und die zerkleinerten Peptidrückstände durch Säulenchromatographie zu entfernen führen nicht zum gewünschten Produkt.

### 2.3.3 [N-Me-Ava<sup>16,17</sup>]TKI im Vergleich zu [N-Me-Ala<sup>16</sup>]TKI und [Ava<sup>16,17</sup>]TKI

Die N-Methylierung der reactive-site-Bindung des TKI führt zu einem nicht spaltbaren Inhibitor. Methylierte Amidbindungen werden von Serinproteasen nicht angegriffen (Bizzozero & Zweifel, 1975). Bei dem Versuch [N-Me-Ala<sup>16</sup>]TKI zu synthetisieren stellt sich heraus, dass es wie erwartet nicht möglich ist, N-Me-Ala enzymatisch an Lys<sup>15</sup> von Des(Ala<sup>16</sup>)TKI\* zu koppeln. Aber auch der Einbau von Lys-N-Me-Ala scheitert am zu großen sterischen Anspruch beider Reaktionspartner (Groeger, 1994b). Alternativ zum N-Me-Ala ist der Einbau eines flexibleren N-methylierten Peptidanalogs denkbar. Dabei bietet sich N-Methylaminovaleriansäure als Dipeptidanalogen an. [Ava<sup>16,17</sup>]TKI mit der nicht methylierten Aminosäure in Position 16,17 lässt sich problemlos darstellen und besitzt die geforderte Flexibilität, was sich in der Nicht-Permanenz des Inhibitor widerspiegelt. Mit dem Einbau von N-Methylaminovaleriansäure sollte man einen Inhibitor mit nicht spaltbarer *reactive site*-Bindung erhalten, der aber eine vergleichbare Beweglichkeit des Bindungsloops wie [Ava<sup>16,17</sup>]TKI aufweist.

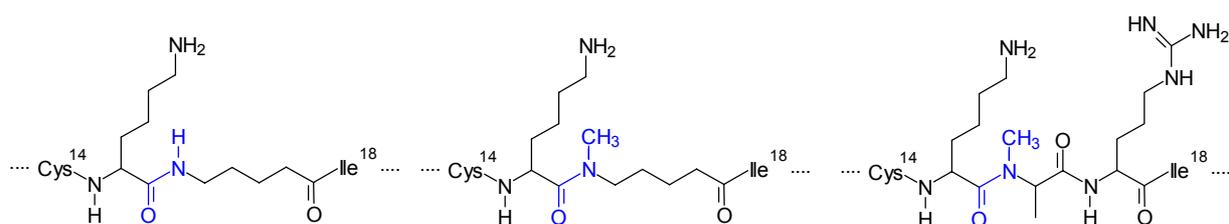
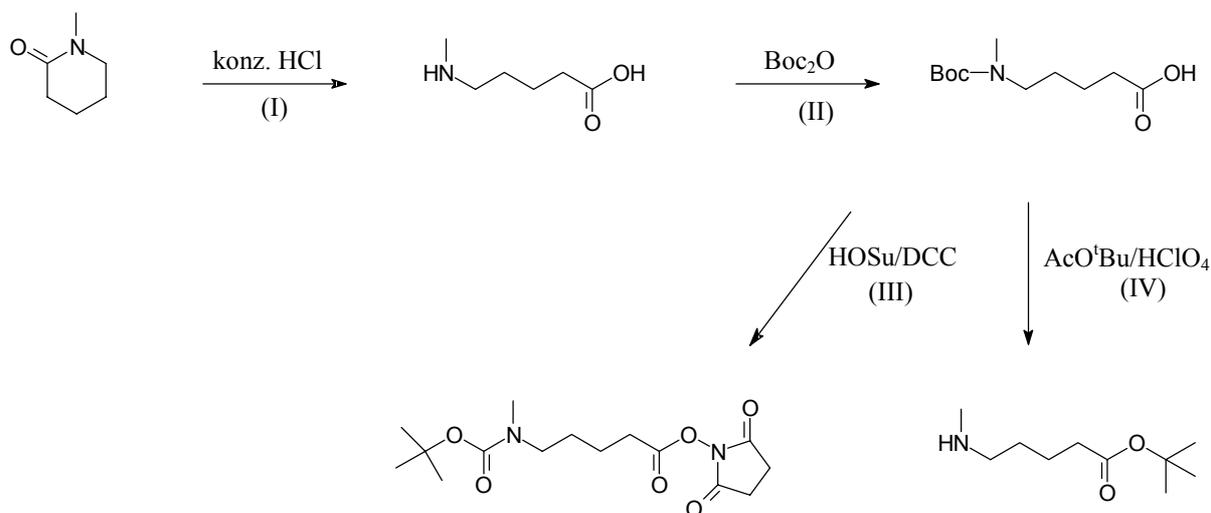
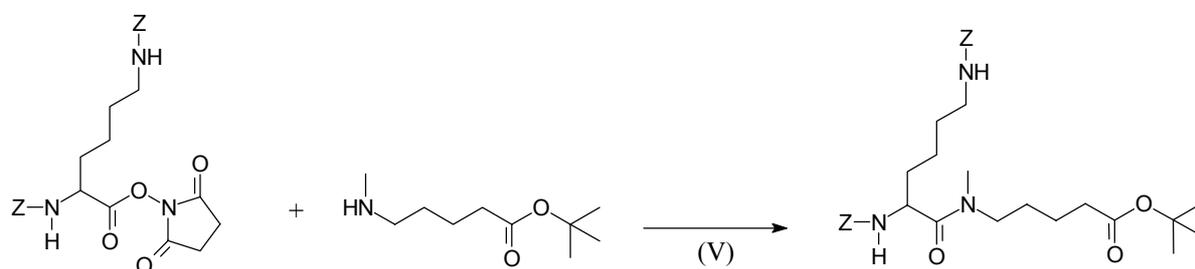


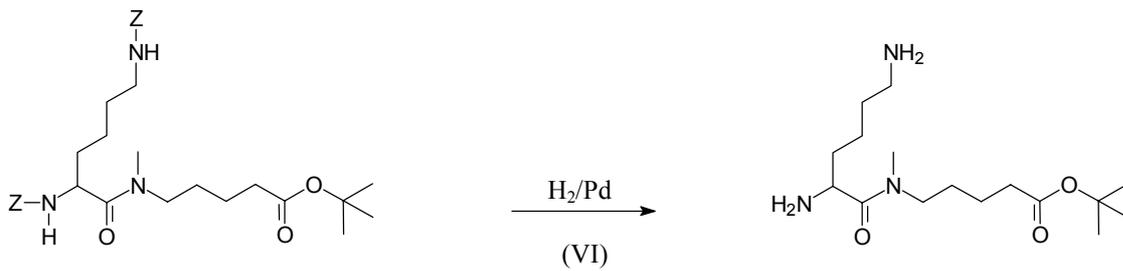
Abb.17: Vergleich der *reactive site*-Bindung von [Ava<sup>16,17</sup>]TKI, [N-Me-Ava<sup>16,17</sup>]TKI und [N-Me-Ala<sup>16</sup>]TKI.

Zur Darstellung einer semisynthetisch wirksamen Verbindung wird N-Methylpiperidon mehrere Stunden in konzentrierter Salzsäure refluxiert (I). Um die dann freie N-Methylaminovaleriansäure zu isolieren, überführt man in die leicht zugängliche Boc-geschützte Aminosäure (II). Von hier ergeben sich verschiedene Möglichkeiten der weiteren Vorgehensweise. Eine Umsetzung mit N-Hydroxysuccinimid (III) liefert den Aktivester Boc-N-Me-Ava-OSu der durch pH gesteuerte Acylierung in das sehr leicht zugängliche TKI-Derivat Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\* eingebracht werden kann. Eine Umesterung in Essigsäure-tert. Butylester mit gleichzeitiger Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe (IV) liefert N-Me-Ava-O<sup>t</sup>Bu, welches durch enzymatisch-chemische Semisynthese in Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\* oder chemische Semisynthese in Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(OMe)<sub>5</sub> eingebaut werden kann. Eine Acylierung gelingt mit guten Ausbeuten, beide Konzepte scheitern jedoch wie erwartet an dem enzymatischen Syntheseschritt (Bizzozero & Zweifel, 1975; Groeger, 1994b).



Genauso wenig gelingt die chemische Knüpfung der Bindung 15-16 mit EDC/HOBt. Hier ist zum einen der höhere  $\text{pK}_a$  der  $\delta$ -Aminofunktion der N-Methylvaleriansäure verantwortlich, so dass bei pH 4,75 die Aminofunktion zum größten Teil protoniert vorliegt und damit wenig reaktiv ist. Eine Erhöhung des pH-Wertes bei der Reaktion führt aber zu unerwünschten Nebenprodukten, da natürlich auch die  $\epsilon$ -Aminofunktionen der Lysinseitenketten des TKI mit zunehmendem pH-Wert reaktiver werden und es so zu Dimer- bzw. Polymerbildung kommt (vgl. Groeger, 1994b). Der zweite Grund für das träge Reaktionsverhalten ist möglicherweise auch die sterische Hinderung durch die zusätzliche N-Methylgruppe. Das bestätigt sich auch bei der Kopplung von Z-Lys(Z)-OH mit N-Me-Ava-OtBu unter Verwendung von gängigen Kopplungsreagenzien, die nur mit sehr geringer Ausbeuten verlaufen. Die besten Ergebnisse erzielt man wenn der Aktivester der Lysinkomponente mit N-Me-Ava-O<sup>t</sup>Bu umgesetzt wird (V). Abschließende Hydrierung (VI) liefert das einbaufähige Derivat Lys-N-Me-Ava-O<sup>t</sup>Bu.





Lys-N-Me-Ava-O<sup>t</sup>Bu wird durch chemische Semisynthese in TKI eingebracht (vergl. Abb. 4). Zunächst wird an Cys<sup>14</sup> im Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(OMe)<sub>5</sub> gekoppelt. Nach Abspalten des tert.-Butylesters in TFA wird die Bindung 17-18 mittels EDC/HOBt geschlossen. Nach Verseifen der Methyl ester und Aufreinigung durch Kationenaustauschchromatographie erhält man ein homogenes TKI-Derivat mit einer Retentionszeit von 16,5 min Sequenzanalysen nach Edman sowie ein Ionenspray-MS (Abb. 18) bestätigen die Identität des TKI-Derivates.

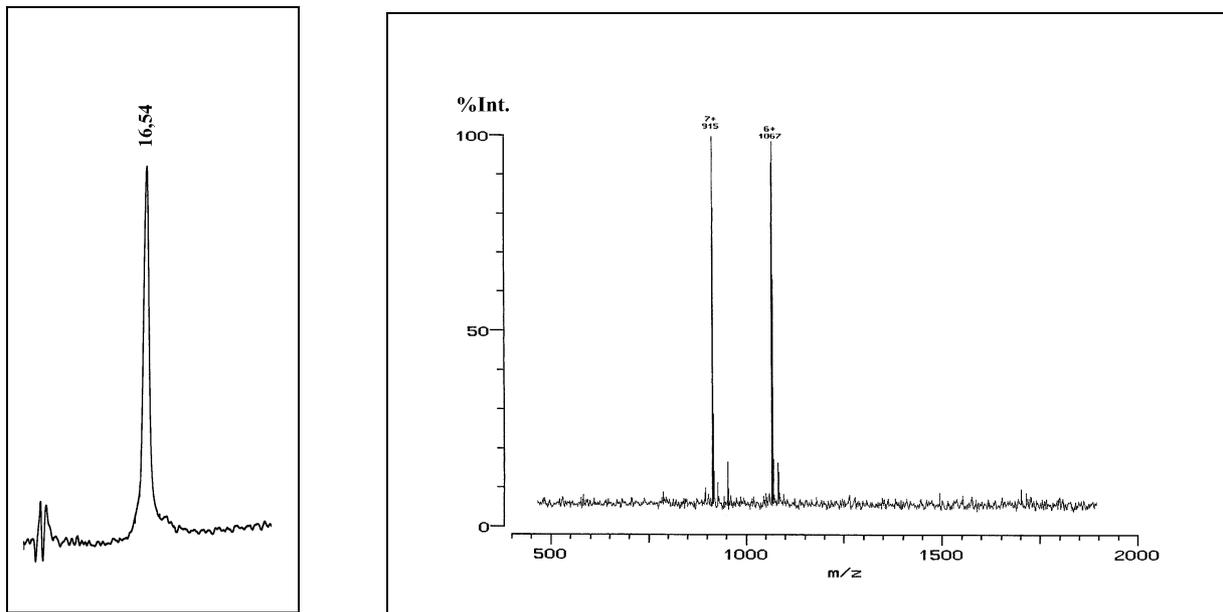


Abb. 18: HPLC-Spektrum ( $R_t$  16,5 min) und Ionen-Spray-MS von [N-Me-Ava<sup>16,17</sup>]TKI ( M: 6397,3, gemessen: M. 6397,7 aus : m/z =915,1, z = 7 und 1067,3, z = 7)

Die Messungen der Hemmeigenschaften gegenüber Trypsin und Kallikrein sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Dissoziationskonstanten  $K_d$  [M]:

	Trypsin	Kallikrein
[Ava <sup>16,17</sup> ]TKI	$2 \times 10^{-9}$	$4 \times 10^{-8}$
[N-Me-Ava <sup>16,17</sup> ]TKI	-	-
[N-Me-Ala <sup>16</sup> ]TKI*	-	-

- : kein Inhibitor,

Tabelle 2: Dissoziationskonstanten der *reactive site*-Derivat-Enzym-Komplexe

Während [Ava<sup>16,17</sup>]TKI Trypsin und Kallikrein gut hemmt, besitzt [N-Me-Ava<sup>16,17</sup>]TKI keinerlei inhibitorische Aktivität. Auch [N-Me-Ala<sup>16</sup>]TKI\* ist für beide Enzyme kein Inhibitor. Allerdings gelingt es erstmals ein TKI-Derivat mit N-methylierter *reactive site*-Bindung und geschlossenem Bindungsloop darzustellen. Wie erwartet war es auch hier nicht möglich N-Me-Ava-O<sup>t</sup>Bu enzymatisch an Lys<sup>15</sup> in Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI zu koppeln. Auch die chemische Kopplung von N-Me-Ava-O<sup>t</sup>Bu an Lys<sup>15</sup> gelingt nicht, da der sterische Anspruch der zusätzlichen Methylfunktion sehr groß zu sein scheint. Nur die Knüpfung der Bindung durch Reaktion von Lys-OSu mit N-Me-Ava-O<sup>t</sup>Bu und anschließendem semisynthetischen Einbau des Tripeptidanalogs in Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> führt zum Erfolg. Dabei ist zu beachten, dass auch die Bindung 17-18 problemlos durch EDC-Kopplung geschlossen werden kann, wohingegen die Knüpfung der korrelierenden Bindung 16-17 im [N-Me-Ala<sup>16</sup>]TKI\*(<sup>16,17</sup>) nicht möglich ist (Groeger, 1994b).

Im Gegensatz zu [Ava<sup>16,17</sup>]TKI, mit einer Dissoziationskonstanten von  $2 \times 10^{-9}$  M gegen Trypsin bzw.  $4 \times 10^{-8}$  M gegen Kallikrein, zeigt [N-Me-Ava<sup>16,17</sup>]TKI keinerlei inhibitorische Aktivität. Der Verlust der Hemmeigenschaften ist also allein durch die Einführung der N-Methylamidbindung zu erklären. Offensichtlich ist eine Methylfunktion an der *reactive site*-Bindung im Inhibitor sterisch so sehr anspruchsvoll, dass der Inhibitor nicht mehr in das Enzym eingepasst wird.

### 2.3.4 Semisynthese von $\alpha$ -Ketoamid-TKI und $\alpha$ -Hydroxyamid-TKI

Abgeleitet vom [Ava<sup>16,17</sup>]TKI soll das Strukturelement  $\alpha$ -Ketoamid bzw. dessen Vorstufe  $\alpha$ -Hydroxyamid in TKI eingebaut werden. Das  $\alpha$ -Ketoamid ist aus einer Verbindung bekannt,

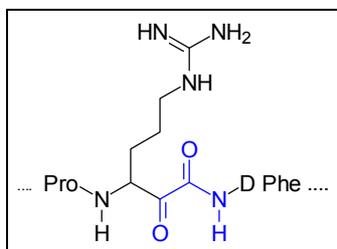


Abb. 19: Ausschnitt aus CtA

Bindung zu Ser<sup>195</sup> des Trypsins aus. Weitere Wechselwirkungen entstehen durch die Ausbildung von Wasserstoff-Brücken der Amidbindung und die Einlagerung des Phenylrings von D-Phe in eine "aromatische Bindungstasche" (Lee & Clardy, 1994). Interessant wäre es zu wissen ob die Ausbildung einer solchen kovalenten Bindung auch im  $\alpha$ -Ketoamid-TKI-Trypsin-Komplex zustande kommt. Durch das Einführen des Ketoamids wird das *backbone* von Lysin schon um ein Kohlenstoff verlängert. Daher sollen die beiden folgenden Aminosäuren Ala<sup>16</sup> und Arg<sup>17</sup> durch 4-Aminobuttersäure, welche statt sechs *backbone*-Atome nur fünf aufweist, ersetzt werden. Somit erhält man ein TKI-Derivat das dem [Ava<sup>16,17</sup>]TKI ähnelt. [Ava<sup>16,17</sup>]TKI ist ein temporärer Inhibitor der durch fehlende Rigidität langsam vom Trypsin gespalten wird. Der Vergleich der *reactive site*-Bindungen von [Ava<sup>16,17</sup>]- $\alpha$ -Hydroxyamid- und  $\alpha$ -Ketoamid-TKI zeigt, dass Trypsin nicht in der Lage ist die Bindung zu spalten und damit ein permanenter Inhibitor entstehen sollte.

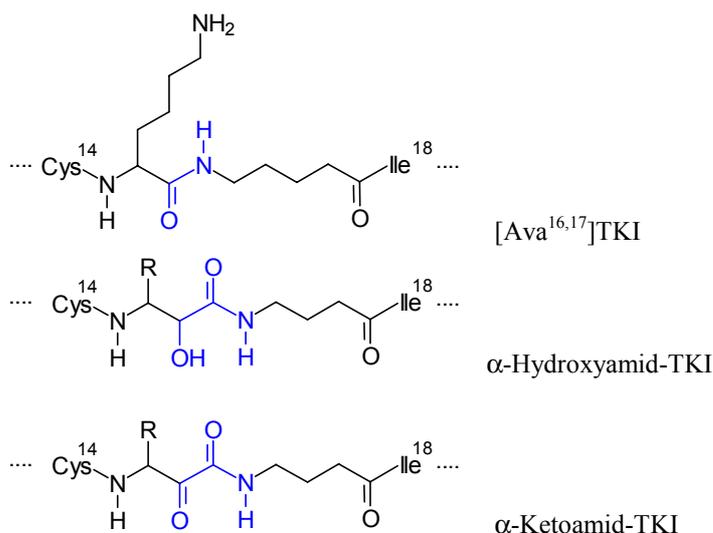
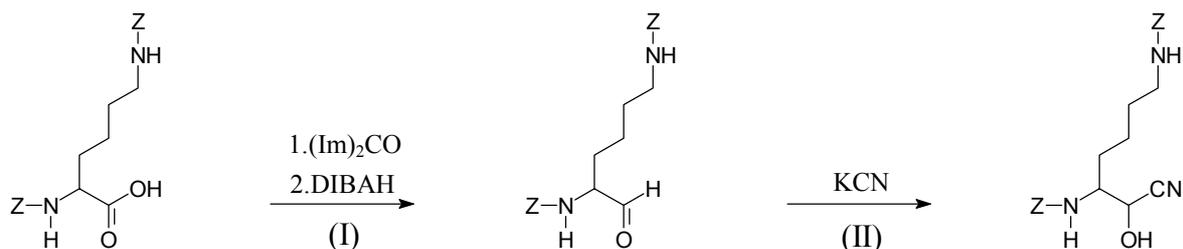
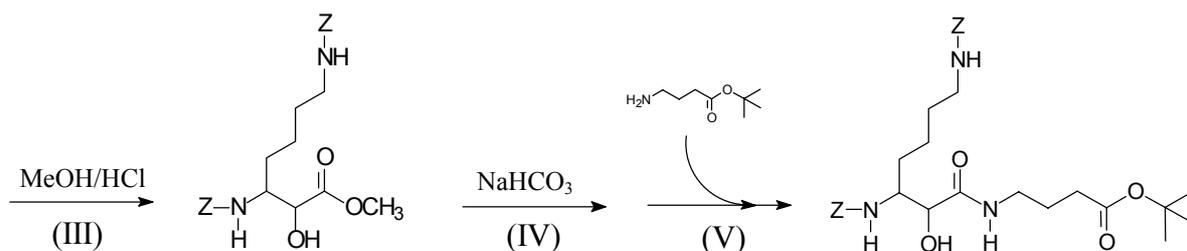


Abb. 20: Vergleich der *reactive site*-Bindungen von [Ava<sup>16,17</sup>]- $\alpha$ -Hydroxyamid- und  $\alpha$ -Ketoamid-TKI

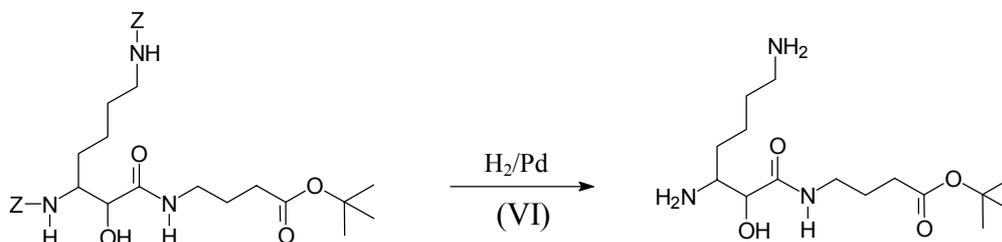
Die Synthese eines einbaufähigen Derivates ist abgeleitet von der ersten Totalsynthese des Cyclotheonamid A (Maryanoff et al. 1993) bzw. der Totalsynthese von Cyclotheonamid B (Hagihara & Schreiber, 1992). Z-geschütztes Lysin wird zunächst über eine Imidazolzwischenstufe durch das sehr selektive Reduktionsreagenz Diisobutylaluminiumhydrid in den Aldehyd überführt (I).



Durch Behandlung mit wässriger Cyanidlösung (II) entsteht das Cyanhydrin, welches in absolutem Methanol durch Einleiten von gasförmiger HCl bei  $-78^\circ\text{C}$  (III) zum Methylester umgesetzt wird. Nach dem Abspalten des Methylesters (IV) wird mit Hilfe des Kopplungsreagenzes Brop an 4-Aminobuttersäure-tert-Butylester gekoppelt (V). 4-Abu-O<sup>t</sup>Bu wurde durch Umesterung bei gleichzeitigem Abspalten der N-Schutzgruppe aus Boc-4-Abu in Essigsäure-tert.-butylester und Perchlorsäure gewonnen.



Die Oxidation der Hydroxylfunktion wurde mit gängigen Oxidationsmittel bereits auf der Stufe des Methylesters versucht, gelang aber nur unzureichend unter Entstehung von sehr vielen Nebenprodukten und war dadurch mit sehr hohen Verlusten verbunden. Eine Oxidation mit milden Oxidationsmitteln (Dess & Martin, 1991; Cacciola et al., 1997) ist aber auch nach dem Einbau in TKI noch möglich. Die Möglichkeit, dass der Methioninrest Met<sup>52</sup> dabei ebenfalls oxidiert wird, kann wie oben bereits beschrieben in Kauf genommen werden.



Hydrierung unter Normaldruck (VI) liefert das  $\alpha$ -Hydroxyamidderivat, welches durch chemische Semisynthese in Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> eingebaut werden soll. Die organisch-synthetischen Schritte bereiten keine Probleme. Das  $\alpha$ -Hydroxyamidderivat lässt sich in guten Ausbeuten darstellen.

Die Kopplung an Cys<sup>14</sup> in Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> erfolgt ohne Schwierigkeiten, aber schon beim nächsten Schritt, der Abspaltung des tert.-Butylesters mit 100%iger TFA kommt es zur Bildung von Nebenprodukten. Das Schließen der 2. Bindung und abschließende Abspaltung der Methylester führt nicht zu einem einheitlichen Produkt und ist zudem mit sehr großen Verlusten verbunden.

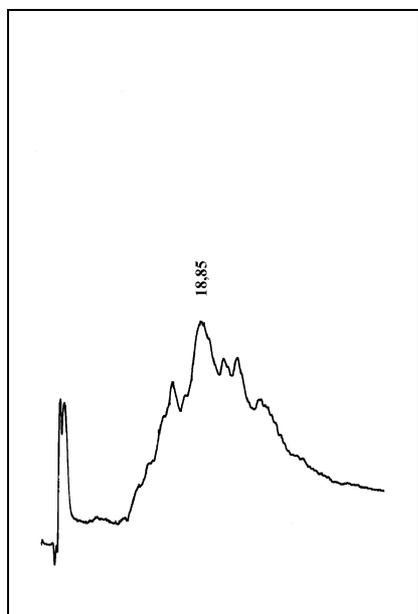


Abb. 21: HPLC nach Verseifung und Säulenchromatographie

Auch nach mehrmaligen Versuchen gelingt es nicht die Synthese weiter zu optimieren. Letztendlich konnte kein Produkt isoliert werden.

### 2.3.5 Semisynthese von $[\alpha\text{-Me-Ala}^{16}]\text{TKI}$ und $[\alpha\text{-Hbs}^{16}]\text{TKI}$

Eine Esterbindung ist einer Amidbindung strukturell sehr ähnlich (Steiner & Barnes, 1988), so dass es Bemühungen gibt Esterbindungen in kleineren Peptiden (Arad & Goodman, 1990) oder in Enzymsubstraten (Bramson et al., 1985) einzuführen. Auch Totalsynthesen größerer Proteine mit Esterbindungen sind bekannt (Muir, 1995). TKI-Derivate, die eine Esterbindung anstelle der *reactive site*-Amidbindung aufweisen,  $[\text{Lys}^{15}\Psi[\text{COO}]\text{Gly}^{16}]\text{TKI}(\text{Me})_5$  und  $[\text{Ala}^{15}\Psi[\text{COO}]\text{Gly}^{16}]\text{TKI}(\text{Me})_5$  wurden durch chemische Semisynthese dargestellt. Allerdings weisen diese Homologen keinerlei inhibitorische Aktivität auf und werden vom Enzym wie ein Substrat umgesetzt. Durch die Synthese eines TKI-Derivates mit zusätzlicher Methylfunktion an  $\text{Ala}^{16}$  bzw. dem entsprechenden Analogon mit OH-Funktion statt  $\text{NH}_2$ -Funktion, der  $\alpha$ -Hydroxyisobuttersäure, soll eine derart sterisch anspruchsvolle Region entstehen, die eine Spaltung der *reactive site*-Bindung durch das Enzym erschwert oder sogar verhindert, ohne dass die Akzeptanz vom Enzym verloren geht.

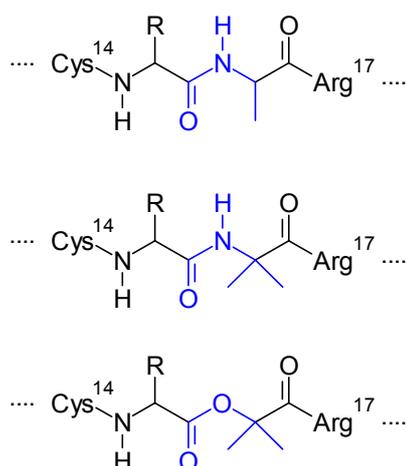


Abb. 22: Vergleich der *reactive site*-Bindung von nativem TKI,  $[\alpha\text{-Me-Ala}^{16}]\text{TKI}$  und  $[\alpha\text{-Hbs}^{16}]\text{TKI}$

Der einfachste denkbare Weg zum Einbau der gewünschten Strukturelemente ist die chemische Semisynthese durch pH-gesteuerte Acylierung an  $\text{Des}(\text{Ala}^{16})\text{TKI}^*(\text{Me})_5$  mit anschließender Synthese der zweiten Bindung durch EDC/HOBt (Abb.7). Dabei wird der Aktivester von  $\alpha$ -Hbs ohne weitere Schutzgruppen direkt verwendet, während der Aktivester von  $\alpha$ -Me-Ala

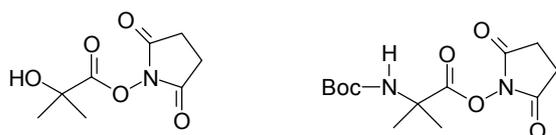


Abb. 23:  $\alpha$ -Hbs-OSu und Boc- $\alpha$ -MeAla-OSu

Boc-geschützt eingesetzt wird und im zweiten Schritt zunächst durch TFA entschützt werden muss.

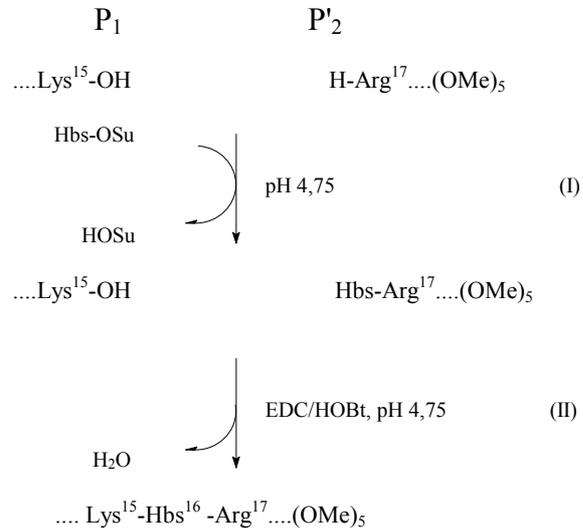
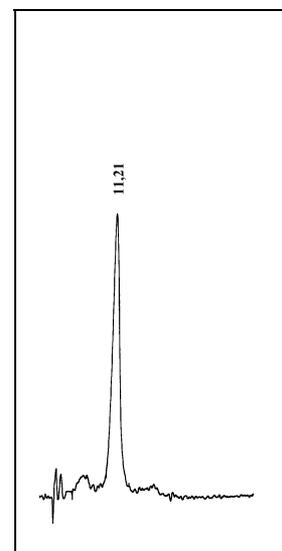
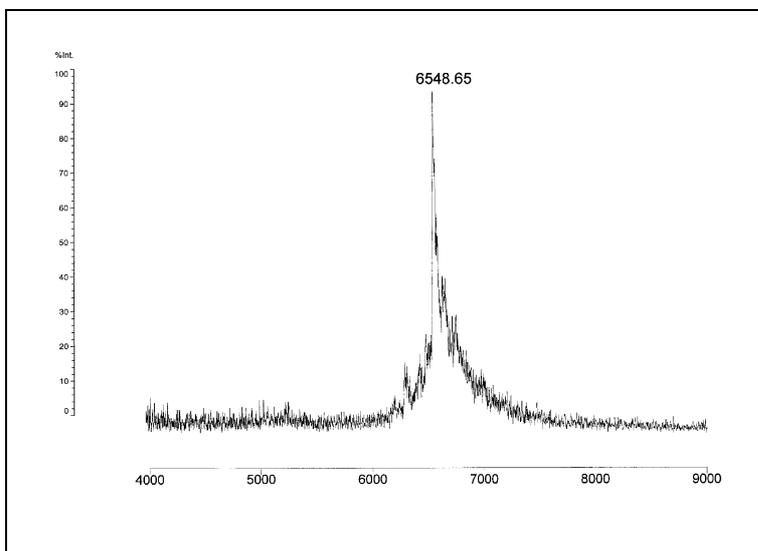


Abb. 24: Semisynthese von  $[\alpha\text{-Hbs}^{16}]\text{TKI}$  durch pH-gesteuerte Acylierung

Die Acylierung gelingt in beiden Fällen mit guten Ausbeuten. Der Ringschluss durch EDC-Kopplung ist aber sowohl bei  $[\alpha\text{-Hbs}^{16}]\text{TKI}^*(\text{Me})_5$  als auch bei  $[\alpha\text{-Me-Ala}^{16}]\text{TKI}^*(\text{Me})_5$  nicht möglich. Auch der Versuch des Ringschlusses durch Trypsin-katalysierte Synthese der *reactive site*-Bindung misslingt bei beiden acylierten TKI\*-Derivaten. Nach Verseifung der Methylester und Aufreinigung durch Ionenaustauschchromatographie erhält man  $[\alpha\text{-Hbs}^{16}]\text{TKI}^*$  ( $R_t$  11,2 min) und  $[\alpha\text{-Me-Ala}^{16}]\text{TKI}^*$  ( $R_t$  18,3 min).



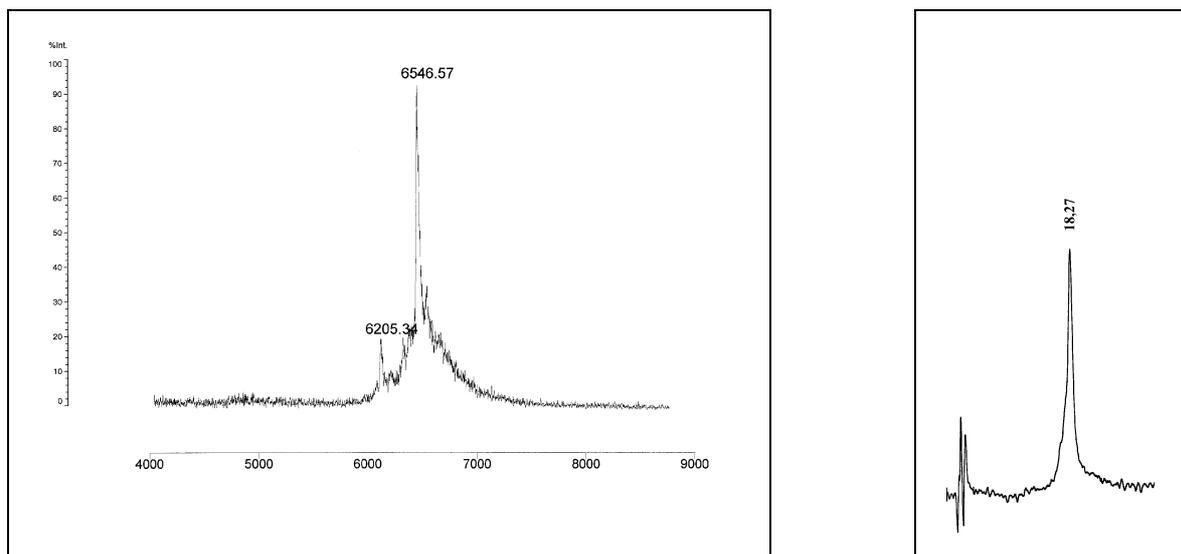
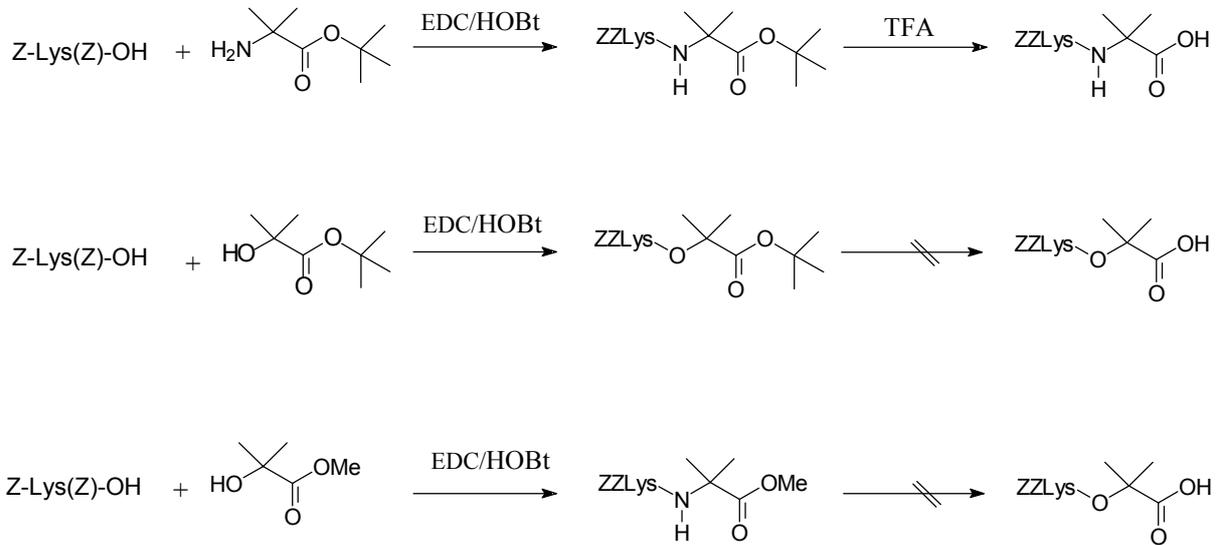


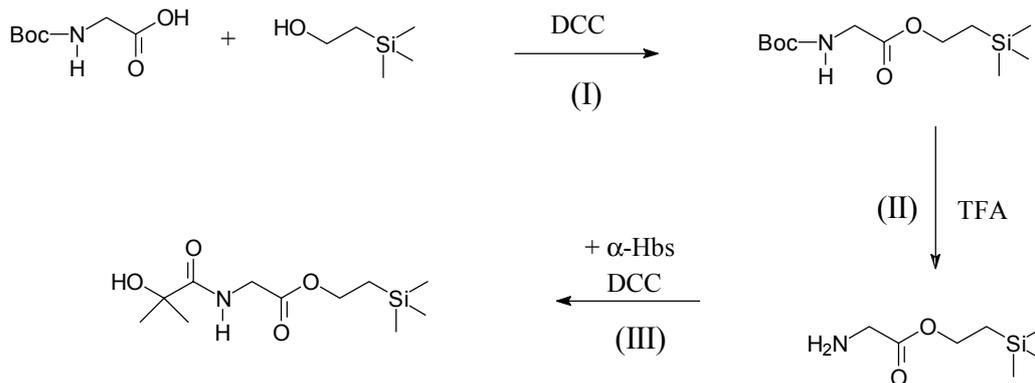
Abb. 25: HPLC- und Maldi-MS-Spektren von  $[\alpha\text{-Hbs}^{16}]\text{TKI}^*$  ( $R_t$  11.2 min) und  $[\alpha\text{-Me-Ala}^{16}]\text{TKI}^*$  ( $R_t$  18,3 min).  $M([\alpha\text{-Hbs}^{16}]\text{TKI}^*)$ : 6544,5, gemessen 6548,7;  $M([\alpha\text{-Me-Ala}^{16}]\text{TKI}^*)$ : 6543,5, gemessen 6546,6.

Das Scheitern der Synthese der zweiten Bindung deutet darauf hin, dass eine sterische Hinderung dafür verantwortlich ist. Wie der Vergleich der *reactive site*-Region in Abb.22 zeigt ist der einzige Unterschied zwischen nativem und  $[\alpha\text{-Me-Ala}^{16}]\text{TKI}^*$  die zusätzliche Methylgruppe. Bekanntlich lässt sich aber die *reactive site*-Bindung im nativen TKI\* enzymatisch ohne Probleme schließen.

Die Synthese des  $\alpha$ -Metyl-TKI-Derivates kann auch durch Einführen des Fragmentes Lys- $\alpha$ -Me-Ala-O<sup>t</sup>Bu erfolgen. Dazu wird zunächst Z-Lys(Z)-OH mit Hilfe von EDC/HOBt an  $\alpha$ -Me-Ala-O<sup>t</sup>Bu gekoppelt. Nach Hydrieren mit Pd/H<sub>2</sub> erhält man Lys- $\alpha$ -Me-Ala-O<sup>t</sup>Bu, welches durch chemische Semisynthese an Cys<sup>14</sup> im Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> gekoppelt werden kann. Nach Abspalten der tert.-Butyl-Funktion mittels TFA gelingt das Schließen der Bindung 16-17 durch EDC/HOBt und man erhält  $[\alpha\text{-Me-Ala}^{16}]\text{TKI}^*$  in etwa 5 %iger Ausbeute. Dieser Weg lässt sich aber nicht auf  $\alpha$ -Hbs übertragen. Vorversuche zeigen, dass zwar die Kopplung von Z-Lys(Z)-OH an  $\alpha$ -Hbs analog der Kopplung von  $\alpha$ -Me-Ala verläuft, eine selektive Abspaltung des tert.-Butylesters in TFA jedoch nicht möglich ist. Vielmehr wird durch die saure Esterspaltung auch die interne Esterbindung angegriffen, so dass man ausschließlich Z-Lys(Z)-OH und  $\alpha$ -Hbs-OH erhält. Betrachtet man die interne Esterbindung wie eine tertiäre Esterbindung, so müsste diese gegen eine basischen Esterspaltung resistent sein. Wiederum zeigt ein Vorversuch, dass die Kopplung von Z-Lys(Z)-OH mit  $\alpha$ -Hbs-OMe in guten Ausbeuten verläuft, die Entfernung des Methylesters mit Base jedoch auch in diesem Fall zur Spaltung der internen Esterbindung führt.

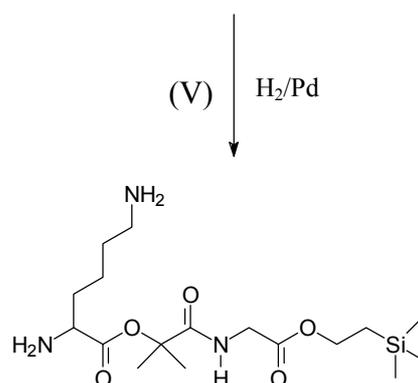
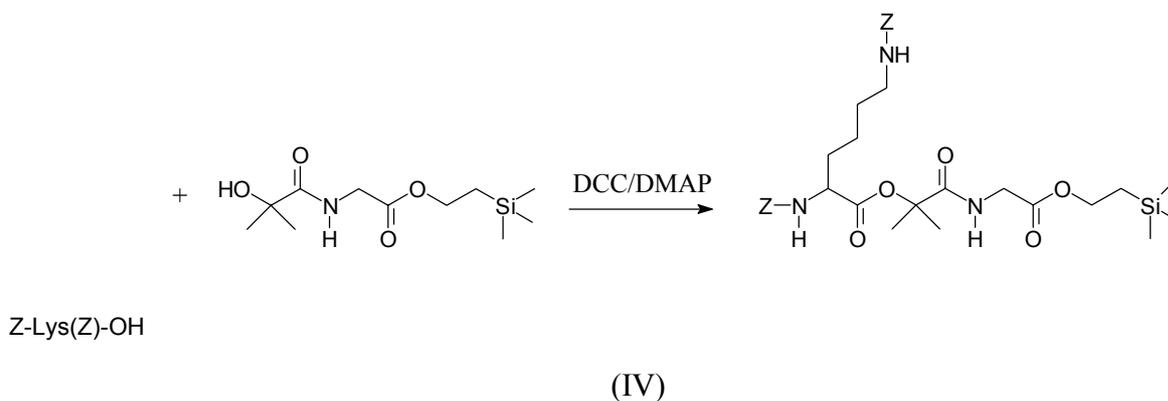


Die gut bewährte Schutzgruppentechnik führt in diesem Fall nicht zum Erfolg. Eine Schutzgruppe, die sich entfernen lässt ohne primäre oder tertiäre Esterschutzgruppen zu beeinflussen, ist die TMSE-Funktion (Sieber, 1977). Vorversuche zeigen, dass bei den Abspaltungsbedingungen des TMSE-Esters die interne Esterbindung im Lys- $\alpha$ -Hbs-Derivat erhalten bleibt. Die direkte Kopplung von TMSE-OH an  $\alpha$ -Hbs ist jedoch nicht möglich, daher wird Glycin als *Linker* benutzt, so dass man ein Tripeptidanalogen erhält, welches dann in Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> eingebaut werden soll.



Glycin wird zunächst Boc-geschützt und dann mit 2-(Trimethylsilyl)-ethanol verestert (I). Nach Entfernen der Boc-Schutzgruppe in Trifluorethanol/HCl (II) wird  $\alpha$ -Hbs mit Hilfe von DCC an Gly-OTMSE gekoppelt (III). Vorhergehende Versuche haben gezeigt, dass die OH-Funktion von  $\alpha$ -Hbs in diesem Fall keine Schutzgruppe benötigt. Es wird bevorzugt an die

NH-Funktion von Gly-OTMSE gekoppelt und es kommt nicht zu einer Dimer- oder Polymerbildung der Alkoholkomponente. Die Kopplung von Z-Lys(Z)-OH mit  $\alpha$ -Hbs-Gly-OTMSE gelingt am besten unter Verwendung von DCC/DMAP als Kopplungsreagenzien (IV). Abschließende Hydrierung (V) liefert das einbaufähige Lys- $\alpha$ -Hbs-Gly-OTMSE.



Die Kopplung von Lys- $\alpha$ -Hbs-Gly-OTMSE an Cys<sup>14</sup> in Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> verläuft in guten Ausbeuten. Die nachfolgende Abspaltung des TMSE-Esters gestaltet sich zunächst schwierig, da durch die gängigen Abspaltungsreagenzien Tetrabutylammoniumfluorid oder Tetraethylammoniumfluorid die Cysteinbrücken im TKI zum Teil angegriffen werden und die Reaktion dadurch im HPLC nicht mehr zu verfolgen ist. Zugabe von Glutathion verhindert diese Reaktion verlangsamt aber auch das Entfernen des TMSE-Esters. Dennoch gelingt die Abspaltung des Esters. Das Schließen der Bindung 17-18 führt nicht zum gewünschten Produkt. Es kann keine eindeutige Reaktion festgestellt werden. Auch hier kann selbst nach mehreren Optimierungsversuchen letztendlich nicht das gewünschte TKI-Derivat erhalten werden.

Die Ergebnisse der Hemmtests von [ $\alpha$ -Me-Ala<sup>16</sup>]TKI und den dargestellten Vorstufen des [ $\alpha$ -Hbs<sup>16</sup>]TKI sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Dissoziationsstanten  $K_d$  [M]:

	Trypsin	Kallikrein
$[\alpha\text{-Me-Ala}^{16}]\text{TKI}^*$	-	-
$[\alpha\text{-Hbs}^{16}]\text{TKI}^*$	-	-
TKI	$4 \times 10^{-13}$	$3 \times 10^{-10}$
$[\alpha\text{-Me-Ala}^{16}]\text{TKI}$	$1 \times 10^{-13}$	$3 \times 10^{-10}$
$[\alpha\text{-Hbs}^{16}\text{Gly}^{17}\text{-OTMSE}]\text{TKI}^{*(17,18)}(\text{Me})_5$	-	-

-: kein Inhibitor

Tabelle 3: Dissoziationskonstanten von TKI,  $[\alpha\text{-Me-Ala}^{16}]\text{TKI}$ ,  $[\alpha\text{-Me-Ala}^{16}]\text{TKI}^*$ ,  $[\alpha\text{-Hbs}^{16}]\text{TKI}^*$  und  $[\alpha\text{-Hbs}^{16}\text{Gly}^{17}\text{-OTMSE}]\text{TKI}^{*(17,18)}(\text{Me})_5$  im Trypsin- und Kallikrein-Komplex

Die durch pH-gesteuerte Acylierung entstandenen TKI-Derivate  $[\alpha\text{-Me-Ala}^{16}]\text{TKI}^*$  und  $[\alpha\text{-Hbs}^{16}]\text{TKI}^*$  sind inhibitorisch nicht aktiv, dagegen verliert der gespaltenen native Inhibitor TKI\* nicht die Bindungsfähigkeit zum Enzym und dessen hydrolysierte Bindung wird vom Enzym resynthetisiert. Eine Trypsin katalysierte Synthese von Esterbindungen ist laut Literaturangaben zwar möglich (Yagisawa, 1981), gelingt aber auch bei der Synthese von  $[\text{Lys}^{15}\Psi[\text{COO}]\text{Gly}^{16}]\text{TKI}(\text{Me})_5$  und  $[\text{Ala}^{15}\Psi[\text{COO}]\text{Gly}^{16}]\text{TKI}(\text{Me})_5$  nicht (Groeger, 1994b). Da die enzymatische Knüpfung der *reactive site*-Bindung auch bei  $[\alpha\text{-Me-Ala}^{16}]\text{TKI}^*$  nicht möglich ist, muss die gegenüber dem nativen Inhibitor zusätzlich eingeführte Methylfunktion in der  $\alpha$ -Position von  $\text{Ala}^{16}$  bzw.  $\text{Hbs}^{16}$  dafür verantwortlich sein.

Die Synthese von  $[\alpha\text{-Me-Ala}^{16}]\text{TKI}$  gelingt durch enzymatische Semisynthese von Lys- $\alpha$ -Me-Ala-O<sup>t</sup>Bu mit Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub>. Das Hemmverhalten dieser TKI-Variante ist dem des nativen Inhibitors sehr ähnlich. TKI hemmt Trypsin mit einer Dissoziationskonstanten von  $4 \times 10^{-13}$  M, während für  $[\alpha\text{-Me-Ala}^{16}]\text{TKI}$   $1 \times 10^{-13}$  M gemessen wird. Beide Werte liegen in der selben Größenordnung. Die leichte Differenz lässt sich durch die sehr große Empfindlichkeit des Hemmtests nach Geiger und Fritz erklären, denn die Dissoziationskonstanten des Hemmtests gegen Kallikrein sind mit einer Dissoziationskonstanten von  $3 \times 10^{-10}$  M identisch. Die zusätzliche Methylfunktion an  $\text{Ala}^{16}$  vermindert also nicht die Akzeptanz des Enzyms zur neuen Inhibitorvariante. Dagegen zeigt das Scheitern des Versuchs, die *reactive site*-Bindung enzymatisch bzw. chemisch zu schließen, dass die zusätzliche Methylfunktion sehr wohl in der Lage ist die *reactive site*-Bindung sterisch abzuschirmen, was die geforderte Anforderung war um diese Bindung durch eine Esterbindung zu ersetzen, die vom Enzym nicht angegriffen werden kann.

Vorversuche, die Schutzgruppentechnik auf die interne Esterbindung abzustimmen, zeigen schon die erwarteten Schwierigkeiten bei der semisynthetischen Darstellung des Esterderivates  $[\alpha\text{-Hbs}^{16}]\text{TKI}$ . Die interne Esterbindung zeigt sowohl Eigenschaften einer primären als auch einer tertiären Esterbindung, so dass die bei der Semisynthese bewährte

Methylester/tert.-Butylester Schutzgruppenstrategie nicht angewendet werden kann ohne die entscheidende Esterbindung zu zerstören. Eine neu erprobte Technik, den tert.-Butylester durch einen TMSE-Ester zu ersetzen, bewahrt die Esterbindung 15-16 vor einer Spaltung. Die Semisynthese führt aber nicht zum geschlossenen TKI-Derivat. Dabei kann nicht geklärt werden, ob die verwendeten Abspaltungsreagenzien tatsächlich nur die TMSE-Schutzgruppe im TKI abspalten, doch die Esterbindung 15-16 zum Teil angreifen oder sogar das eingesetzte TKI-Derivat völlig zerstören.

### 2.3.6 Hemmeigenschaften der *backbone*-Derivate des TKI gegen Kallikrein

Vergleicht man die Hemmeigenschaften einiger P'-*backbone*-Derivate gegenüber Trypsin miteinander, so stellt man fest, dass die Komplexstabilität deutlich von zwei Faktoren bestimmt wird. Natürlich ist die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken von großer Bedeutung aber auch die Rigidität des Bindungsloops spielt eine wichtige Rolle.

Bei einem Vergleich der Systeme  $[\text{Gly}^{16}\Psi[\text{COCH}_2]\text{Gly}^{17}]\text{TKI}/\text{Trypsin}$  bzw.  $[\text{Gly}^{16}\Psi[\text{COO}]\text{Gly}^{17}]\text{TKI}/\text{Trypsin}$  mit  $[\text{Gly}^{16}, \text{Gly}^{17}]\text{TKI}/\text{Trypsin}$  fällt auf, dass Ketomethylen- und Esterderivat eine Energiedifferenz von ca. 8 kJ/mol zum Amid aufweisen (Groeger, 1993b). Das entspricht in etwa dem Energiebeitrag einer Wasserstoffbrücke (Murphy & Freie, 1992; Lu et al. 1997). Bei beiden Derivaten fehlt die Fähigkeit zur Ausbildung der H-Brücke zwischen NH der Bindung 16-17 des Inhibitors und dem CO von Phe<sup>41</sup> im Trypsin. Die Energiedifferenz zwischen  $[\text{Gly}^{16}\Psi[\text{CH}_2\text{CH}_2]\text{Gly}^{17}]\text{TKI}$  und  $[\text{Gly}^{16}, \text{Gly}^{17}]\text{TKI}$  beträgt sogar 17 kJ/mol, das entspricht dem Beitrag zweier Wasserstoffbrücken. Hier fehlt neben der ursprünglichen NH-Funktion auch die CO-Funktion, die prinzipiell zur Ausbildung von H-Brücken befähigt ist. Diese Tatsache lässt die Vermutung zu, dass eine H-Brücke zwischen der P'<sub>1</sub>-CO-Gruppe und dem NH von Gly<sup>193</sup> im Trypsin für die höhere Komplexstabilität verantwortlich ist. Allerdings ist diese Wechselwirkung im nativen Komplex nicht beschrieben. Aber auch die größere Rigidität des Ketomethylen- und Esterderivates gegenüber dem Ethylenderivat könnte dabei entscheidend sein.

Der Vergleich mit  $[\text{Apa}^{16,17}]\text{TKI}$  bringt weitere Erkenntnisse.  $[\text{Apa}^{16,17}]\text{TKI}$  leitet sich vom  $[\text{Gly}^{16}, \text{Gly}^{17}]\text{TKI}$  ab, indem man die P'<sub>1</sub>- und P'<sub>2</sub>-Amidbindung des TKI durch eine trans-Doppelbindung substituiert. Die trans-Doppelbindung ersetzt die Amidbindung durch die weitgehend ähnlichen Bindungslänge und Bindungswinkel (Hann et al., 1980) auf ideale Weise. Zusätzlich verstärkt die Doppelbindung durch weitere Einschränkung der Flexibilität der Peptidkette die Rigidität des Bindungsloops ist aber nicht in der Lage an dieser Stelle der Kontaktregion des Inhibitors eine Wasserstoffbrücke auszubilden.

Abbildung 26 zeigt die P'-Region von  $[\text{Apa}^{16,17}]\text{TKI}$ ,  $[\text{Gly}^{16}\Psi[\text{COCH}_2]\text{Gly}^{17}]\text{TKI}$  und  $[\text{Gly}^{16}\text{Gly}^{17}]\text{TKI}$ . Einen Vergleich der Inhibitor-Trypsin-Komplexstabilitäten zeigt Abb 27. Dabei fällt auf, dass die Differenzen der Stabilisierungsenergien der Trypsin-Komplexe des

[Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]-Derivates und des Ketomethylenderivates, sowie des Ketomethylenderivates und des Apa-Derivates jeweils ca. 8 kJ/mol betragen. Das bestätigt die Annahme, dass die CO-Funktion dieser Bindung in den Inhibitorderivaten [Gly<sup>16</sup>Ψ[COCH<sub>2</sub>]Gly<sup>17</sup>]TKI und

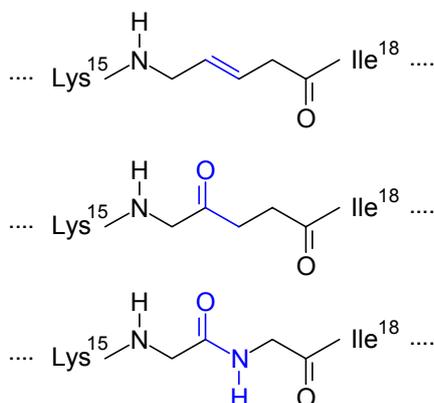
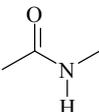


Abb. 26: Vergleich der P<sup>1</sup>-Regionen von [Apa<sup>16,17</sup>]TKI, [Gly<sup>16</sup>Ψ[COCH<sub>2</sub>]Gly<sup>17</sup>]TKI und [Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI

[Gly<sup>16</sup>,Gly<sup>17</sup>]TKI tatsächlich in die Wechselwirkungen zum Enzym einbezogen wird. Zwar sind die geometrischen Voraussetzungen im nativen Komplex nicht optimal (Janin & Chothia, 1976), können aber durch das Fehlen der Arg<sup>17</sup>-Seitenkette hier durchaus günstiger sein (Groeger, 1994b). Die relativ geringe Differenz zwischen Ethylen- und [Apa<sup>16-17</sup>]TKI-Derivat von ca. 2kJ/mol ist damit auf die größere Rigidität des Apa-Derivates zurückzuführen. Im Gegensatz zum temporär hemmenden Ethylen-Derivat wirkt [Apa<sup>16-17</sup>]TKI jedoch als permanenter Inhibitor. Im Gegensatz zur Trypsin-Hemmung betragen die Dissoziationskonstanten des [Apa<sup>16-17</sup>]TKI-Kallikrein-Komplexes und des [Gly<sup>16</sup>,Gly<sup>17</sup>]TKI-Kallikrein-Komplexes jeweils  $4 \times 10^{-9}$  M. Beide Inhibitoren bilden gleichermaßen stabile Komplexe. Möglicherweise sind die geometrischen Gegebenheiten in den Kallikrein-Inhibitor-Komplexen anders, so dass der Wechselwirkung der Amidbindung 16-17 des [Gly<sup>16</sup>,Gly<sup>17</sup>]TKI mit dem Enzym keine Bedeutung zukommt, obwohl im TKI-Kallikrein-Komplex eine Wasserstoffbrücke zwischen der NH-Einheit von Ala<sup>16</sup> des Inhibitors und der CO-Einheit des Gln<sup>41</sup> im Kallikrein beschrieben ist (Abb. 28, Chen & Bode, 1982).

Weitere Erkenntnisse können gewonnen werden, wenn man die Dissoziationskonstanten und damit die Komplexstabilitäten anderer *backbone*-Derivate im TKI-Trypsin-Komplex und TKI-Kallikrein-Komplex miteinander vergleicht. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_d$  werden nach der Methode von Green & Work (1953) berechnet. Die *backbone*-Derivate des TKI werden gegen Pankreas-Kallikrein gemessen. In Tabelle 4 sind die

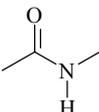
Dissoziationsstanten  $K_d$  [M]:

$P_1' - P_2'$	Kallikrein	Trypsin
	$4 \times 10^{-8}$ t	$2 \times 10^{-9}$ t
	$3 \times 10^{-8}$ n.b.	$5 \times 10^{-11}$
	$9 \times 10^{-9}$ t	$5 \times 10^{-11}$
	$4 \times 10^{-9}$	$1 \times 10^{-9}$
	$4 \times 10^{-9}$	$4 \times 10^{-11}$

t: temporärer Inhibitor (als temporär werden solche Inhibitoren klassifiziert, deren 1:1 Komplexe mit dem Enzym nach 24 h eine signifikante proteolytische Restaktivität aufweisen)

n.b: nicht bestimmt (in diesem Fall war keine ausreichende Menge Inhibitor verfügbar)

Tabelle 4: Dissoziationskonstanten der *backbone*-TKI-Enzym-Komplexe $-\Delta G$  [ KJ/mol]:<sup>(1)</sup>

$P_1' - P_2'$	Kallikrein	Trypsin
	42,2	49,6
	42,9	58,8
	45,9	58,8
	47,9	51,4
	47,9	66,7

<sup>(1)</sup> berechnet nach :  $\Delta G = - RT \ln 1/K_d$

Tabelle 5: Komplexstabilitäten der *backbone*-TKI-Enzym-Komplexe

Dissoziationskonstanten der entsprechenden *backbone*-Derivate zusammengefasst. Zum Vergleich sind die Konstanten der TKI-Trypsin-Komplexe mit aufgeführt.

Aus den Dissoziationskonstanten lassen sich durch Anwendung von  $\Delta G = -RT \ln 1/K_d$  die Komplexstabilitäten der *backbone*-Derivate des TKI im Kallikrein-Komplexe errechnen. Die Werte sind in Tabelle 5 zusammengefasst und werden auch hier mit den entsprechenden TKI-Trypsin-Werten verglichen. In Abbildung 27 sind die Komplexstabilitäten gegeneinander aufgetragen. Im Vergleich mit den ebenfalls dargestellten Stabilitäten des TKI-Trypsin-Komplexe ergibt sich ein völlig anderes Bild. Die Abstände zwischen den verschiedenen *backbone*-Varianten betragen hier nur 2-3 kJ/mol bzw. 5,7 kJ/mol insgesamt. Das Ethylenderivat besitzt die geringste Rigidität der Reihe und damit auch die geringste Stabilität. Es folgt das Ketomethylenderivat. Die COCH<sub>2</sub>-Funktion besitzt zwar eine durchaus genügende Rigidität, ist aber nicht völlig isoster zur Amidbindung. Der Amidbindung ähnlicher ist die

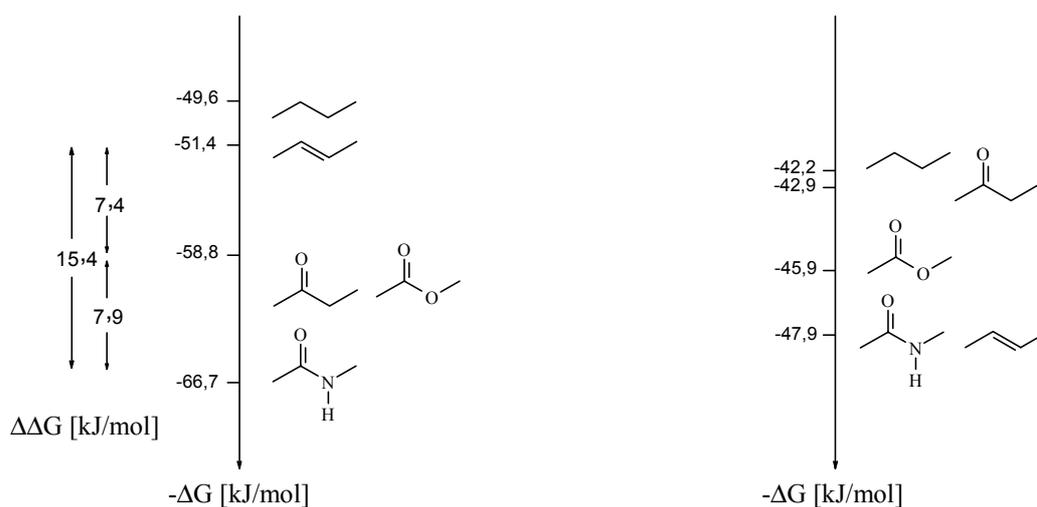


Abb. 27: Vergleich der Trypsin-Inhibitor-Komplexstabilitäten einiger *backbone*-Derivate des TKI. links: *backbone*-TKI-Trypsin Komplexe; rechts *backbone*-TKI-Kallikrein-Komplexe

Esterbindung, wie Röntgenstrukturen belegen (Steiner & Barnes, 1988). Das erklärt die etwas bessere Komplexstabilität. Wie oben schon beschrieben ist eine Amidbindung in ihrer planaren Anordnung der an der Bindung beteiligten Atome und ihrem partiellen Doppelbindungscharakter nahe verwandt mit einer *trans*-Doppelbindung. Das erklärt, warum beide Derivate Kallikrein gleich gut hemmen, wenn man davon ausgeht, dass bei Kallikrein die Abstufung der Komplexstabilitäten nur aufgrund zunehmender bzw. abnehmender Rigidität des Bindungsloops entsteht. H-Brücken zwischen der P<sub>1</sub>'-P<sub>2</sub>'-Bindung und Kallikrein scheinen keine wichtige Rolle zu spielen. Außerdem zeigt sich, dass temporäre Inhibitoren gleichzeitig die weniger rigiden Derivate sind. Diese Ergebnisse unterstreichen die Annahme,

dass die Gegebenheiten im Komplex mit modifiziertem TKI durchaus anders sein können als für den nativen Komplex beschreiben.

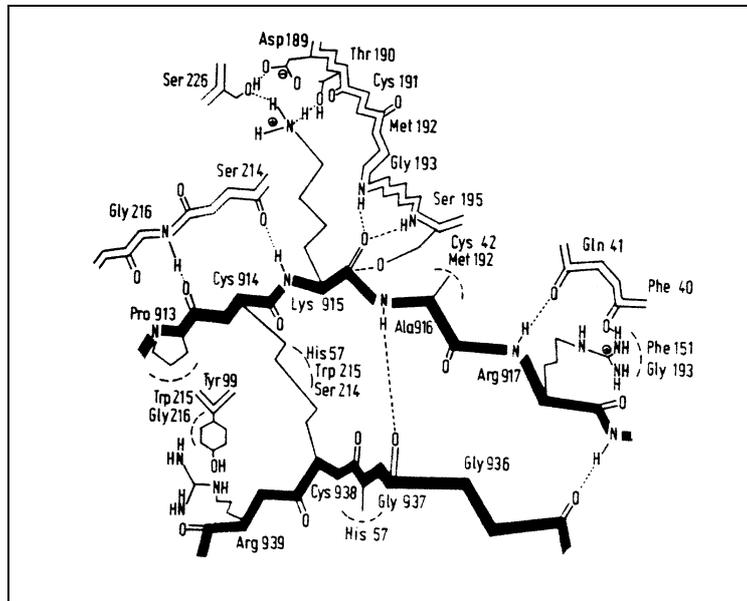


Abb. 28: Ausschnitt aus dem Schema der Wechselwirkungen zwischen TKI und Kallikrein (Chen & Bode, 1982). Die fetten Linien stellen das *backbone* des TKI dar, die offenen Linien gehören zum Trypsin.

Röntgenstrukturanalyse des [Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI-Trypsin-Komplexes zeigen im Bereich des Bindungsloops in ihrer Dichte keine entscheidene Veränderung gegenüber dem TKI-Trypsin-Komplex (Petri, 1995). Die Peptidkette des Inhibitors behält im Bereich der *reactive-site* die Konformation des nativen Komplexes. Damit hat sich keine signifikante Änderung der Wechselwirkungen der Amidbindung 16-17 ergeben, die die experimentellen Ergebnisse unterstützen könnten. Allerdings kann auch hier ein Unterschied zwischen Kristallstruktur und dem Verhalten der Komponenten in Lösung bestehen.

## 2.4 Analytik von TKI-Derivaten

### 2.4.1 HPLC

Für Reaktionskontrollen und zur Überprüfung der Homogenität der semisynthetischen Inhibitoren dient ein Kationenaustausch-HPLC-System nach Wenzel et al. (1985). In erster Näherung werden die TKI-Derivate nach ihrer positiven Nettoladung aufgetrennt. Veresterte Inhibitorerivate werden daher erheblich länger retardiert als unveresterte. Generell wirkt sich der Ersatz einer Amidbindung durch Ethylen-, Ketomethylen-, Esterbindung oder eine andere funktionelle Gruppe nur wenig auf das Retentionsverhalten aus. Auch die Verlängerung der P<sub>1</sub>-Seitenkette hat geringen Einfluss. Nachfolgend sind die Retentionszeiten der Edukte, Intermediate sowie der semisynthetischen Inhibitorerivate aufgeführt. Die Retentionszeiten können sich, wenn aus stark sauren oder basischen Lösungen analysiert wird, leicht verschieben.

#### Retentionszeiten von Edukten [min]

TKI	22,5
TKI*	18,2
TKI*(Me) <sub>5</sub>	36,1
TKI*(Me) <sub>6</sub>	41,3
Des(Ala <sup>16</sup> )TKI*	16,3
Des(Ala <sup>16</sup> , Arg <sup>17</sup> )TKI*	12,4
Des(Ala <sup>16</sup> , Arg <sup>17</sup> , Ile <sup>18</sup> )TKI*	14,8
Des(Lys <sup>15</sup> )TKI*(Me) <sub>5</sub>	32,0
Des(Ala <sup>16</sup> )TKI*(Me) <sub>5</sub>	33,6
Des(Ala <sup>16</sup> )TKI*(Me) <sub>6</sub>	41,3
Des(Lys <sup>15</sup> , Ala <sup>16</sup> )TKI*(Me) <sub>5</sub>	29,5
Des(Ala <sup>16</sup> , Arg <sup>17</sup> )TKI*(Me) <sub>5</sub>	31,6
Des(Ala <sup>16</sup> , Arg <sup>17</sup> )TKI*(Me) <sub>6</sub>	36,8
Des(Lys <sup>15</sup> , Ala <sup>16</sup> , Arg <sup>17</sup> )TKI*(Me) <sub>5</sub>	29,3

#### Retentionszeiten von Intermediaten und semisynthetischen Inhibitorderivaten [min]

[Gly <sup>16</sup> , Gly <sup>17</sup> ]TKI	18,7
[Doa <sup>15</sup> , Gly <sup>16</sup> , Gly <sup>17</sup> ]TKI	18,5
[Dcl <sup>15</sup> , Gly <sup>16</sup> , Gly <sup>17</sup> ]TKI	18,6

[Doa <sup>15</sup> des(Ala <sup>16</sup> , Arg <sup>17</sup> )]TKI*	13,6
[Ava <sup>16,17</sup> ]TKI	18,3
[N-Me-Ava <sup>16,17</sup> ]TKI	16,5
[N-Me-Ala <sup>16</sup> ]TKI*	17,5
[ $\alpha$ -Me-Ala <sup>16</sup> ]TKI	22,1
[ $\alpha$ -Me-Ala <sup>16</sup> ]TKI*	18,3
[ $\alpha$ -Hbs <sup>16</sup> ]TKI*	11,2
[ $\alpha$ -Hbs <sup>16</sup> , Gly <sup>17</sup> -OTMSE]TKI*( <sup>17,18</sup> )(Me) <sub>5</sub>	38,6
[Ala <sup>16</sup> $\Psi$ [COCH <sub>2</sub> ]Gly <sup>17</sup> ]TKI	18,3
[Ala <sup>16</sup> $\Psi$ [COO]Gly <sup>17</sup> ]TKI(Me) <sub>5</sub>	39,2
[Apa <sup>16,17</sup> ]TKI	19,2

#### 2.4.2 Massenspektrometrie

Eine eindeutige Identitätsbestätigung der semisynthetischen TKI-Derivate ist durch Kombination der zur Verfügung stehenden Methoden möglich. Während die HPLC-Analytik den Einbau von Peptiden oder Peptidanaloga in TKI indirekt und die N-terminale Sequenzierung nach Edman nur die Aminosäuresequenz bis zum nicht-peptidischen Strukturelement bestätigt, liefert die Massenspektrometrie einen eindeutigen Strukturbeweis. Ionenspray-Massenspektrometrie verwendet eine sanfte Ionisierungsmethode, bei der eine wässrige Lösung der zu analysierenden Substanz mit Druckluft durch eine Kapillare, die unter Hochspannung steht, zerstäubt wird. Das elektrische Feld bewirkt den schonenden Übergang mehrfach geladener Ionen in die Gasphase. Da die Ionenspray-Methode bei Raumtemperatur und Normaldruck erfolgt, eignet sie sich besonders zur Massenbestimmung von thermolabilen Molekülen wie Peptiden und Proteinen (Metzger et al., 1992). Eine weitere Methode die besonders für Proteine geeignet scheint ist die MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Gegenüber anderen Techniken zeichnet sich diese Methode durch eine weit höhere Genauigkeit und Empfindlichkeit aus. Seit einiger Zeit wird MALDI-TOF auch zur Sequenzierung von Biopolymeren genutzt.

### 3. Experimenteller Teil

#### 3.1 Semisynthesen

##### Geräte

Autotitrator:	TTT 60 Titrator mit PHM 64 Research pH-Meter, Rec 61 Servograph, ABU 13 Autobürette und TTA Titration Assembly, Radiometer, Kopenhagen.
Durchflussphotometer:	Uvicord S, LKB, München mit Schreiber: 6-Kanal-Punktschreiber, Colora, Lorch.
Fraktionssammler:	Ultrorack 7000, LKB, München.
Gefriertrocknung:	WKF L2, WKF, Darmstadt.
HPLC:	Hewlett-Packard 1084 A Liquid Chromatograph, LC-Terminal 79850 A, variabler UV-Detektor 1030 B, automatisches Probeaufgabesystem 79842 A, Hewlett-Packard, Bad Homburg.
Ionenspray MS:	API III Quadrupol-Massenspektrometer mit Ion Spray Interface, Sciex, Thornhill, Ontario, Canada. Die Proben wurden in Wasser gelöst und mit einer Flussrate von 5µl/min injiziert, Medizinische Infusionspumpe Model 22, Harvard Apparatus, South Natick, USA.
pH-Meter:	62 Standard pH-Meter, Radiometer, Kopenhagen.
Sequenzer:	Knauer Modular Protein Sequencer Model 810 mit on line Identifizierung der PTH-Aminosäuren, Knauer, Berlin.

**Materialien**

Trennmedien für die Säulenchromatographie:

Sephadex G-25 fine	Pharmacia, Freiburg
Sephadex G-50 fine	Pharmacia, Freiburg
CM Sepharose Fast Flow	Pharmacia, Freiburg

Enzyme:

Trypsin aus Schweinepankreas (EC 3.4.21.4)	Merck, Darmstadt
Trypsin aus Rinderpankreas (EC 3.4.21.4)	Merck, Darmstadt
Chymotrypsin aus Rinderpankreas (EC 3.4.21.1)	Merck, Darmstadt
Kallikrein aus Schweinepankreas (EC 3.4.21.35)	Bayer, Wuppertal
Aminopeptidase K aus Tritirachium album Limber (EC 3.4.11.-)	Merck, Darmstadt
Aminopeptidase M aus Schweinenieren (EC 3.4.11.1)	Merck, Darmstadt
Carboxypeptidase B aus Schweinepankreas (EC 3.4.17.2)	Merck, Darmstadt
Carboxypeptidase P aus Penicillium janthinellum (EC 3.4.17.16)	Merck, Darmstadt
Carboxypeptidase Y aus Hefe (EC 3.4.16.1)	Merck, Darmstadt

TKI wurde von der Firma Bayer AG, Wuppertal zur Verfügung gestellt. Die übrigen Substanzen wurden von Aldrich, Steinheim; Bachem, Heidelberg; Fluka, Buchs und Merck, Darmstadt bezogen.

## Präparative Trennverfahren

### Gelfiltrationen

Entsalzt wird durch Gelchromatographie an Sephadex G-25 fine. Elutionsmittel ist 0,1 M HOAc. Das maximale Probenvolumen beträgt 25 % des Gelbettvolumens. Gelfiltrationen zur Abtrennung von Enzymen oder zur Trennung von Enzym-Inhibitor-Komplexen erfolgen an Sephadex G-50 fine. Eluiert wird mit 0,1 M HOAc, die mit HCl auf pH 1,7 eingestellt wird. Es werden maximal 3 % des Gelbettvolumens aufgetragen.

### Kationenaustauschchromatographie

Präparative Kationenaustauschchromatographien erfolgen an CM Sepharose Fast Flow. Es werden bis zu 2 mg TKI-Derivat pro ml Gelbettvolumen aufgetragen. Eluiert wird mit 0,05 M Na-Borat bei pH 8,6. Die Auftrennung der Komponenten erfolgt mit linearen NaCl-Gradienten. Das Elutionsvolumen beträgt ca. das 10-fache des Gelbettvolumens.

## HPLC

Die TKI-Derivate und Homologen werden unter Standardbedingungen analysiert (Wenzel et al., 1985).

### Kationenaustausch-HPLC

HPLC-Anlage:	Hewlett-Packard 1084 A
Säule:	LKB Ultropac TSK SP-5PW, 7,5 x 75 mm
Detektion:	UV-Absorbtion bei 220 nm
Flussrate:	1 ml/min
Eluent A:	H <sub>2</sub> O
Eluent B:	0,01 M Na-Phosphat, pH 7,0, 1 M NaCl
Gradient:	0-5 min: 10% B-Puffer 5-50 min: 10-100% B-Puffer 50-60 min: 100% B-Puffer

### 3.1.1 Darstellung von TKI-Fragmenten

#### TKI\*

TKI (1,0 g) wird in 35 ml entgastem bidest. Wasser gelöst. Unter Eiskühlung und Schutzgasatmosphäre werden 13 ml 0,2 M NaBH<sub>4</sub>-Lösung vorsichtig zugetropft. Die Reaktion wird nach 90 min durch Zugabe von 4,5 ml 1 M HCl gestoppt. Man gibt 360 mg Bernsteinsäure und 200 mg Calciumchlorid zu und stellt mit 5 M NaOH den pH auf 3,7 ein. Nach Zugabe von 1 g Schweinetrypsin gelöst in 4,25 ml Wasser wird der pH nochmals nachgestellt und man lässt bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre rühren. Der Reaktionsverlauf wird ständig per HPLC kontrolliert. Nach 20 h wird die Reaktion durch Ansäuern auf pH 1,7 mit konzentrierter Salzsäure abgebrochen. Zur Abtrennung des Enzyms wird an Sephadex G-50 fine (0,1 M HOAc, pH 1,7, 4,5 x 90) gefiltriert. Die inhibitorhaltigen Fraktionen werden vereinigt, mit 5 M NaOH auf pH 5 eingestellt, eingengt und an Sephadex G-25 fine (0,1 M HOAc, 3,5 x 85) entsalzt. Durch Kationenaustauschchromatographie an Sepharose Fast Flow (0,05 M Na-Borat, pH 8,6, 0-0,3 M NaCl, 2,5 x 35 cm), anschließender Entsatzung und Lyophilisieren erhält man 750 mg TKI\* (75%) sowie 150 mg TKI.

#### Des(Ala<sup>16</sup>)TKI\*

TKI\* (200 mg) wird in 19,5 ml 0,2 M Triethanolamin, pH 8,5 gelöst. Es werden 20 ml Dioxan und 200 µl Glycerin hinzugefügt. Der pH wird mit 5 M NaOH nachgestellt. Unter Rühren werden 200 µl APK (Lösung in 50% Glycerin, 20 U/ml) zugegeben. Der Reaktionsverlauf wird ständig per HPLC kontrolliert. Eventuell ist es erforderlich weitere APK (bis zu 200 µl) zuzusetzen. Nach ca. 5 h wird die Reaktion durch Ansäuern mit konzentrierter HCl auf pH 1,7 abgebrochen. Die dabei ausfallende APK wird abfiltriert. Das Dioxan wird im Vakuum weitgehend abgezogen und die verbleibende Lösung über Sephadex G-50 fine (0,1 M HOAc, pH 1,7, 4,5 x 90 cm) gefiltriert. Die inhibitorhaltigen Fraktionen werden im Vakuum bei 35 °C bis zur Trockene eingengt und zur Entfernung von restlicher HCl mehrmals aus Wasser reevaporiert. Der Rückstand wird in 0,05 M Na-Borat, pH 8,6 gelöst und durch Kationenaustauschchromatographie an CM Sepharose Fast Flow (0,05 M Na-Borat, pH 8,6, 0-0,3 M NaCl, 2,5 x 35 cm) getrennt. Die Des(Ala<sup>16</sup>)TKI\* enthaltenden Fraktionen werden im Vakuum bei 35 °C eingengt, entsalzt und lyophilisiert. Man erhält 140 mg Des(Ala<sup>16</sup>)TKI\* sowie 20 mg Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\* (10%).

**Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\***

280 mg TKI\* werden in 20 ml 0,025 M Tris, pH 8 gelöst und mit 200 µl APK (Lösung in 50% Glycerin, 20 U/ml) versetzt. Der Reaktionsverlauf wird mittels HPLC verfolgt. Nach 7 h wird das Reaktionsgemisch durch Kationenaustauschchromatographie an CM Sepharose Fast Flow (0,05 M Na-Borat, pH 8,6, 0-0,25 M NaCl, 2,5 x 35 cm) aufgetrennt. Die Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI enthaltenden Fraktionen werden unter vermindertem Druck bei maximal 35 °C eingengt, an Sephadex G-25 (0,1 M HOAc, 3,5 x 85 cm) entsalzt und lyophilisiert. Neben 220 mg (78%) Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\* werden noch 20 mg (7%) Des(Ala<sup>16</sup>)TKI\* isoliert.

**Des(Ala<sup>16</sup>)TKI\*(Me)<sub>6</sub> und Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>6</sub>**

Des(Ala<sup>16</sup>)TKI\*(Me)<sub>6</sub> oder Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>6</sub> werden zu 4-5 mg/ml 0,1 M in methanolischer HCl aufgenommen, mit 0,1% (v/v) DMS versetzt und 20 h bei Raumtemperatur belassen. Anschließend versetzt man mit dem 4-fachen Volumen -20 °C kaltem Diethylether. Der Niederschlag wird abfiltriert, in Wasser gelöst und lyophilisiert. Man erhält die veresterten TKI-Fragmente in 90 %iger Ausbeute.

**Hydrolyse des Lys<sup>15</sup> Methylesters in Des(Ala<sup>16</sup>)TKI\*(Me)<sub>6</sub> oder Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>6</sub>**

Des(Ala<sup>16</sup>)TKI\*(Me)<sub>6</sub> bzw. Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>6</sub> (130 mg) werden in 20 ml 0,1 M Natriumphosphat, pH 7 gelöst, mit 1,5 ml Trypsinlösung (1 mg Rindertrypsin/ml Wasser) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit konzentrierter HCl auf pH 1,7 gebracht und per HPLC analysiert. Ist die Abspaltung des Methylesters unvollständig, wird mit 5 M NaOH erneut auf pH 7 eingestellt und ca. 5 min gerührt. Nach Ansäuern auf pH 1,7 wird über Sephadex G-50 fine (0,1 M HOAc, pH 1,7, 4,5 x 90 cm) gelfiltriert. Die inhibitorhaltigen Fraktionen werden gepoolt, mit NaOH auf pH 5 eingestellt, im Vakuum bei 35 °C eingengt und über Sephadex G-25 fine (0,1 M HOAc, 3,5 x 85 cm) entsalzt. Es wird durch Kationenaustauschchromatographie an CM Sepharose Fast Flow (0,01 M Na-Phosphat, pH 6,8; Gradient: 0-0,8 M NaCl, 2,5 x 35 cm) gereinigt, über Sephadex G-25 fine entsalzt und lyophilisiert. Neben den gewünschten TKI\*-Fragmenten (bis zu 80%) erhält man die nicht umgesetzten Hexamethylester zurück.

### **Abspaltung von Lys<sup>15</sup> in Des(Ala<sup>16</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> oder Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub>**

Der jeweilige Pentamethylester (50-100 mg) wird in 30 ml 0,1 M Na-Phosphat, pH 7 gelöst und mit 30 µl Carboxypeptidase B-Lösung (600 U/ml) versetzt. Die Reaktionskontrolle per HPLC zeigt, dass die Umsetzung nach 1-2 h vollständig ist. Die Lösung wird mit 100 ml Wasser verdünnt und auf CM Sepharose Fast Flow (1,5 x 25 cm) aufgetragen. Um die Enzyme zu entfernen, wird die Säule zunächst mit 2 Säulenvolumina 0,01 M Na-Phosphat, pH 6,8 gespült und dann mit 0,01 M Na-Phosphat, pH 6,8 (Gradient: 0-0,7 M NaCl) eluiert. Die inhibitorhaltigen Fraktionen werden gepoolt, im Vakuum bei 35 °C eingengt, über Sephadex G-25 fine entsalzt und lyophilisiert. Man erhält bis zu 70 % Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> bzw. Des(Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub>.

### **3.1.2 Einbau von Aminosäurederivaten, Peptiden oder Peptidanaloga**

#### **Chemische Semisynthese (chemische Kopplungen an Cys<sup>14</sup> oder Lys<sup>15</sup>)**

Das als Pentamethylester geschützte TKI-Fragment wird in 2 ml Wasser, das mit HOBt gesättigt ist, gelöst und mit 100-500 mg des zu koppelnden C-terminal geschützten Aminosäurederivates, Peptids oder Peptidanalogs als Hydrochlorid oder freie Base versetzt. Der pH wird mit 0,5 M NaOH bzw. 0,5 M HCl auf 4,75 eingestellt. Innerhalb einer Stunde werden drei Portionen EDC (jeweils 10 mg) zugegeben, dabei wird der pH mit einem Autotitrator (0,1 M HCl) konstant bei 4,75 gehalten. Die Reaktion wird per HPLC verfolgt und gegebenenfalls durch weitere EDC-Zugaben vervollständigt. 30 min nach der letzten Zugabe wird das Reaktionsgemisch zur Abtrennung der niedermolekularen Komponenten über Sephadex G-25 fine (0,1 M HOAc, 2,5 x 55 cm) gelfiltrierte. Die inhibitorhaltigen Fraktionen werden gepoolt und lyophilisiert.

#### **Abspaltung der tert.-Butylester**

Die veresterten TKI-Derivate werden in 1 ml konzentrierter TFA aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur belassen. Die Säure wird im Vakuum ohne Erwärmen abgezogen, der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

### Synthese der zweiten Bindung mit Carbodiimid

Das Lyophilisat der selektiv geschützten TKI\*-Derivate, als Pentamethylester vorliegend, wird in 2ml gesättigter wässriger HOBt-Lösung aufgenommen. Der pH wird auf 4,75 eingestellt. Es werden innerhalb einer Stunde drei Portionen von je 10 mg EDC zugegeben. Dabei wird der pH-Wert mit einem Autotitrator (0,1 M HCl) konstant bei 4,75 gehalten. Der Reaktionsverlauf wird per HPLC verfolgt und gegebenenfalls durch weitere EDC-Zugabe vervollständigt. Nach 4-5 h ist die Reaktion beendet. Es wird über Sephadex G-25 fine (0,1 M HOAc, 1,2 x 55 cm) gelfiltrierte; die inhibitorhaltigen Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert.

### Abspaltung der Methylester

Die Pentamethylester der TKI-Derivate werden in 2-5 ml 1 M Na-Borat pH 10,5 aufgenommen. Die Verseifung der Methylester wird mittels HPLC kontrolliert. Nach 12-15 h bei Raumtemperatur wird der Ansatz mit 50 ml 0,05 M Na-Borat pH 8,6 verdünnt (der pH wird gegebenenfalls mit HCl eingestellt) und an CM Sepharose Fast Flow (1,0 x 30 cm, 0,05 M Na-Borat, 0-0,3 M NaCl) aufgetrennt. Entsalzen über Sephadex G-25 fine (0,1 M HOAc, 1,2 x 55 cm) und Lyophilisieren liefert das gewünschte TKI in 5-10%iger Ausbeute über alle Stufen, bezogen auf das eingesetzte TKI-Fragment.

### Enzymatisch-chemische Semisynthese (enzymatische Kopplung an Lys<sup>15</sup>)

Das als tert-Butylester geschützte Peptid oder Peptidanalogen (75 µmol) wird in 35 µl DMSO gelöst und vorsichtig mit 100 µl 1,4-Butandiol versetzt. Diese Lösung wird zu 10 mg Des(Ala<sup>16</sup>)TKI\*, Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\* bzw. Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>, Ile<sup>18</sup>)TKI\* gegeben. Der apparente pH-Wert wird durch Zugabe einer Lösung von Tris in DMSO (10 mg in 40 µl) auf zunächst auf 6-7 eingestellt (Tüpfeln auf ein angefeuchtetes pH-Papier), muss aber gegebenenfalls auf bis zu pH 9 erhöht werden. Der Ansatz wird mit DMSO bis zu einem Volumenverhältnis DMSO/1,4-Butandiol von 1:2 aufgefüllt. Zuletzt werden 2 mg Trypsin aus Rinderpankreas, gelöst in 20 µl H<sub>2</sub>O, zugegeben und sofort mit dem Reaktionsgemisch intensiv durchmischt. Nach etwa 5 min erhält man eine klare Lösung. Zur Reaktionskontrolle werden 0,5 µl des Reaktionsgemisches entnommen, zu 15 µl 0,15M HCl gegeben und mittels HPLC analysiert. Nach Reaktionszeiten bis zu 72 h bei Raumtemperatur (oder im Wasserbad bei 35 °C) wird die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 0,15 M HCl beendet. Zur Abtrennung des Enzyms wird an Sephadex G 50 fine (0,1 M HOAc, pH 1,7, 1,5 x 85 cm) gelfiltrierte. Die inhibitorhaltigen Fraktionen werden vereinigt, mit NaOH auf pH 5 eingestellt, eingengt und

an Sephadex G-25 fine (0,1 M HOAc, 1,2 x 55 cm) entsalzt. Das Kopplungsprodukt wird durch Kationenaustauschchromatographie an CM Sepharose Fast Flow (0,05 M Na-Borat, pH 8,6, 0-0,3 M NaCl, 1,0 x 30 cm) von nicht umgesetztem Edukt getrennt, entsalzt und lyophilisiert. Man erhält bis zu 70% des jeweiligen Produktes.

#### Veresterung der TKI-Derivate

Die TKI-Derivate werden in 10 ml 0,1 M methanolischer HCl gelöst und 15 h bei Raumtemperatur belassen (Reaktionskontrolle per HPLC). Anschließend werden Methanol und HCl unter vermindertem Druck ohne Erwärmen abgezogen. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

#### Abspaltung der tert.-Butylester

Die veresterten TKI-Derivate werden in 1 ml konzentrierter TFA aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur belassen. Die Säure wird im Vakuum ohne Erwärmen abgezogen, der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

#### Synthese der zweiten Bindung mit Carbodiimid

Die Pentamethylester der TKI-Derivate werden in 2-5 ml 1 M Na-Borat pH 10,5 2ml gesättigter wässriger HOBt-Lösung aufgenommen. Der pH wird auf 4,75 eingestellt. Es werden innerhalb einer Stunde drei Portionen von je 1 mg EDC zugegeben. Dabei wird der pH-Wert mit einem Autotitrator (0,1 M HCl) konstant bei 4,75 gehalten. Der Reaktionsverlauf wird per HPLC verfolgt und gegebenenfalls durch weitere EDC-Zugabe vervollständigt. Nach 4-5 h ist die Reaktion beendet. Es wird über Sephadex G-25 fine (0,1 M HOAc, 1,2 x 55 cm) gelfiltriert; die inhibitorhaltigen Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert.

#### Abspaltung der Methylester

Die Pentamethylester der TKI-Derivate werden in 2-5 ml 1 M Na-Borat pH 10,5 aufgenommen. Die Verseifung der Methylester wird mittels HPLC kontrolliert. Nach 12-15 h

bei Raumtemperatur wird der Ansatz mit 50 ml 0,05 M Na-Borat pH 8,6 verdünnt (der pH wird gegebenenfalls mit HCl eingestellt) und an CM Sepharose Fast Flow (1,0 x 30 cm, 0,05 M Na-Borat, 0-0,3 M NaCl) aufgetrennt. Entsalzen über Sephadex G-25 fine (0,1 M HOAc, 1,2 x 55 cm) und Lyophilisieren liefert TKI in 5-10%iger Ausbeute über alle Stufen, bezogen auf Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI.

### **Chemisch-enzymatische Semisynthese (Acylierung von Arg<sup>17</sup> oder Ile<sup>18</sup>)**

Die ungeschützten TKI-Fragmente Des (Ala<sup>16</sup>)TKI\*, Des (Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\* oder Des (Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\* sowie auch die als Pentamethylester vorliegenden TKI-Fragmente Des (Ala<sup>16</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub>, Des (Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> oder Des (Lys<sup>15</sup>, Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI\*(Me)<sub>5</sub> (10-50 mg) werden in 5 ml Wasser gelöst und auf pH 4,75 eingestellt. Unter Rühren wird eine Lösung des Boc-geschützten aktivierten N-Hydroxysuccinimidesters (0,1 mmol) in 1 ml Dioxan oder DMSO portionsweise zugegeben, dabei wird der pH der Lösung mit einem Autotitrator (0,1 M NaOH) konstant bei 4,75 gehalten. Die Reaktion wird ständig per HPLC verfolgt und nach 2-8 h durch Gelfiltration über Sephadex G-25 fine (0,1 M HOAc, 2,5 x 55 cm) abgebrochen. Die Acylierungsprodukte werden durch Kationenaustauschchromatographie an CM Sepharose Fast Flow (0,01 M Na-Borat, pH 8,6; Gradient: 0-0,2 M NaCl, 1 x 30 cm) aufgetrennt. Das isolierte Monoacylierungsprodukt wird an Sephadex G-25 fine entsalzt und lyophilisiert.

### **Abspaltung der Boc-Schutzgruppen**

Das Lyophilisat wird in konz. TFA gelöst und 30 min bei Raumtemperatur belassen. Die Säure wird ohne Erwärmen im Vakuum abgezogen, der Rückstand in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

### **Enzymatische Synthese der reactive site -Bindung und Aufreinigung der Endprodukte**

Das entschützte TKI\*-Derivat wird in 5 ml 0,1 M Tris, pH 8 gelöst und mit einer äquimolaren Menge Rinder-Trypsin versetzt. Nach 10 min wird der pH der Lösung mit HCl auf 1,7 erniedrigt und zur Abtrennung des Enzyms an Sephadex G-50 fine (0,1 M HOAc, pH 1,7, 1,5 x 85 cm) gelfiltriert. Die inhibitorhaltigen Fraktionen werden mit 1 M NaOH auf pH 5 eingestellt, im Vakuum bei 35 °C auf ca. 5 ml eingengt und über Sephadex G-25 fine entsalzt. Das entsalzte Produkt wird durch Kationenaustauschchromatographie an CM Sepharose Fast Flow (0,01 M Na-Borat, pH 8,6; Gradient: 0-0,3 M NaCl, 1 x 30 cm) nachgereinigt, über Sephadex G-25 fine entsalzt und lyophilisiert.

### Synthese der *reactive site*-Bindung oder der Bindung 14-15 mit Carbodiimid

Das Lyophilisat der selektiv entschützten TKI\*-Derivate, als Pentamethylester vorliegend, wird in 2ml gesättigter wässriger HOBt-Lösung aufgenommen. Der pH wird auf 4,75 eingestellt. Es werden innerhalb einer Stunde drei Portionen von je 1 mg EDC zugegeben. Dabei wird der pH-Wert mit einem Autotitrator (0,1 M HCl) konstant bei 4,75 gehalten. Der Reaktionsverlauf wird per HPLC verfolgt und gegebenenfalls durch weitere EDC-Zugabe vervollständigt. Nach 4-5 h ist die Reaktion beendet. Es wird über Sephadex G-25 fine (0,1 M HOAc, 1,2 x 55 cm) gelfiltriert; die inhibitorhaltigen Fraktionen werden vereinigt und lyophilisiert.

### Abspaltung der Methylester

Die Pentamethylester der TKI-Derivate werden in 2-5 ml 1 M Na-Borat pH 10,5 aufgenommen. Die Verseifung der Methylester wird mittels HPLC kontrolliert. Nach 12-15 h bei Raumtemperatur wird der Ansatz mit 50 ml 0,05 M Na-Borat pH 8,6 verdünnt (der pH wird gegebenenfalls mit HCl eingestellt) und an CM Sepharose Fast Flow (1,0 x 30 cm, 0,05 M Na-Borat, 0-0,3 M NaCl) aufgetrennt. Entsalzen über Sephadex G-25 fine (0,1 M HOAc, 1,2 x 55 cm) und Lyophilisieren liefert TKI in 5-10%iger Ausbeute über alle Stufen, bezogen auf Des(Ala<sup>16</sup>, Arg<sup>17</sup>)TKI.

### 3.2 Organisch-chemische Synthesen

#### Allgemeines

$^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden bei 250 MHz (Bruker AC 250 P), 300 MHz (Bruker AM 300) oder bei 500 MHz (Bruker AM 500) (Bruker, Karlsruhe) aufgenommen.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden bei 62,9 MHz (Bruker AC 250 P) oder bei 125,7 MHz (Bruker AM 500) gemessen. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben, Standard ist TMS. (Die Daten sind ohne Anspruch auf Vollständigkeit).

EI- und CI-Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer MAT 311A Varian, L-SIMS-Spektren mit einem Autospec VG (Fisons, Manchester, UK) aufgenommen.

Zur Dünnschichtchromatographie wurden DC-Folien Kieselgel 60 F<sub>254</sub> der Firma Merck, Darmstadt verwendet. Die Substanzen wurden nacheinander auf derselben Folie durch UV-Strahlung (254 nm) und Besprühen mit Ninhydrinlösung (1% in Ethanol) mit nachfolgendem Erhitzen im Trockenschrank auf 120 °C (ca. 1 min.) sichtbar gemacht. Folgende Laufmittelsysteme wurden verwendet: A, EtOAc/Hexan (1:1); B, EtOAc/Hexan (2:1); C, EtOAc/Hexan (1:2); D, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/HOAc(32%ig) (5:3:1); E, CHCl<sub>3</sub>/MeOH (5:1); F, CHCl<sub>3</sub>/MeOH (10:1); G, CHCl<sub>3</sub>/MeOH (20:1); H, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Toluol/HOAc(32%ig) (8:8:8:1).

Schmelzpunkte wurden mit einem Gerät nach Dr. Tottoli bestimmt (Büchi 510, Büchi, Eislingen) und sind unkorrigiert.

HPLC-Anlage:	Hewlett-Packard 1084 A
Säule:	Wide Pore Octadecyl (C18), Porenweite 300 Å, 4,6 · 250 nm, Baker Groß-Gerau.
Detektion:	UV-Absorbtion bei 220 nm
Flussrate:	1 ml/min
Eluent A:	H <sub>2</sub> O; 0,1 % TFA
Eluent B:	80 % Acetonitril (Gradient Grade LiChrosolv, Merck, Darmstadt)
Gradient:	0-5 min: 10% B 5-50 min: 10-100% B 50-60 min: 100% B 60-65 min 100-10% B

Die verwendeten Aminosäurederivate und Dipeptide wurden von Bachem, Heidelberg sowie von Fluka, Buchs bezogen. Die übrigen Chemikalien stammen von Merck, Darmstadt,

Lancaster, Mühlheim/Main und Fluka, Buchs. Die verwendeten Lösungsmittel waren p.A.-Qualität.

### 3.2.1 [Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI, [Doa<sup>15</sup>, Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI und [Dcl<sup>15</sup>, Gly<sup>16</sup>, Gly<sup>17</sup>]TKI

#### 3.2.1.1 Darstellung von Diaminoheptansäure (Doa, Homolysin)

##### 5-Brompentyphthalimid

5-Aminopentanol (10,4 g; 100 mmol) wird bis zum Schmelzen erhitzt (Schmelzpunkt: 35 °C). Fein gemörstertes Phthalsäureanhydrid (14,8 g; 100 mmol) wird in kleinen Portionen zugegeben. Man erhitzt ca. 3 h auf 80-90 °C, bis man eine klare Lösung erhält und die Umsetzung quantitativ erfolgt ist (DC-Kontrolle: Laufmittel EE/Hexan 1:1, R<sub>f</sub>-Wert: 0,52). Nach Erhitzen auf 100 °C tropft man innerhalb von 40 min frisch destilliertes PBr<sub>3</sub> (7,2 ml; 77 mmol) zu (HBr-Entwicklung !). Anschließend wird die orange-gelbe Lösung noch 1 h unter Rückfluss bei 100 °C gerührt. Beim Abkühlen gibt man zu der noch warmen, viskosen Lösung 10 ml Ethanol und tropft diese unter Rühren auf 200 ml Eiswasser, wobei ein weißer Niederschlag entsteht. Man lässt auskristallisieren, saugt ab, wäscht mit Wasser neutral und trocknet im Vakuum. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Ethanol erhält man 18,0 g (61 mmol; 61 %) 5-Brompentyphthalimid.

Schmelzpunkt: 61 °C

DC: R<sub>f</sub>(A) 0,90.

<sup>1</sup>H-NMR (60 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,5 (m, 6 H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-), 3,0 (t, 2 H, N-CH<sub>2</sub>-), 3,3 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-Br), 6,9 (m, 4 H, arom.).

MS (EI, 70 eV) m/z (rel. Int.): 297, 295 d, M<sup>+</sup> (16%), 216 (22%), 161 (34%), 160 (100%), 130 (11%), 104 (12%), 77 (14%), 76 (16%).

##### 2-Acetamido-2-carbethoxy-7-phthalimidoheptanonitril

In 60 ml absolutem Ethanol löst man unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit Natrium (1,4 g; 60 mmol), gibt Acetamidocyanessigsäureethylester (10,2 g; 60 mmol) hinzu und rührt 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend gibt man 5-Brompentyphthalimid (17,8 g; 60 mmol) hinzu, erhitzt langsam auf 50 °C bis sich das Brompentyphthalimid gelöst hat und rührt 24 h bei dieser Temperatur, wobei sich die Farbe der Lösung von gelb-orange nach dunkelbraun ändert. Man erhitzt auf 80 °C und rührt weitere 7 h (keine Veränderungen auf DC; Laufmittel

EE:Hexan; 1:1,  $R_f$ -Wert: 0,44). Nach Einengen der Reaktionslösung auf etwa die Hälfte des Volumens lässt man auskristallisieren, saugt das Produkt ab und wäscht mit kaltem Ethanol. Das Umkristallisieren in Ethanol zeigt keinen Reinigungseffekt, so dass das Rohprodukt in Essigester aufgenommen wird. Die wasserlöslichen Bestandteile werden mehrmals mit Wasser extrahiert, bis die organische Phase nahezu farblos ist. Die organische Phase wird mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in Essigester-Hexan umkristallisiert. Ausbeute: 4,5 g (12 mmol; 20 %).

Schmelzpunkt: 141-142 °C.

DC:  $R_f$  (A) 0,44.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,34 (m, 2 H,  $-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$ ), 1,35 (t, 3H,  $^3J = 7,1$  Hz,  $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}_3$ ), 1,57 (m, 2 H,  $-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2-\text{C}_q-$ ), 1,72 (t, 2 H,  $^3J = 7,0$  Hz,  $-\underline{\text{CH}}_2-\text{C}_q-$ ), 2,09 (m, 2 H,  $-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2-\text{N}$ ), 2,10 (s, 3 H,  $-\underline{\text{CH}}_3$ ), 3,70 (t, 2 H,  $^3J = 6,9$  Hz,  $-\underline{\text{CH}}_2-\text{N}$ ), 4,33 (q, 2 H,  $^3J = 7,1$  Hz,  $-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_3$ ), 6,63 (s, 1 H,  $-\text{CO}-\underline{\text{NH}}-$ ), 7,72 (dd, 2 H,  $^4J_m = 3,1$  Hz,  $^3J_o = 5,4$  Hz, arom.- meta-H), 7,84 (dd, 2 H,  $^4J_m = 3,0$  Hz,  $^3J_o = 5,5$  Hz, arom-ortho-H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 13,99 ( $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}_3$ ), 22,49 ( $-\underline{\text{CH}}_3$ ), 22,91 ( $-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2-\text{C}_q-$ ), 25,82 ( $-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$ ), 27,81 ( $-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2-\text{N}$ ), 36,01 ( $-\underline{\text{CH}}_2-\text{C}_q-$ ), 37,13 ( $-\underline{\text{CH}}_2-\text{N}$ ), 56,95 ( $\underline{\text{C}}-\text{CN}$ ), 63,73 ( $-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_3$ ), 116,40 ( $-\underline{\text{C}}\text{N}$ ), 123,30, 132,05, 134,10, ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ), 166,41 ( $-\underline{\text{C}}\text{ONH}$ ), 168,57 ( $-\text{N}-(\underline{\text{C}}\text{O})_2-$ ), 169,86 ( $-\underline{\text{C}}\text{OO}-$ ).

MS (EI, 70 eV)  $m/z$  (rel. Int.): 387  $\text{M}^++\text{H}$  (3%), 386  $\text{M}^+$  (9%), 93 (100%, Matrix), 75 (23%), 57 (17%), 45 (28%).

## 2,7-Diaminoheptansäure-monohydrochlorid

Zu 50 ml halbkonzentrierter siedender Salzsäure gibt man portionsweise Acetamido-2-carbethoxy-7-phthalimidoheptanonitril (4,5 g; 12 mmol) zu, so dass die Reaktion nicht zu heftig wird und sich das Produkt gut löst. Die Lösung wird 12 h unter Rückfluss erhitzt. Beim Abkühlen der Lösung fällt freie Phthalsäure aus, die abgesaugt wird. Das Filtrat wird im Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 10 ml Wasser und 2,5 ml konz. Ammoniak aufgenommen und erneut bis zur Trockne eingedampft. Man nimmt in 40 ml Methanol auf, rührt eine Stunde bei Raumtemperatur und filtriert ab. Der Rückstand wird in 25 ml Methanol aufgenommen und wieder eine Stunde gerührt. Das unlösliche 2,7-Diaminoheptansäure-monohydrochlorid wird abgesaugt, in wenig Wasser umkristallisiert und durch Zugabe von Ethanol ausgefällt. Ausbeute: 0,8 g (4 mmol; 34 %).

Schmelzpunkt: 261 °C (Zers.).

DC:  $R_f$  (D) 0,24.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 1,20 (m, 4H ( $-\text{CH}_2-$ )<sub>2</sub>), 1,47 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$ ), 1,66 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{C}_\alpha$ ), 2,79 (t, 2 H,  $^3\text{J} = 7,4$  Hz,  $-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$ ), 3,53 (t, 1 H,  $^3\text{J} = 5,8$  Hz,  $-\text{C}_\alpha\text{H}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62,9 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 23,55 ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_\alpha\text{H}$ ), 25,05 ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$ ), 26,18 ( $-\text{CH}_2-\text{C}_\alpha\text{H}$ ), 29,91 ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$ ), 39,13 ( $-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$ ), 54,50 ( $-\text{C}_\alpha\text{H}$ ), 174,69 ( $-\text{COO}^-$ ).

### 3.2.1.2 Darstellung von Diaminoctansäure (Dcl)

#### 6-Bromhexylphthalimid

Die Darstellung ist analog der von 5-Brompentylphthalimid aus 6-Aminohexanol (10,25 g; 86 mmol) (Schmelzpunkt: 55 °C), Phtalsäureanhydrid (12,8g; 86 mmol) und Phosphortribromid (6,2 ml; 66 mmol).

Ausbeute: 16,5 g (53 mmol, 62%) Bromhexylphthalimid.

DC:  $R_f$  (B) 0,60.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,43 (m, 4 H,  $-(\text{CH}_2)_2-$ ), 1,70 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$ ), 1,85 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Br}$ ), 3,39 (t, 2 H,  $\text{N}-\text{CH}_2-$ ), 3,69 (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{Br}$ ), 7,70 (m, 4 H, arom.).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 26,03, 27,72 ( $-(\text{CH}_2)_2-$ ), 28,42 ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$ ), 32,62 ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Br}$ ), 33,64 ( $\text{N}-\text{CH}_2-$ ), 37,85 ( $-\text{CH}_2-\text{Br}$ ), 123,19, 132,18, 133,89 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 168,42 ( $-\text{N}-(\text{CO})_2-$ ).

MS (EI, 70 eV)  $m/z$  (rel. Int.): 311, 309, d,  $\text{M}^+$  (27%), 230 (7%), 174 (11%), 160 (100%), 148 (17%), 130 (21%), 104 (19%), 76 (25%).

#### 2-Acetamido-2-carbethoxy-8-phthalimidooctylonitril

Die Darstellung ist analog der von 2-Acetamido-2-carbethoxy-7-phthalimidoheptanonitril aus Acetamidocyanessigsäureethylester (8,5 g; 50 mmol) und 6-Bromhexylphthalimid (15,5 g; 50 mmol). Ausbeute: 5,9 g (15 mmol; 30 %).

DC:  $R_f$  (B) 0,17.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,34 (t, 3H,  $^3\text{J} = 7,1$  Hz,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ), 1,45 (m, 6 H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 1,66 (t, 2 H,  $^3\text{J} = 7,0$  Hz,  $-\text{CH}_2-\text{C}_q-$ ), 2,08 (s, 3 H,  $-\text{CH}_3$ ), 2,11 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$ ), 3,66 (t, 2 H,  $^3\text{J} = 7,1$  Hz,  $-\text{CH}_2-\text{N}$ ), 4,32 (q, 2 H,  $^3\text{J} = 7,1$  Hz,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ), 6,82 (s, 1 H,  $-\text{CO}-\text{NH}-$ ), 7,72 (dd, 2 H,  $^4\text{J}_m = 3,2$  Hz,  $^3\text{J}_o = 5,5$  Hz, arom.-meta-H), 7,83 (dd, 2 H,  $^4\text{J}_m = 3,1$  Hz,  $^3\text{J}_o = 5,6$  Hz, arom.-ortho-H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14,02 ( $-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 22,40 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 23,64, 26,23, 28,20, 28,33 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ )<sub>4</sub>-), 36,01 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{C}_q$ -), 37,66 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{N}$ ), 57,18 ( $\underline{\text{C}}-\text{CN}$ ), 63,59 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_3$ ), 116,58 ( $-\underline{\text{C}}\text{N}$ ), 123,20, 132,09, 134,03 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ), 166,46 ( $-\underline{\text{C}}\text{ONH}$ ), 168,46 ( $-\text{N}(\underline{\text{C}}\text{O})_2-$ ), 170,08 ( $-\underline{\text{C}}\text{OO}-$ ).

### 2,8-Diaminooctancarbonsäure

Die Darstellung ist analog der von 2,7-Diaminoheptansäure aus 2-Acetamido-2-carbethoxy-8-phthalimidooctylonitril (5,9 g; 15 mmol).

Ausbeute: 2,1 g (10 mmol; 66 %).

DC:  $R_f$  (D) 0,13.

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 1,16 (m, 6H ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ )<sub>3</sub>), 1,43 (m, 2 H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$ ), 1,64 (m, 2 H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{C}_\alpha$ ), 2,76 (t, 2 H,  $^3J = 7,6$  Hz,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}_3^+$ ), 3,51 (t, 1 H,  $^3J = 6,1$  Hz,  $-\text{C}_\alpha\underline{\text{H}}$ -).

$^{13}\text{C}$ -NMR (125,7 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) 23,72, 24,98, 26,34, 27,56, ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ )<sub>4</sub>), 30,02 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$ ), 39,26 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}_3^+$ ), 54,61 ( $-\underline{\text{C}}_\alpha\text{H}$ -), 174,83 ( $-\underline{\text{C}}\text{OO}^-$ ).

### 3.2.1.3 Darstellung von Aminosäuremethylestern

Durch eine Suspension von 1 g Aminosäure in 15 ml Methanol wird ohne Kühlung HCl-Gas eingeleitet. Nach 1-3 h löst sich die Aminosäure bei leichter Erwärmung. Unter Kühlung wird eine weitere Stunde HCl-Gas eingeleitet. Dann wird das Lösungsmittel abgedampft, der Rückstand wird erneut in Methanol aufgenommen und man leitet eine weitere Stunde HCl-Gas ein. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, wobei der Methylester als Hydrochlorid ausfällt. Man saugt ab, wäscht mit wenig Methanol und Ether und trocknet im Vakuum.

#### Lysinmethylester

Ansatz : Lysin-monohydrochlorid (1,1 g; 6,0 mmol).

Ausbeute: 1,2 g (5,2 mmol; 86 %) Lysinmethylester-dihydrochlorid.

DC:  $R_f$  (D) 0,42.

$^1\text{H}$ -NMR (250 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 1,41 (m, 4H ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ )<sub>2</sub>), 1,71 (m, 2 H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$ ), 3,13 (t, 2 H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}_3^+$ ), 3,86 (s, 3 H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 4,25 (t, 1 H,  $^3J = 6,5$  Hz,  $-\text{C}_\alpha\underline{\text{H}}$ -).

$^{13}\text{C}$ -NMR (62,9 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) 26,85, 29,30 ( $-(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_3$ ), 31,77 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$ ), 41,50 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}_3^+$ ), 55,40 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 56,12 ( $-\underline{\text{C}}_\alpha\text{H}$ -), 173,04 ( $-\underline{\text{C}}\text{OOMe}$ ).

### 2,7-Diaminoheptansäuremethylester

Ansatz: 2,7-Diaminoheptansäure-hydrochlorid (250 mg; 1,3 mmol)

2,7-Diaminoheptansäuremethylesterdihydrochlorid fällt nicht kristallin aus und wird für weitere Umsetzungen als farbloses Öl eingesetzt.

Ausbeute: 250 mg (1,0 mmol; 79 %) 2,7-Diaminoheptansäuremethylester-dihydrochlorid.

DC:  $R_f$  (D) 0,45.

$^1\text{H}$ -NMR (250 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 1,46 (m, 4H ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ )<sub>2</sub>), 1,69 (m, 2 H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$ ), 1,98 (m, 2 H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{C}_\alpha$ ), 3,02 (t, 2 H,  $^3J = 7,4$  Hz,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}_3^+$ ), 3,86 (s, 3 H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 4,17 (t, 1 H,  $^3J = 6,5$  Hz,  $-\underline{\text{C}}_\alpha\text{H}$ -).

$^{13}\text{C}$ -NMR (62,9 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) 26,42, 27,95, 29,16 ( $-(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_3$ ), 32,31 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$ ), 42,17 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}_3^+$ ), 55,65 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 56,39 ( $-\underline{\text{C}}_\alpha\text{H}$ -), 173,65 ( $-\underline{\text{C}}\text{OOMe}$ ).

### 2,8-Diaminooctansäure-methylester

Ansatz: 2,8-Diaminooctansäure-hydrochlorid (1,0 g; 4,7 mmol).

Ausbeute: 0,9 g (3,5 mmol; 75 %) 2,8-Diaminooctansäure-methylester-dihydrochlorid.

DC:  $R_f$  (D) 0,55.

$^1\text{H}$ -NMR (250 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 1,40 (m, 6H ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ )<sub>3</sub>), 1,67 (m, 2 H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$ ), 1,96 (m, 2 H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{C}_\alpha$ ), 3,00 (t, 2 H,  $^3J = 7,4$  Hz,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}_3^+$ ), 3,85 (s, 3 H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 4,15 (t, 1 H,  $^3J = 6,4$  Hz,  $-\underline{\text{C}}_\alpha\text{H}$ -).

$^{13}\text{C}$ -NMR (62,9 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) 26,69, 27,97, 29,34, 30,41 ( $-(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_4$ ), 32,41 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$ ), 42,26 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}_3^+$ ), 55,70 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 56,34 ( $-\underline{\text{C}}_\alpha\text{H}$ -), 173,76 ( $-\underline{\text{C}}\text{OOMe}$ ).

### 3.2.1.4 Darstellung der Tripeptide

#### Z-Lysin(Z)-OH

Lysin-hydrochlorid (10 g, 55 mmol) wird in 27 ml 2 N Natronlauge und 27 ml Dioxan gelöst und unter Eiskühlung und Rühren portionsweise mit Chlorameisensäurebenzylester (19,7 ml; 140 mmol) versetzt. Der pH der Lösung wird mit 2 N Natronlauge alkalisch gehalten. Nach völliger Umsetzung der Aminosäure wird das Dioxan im Vakuum weitgehend entfernt. Die wässrige Lösung wird mit halbkonzentrierter Salzsäure angesäuert und mehrmals mit Diethylether extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum lässt man aus Ethylacetat/Hexan kristallisieren.

Ausbeute: 19,6 g (47 mmol; 86 %).

DC:  $R_f$  (E) 0,60.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,41 (m, 4 H ( $-\text{CH}_2-$ )<sub>2</sub>), 1,71 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$ ), 3,13 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}$ ), 4,35 (t, 1 H,  $-\text{C}_\alpha\text{H}-$ ), 4,96 (m, 1 H,  $\epsilon\text{NH}$ ), 5,06 (s, 2 H, Z- $\text{CH}_2$ ), 5,08 (s, 2 H, Z- $\text{CH}_2$ ), 5,61 (m, 1 H,  $\text{C}_\alpha\text{-NH}$ ), 7,30 (m, 10 H, arom.) 8,91 (breit, 1 H,  $-\text{COOH}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 22,20, 29,30, 31,77 ( $-(\text{CH}_2)_3$ ), 40,52 ( $-\text{CH}_2-\text{NH}$ ), 53,65 ( $-\text{C}_\alpha\text{H}-$ ), 66,82, 67,11(Z- $\text{CH}_2$ ), 128,09, 128,19, 128,34, 128,52, 136,22, 136,49 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 156,36, 156,80 ( $-\text{CO}-$ , Z), 173,76 ( $-\text{COOH}$ ).

#### Z-Doa(Z)-OH

Die Darstellung ist analog der von Z-Lys(Z)-OH aus 2,7-Diaminoheptansäure-hydrochlorid (2,0 g; 10,2 mmol) und Chlorameisensäurebenzylester (3 ml; 21 mmol). Man erhält ein farbloses Öl.

Ausbeute: 3,55 g (8,3 mmol; 81 %)

DC:  $R_f$  (E) 0,57.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,26-1,69 (m, 6 H ( $-\text{CH}_2-$ )<sub>3</sub>), 1,82 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$ ), 3,13 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}$ ), 4,36 (t, 1 H,  $-\text{C}_\alpha\text{H}-$ ), 4,95 (m, 1 H,  $\zeta\text{NH}$ ), 5,09 (s, 4 H, Z- $\text{CH}_2$ ), 5,48 (m, 1 H,  $\text{C}_\alpha\text{-NH}$ ), 7,32 (m, 10 H, arom.).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 24,65, 26,10, 29,59, 32,34 ( $-(\text{CH}_2)_4$ ), 40,81 ( $-\text{CH}_2-\text{NH}$ ), 53,56 ( $-\text{C}_\alpha\text{H}-$ ), 66,24, 66,72 (Z- $\text{CH}_2$ ), 127,01, 127,62, 128,17, 128,53, 136,31, 136,66 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 156,14, 156,64 ( $-\text{CO}-$ , Z), 175,26 ( $-\text{COOH}$ ).

## Z-Dcl(Z)-OH

Die Darstellung ist analog der von Z-Lys(Z)-OH aus Dcl-hydrochlorid (860 mg; 4,2 mmol) und Chlorameisensäurebenzylester (1,3 ml; 9,2 mmol). Man erhält ein farbloses Öl.

Ausbeute: 1,60 g (3,6 mmol; 86 %)

DC: R<sub>f</sub> (E) 0,58.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,29-1,82 (m, 10 H (-CH<sub>2</sub>-)<sub>5</sub>), 3,14 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-NH), 4,37 (t, 1 H, -C<sub>α</sub>H-), 4,88 (m, 1 H, ηNH), 5,10 (s, 4 H, Z-CH<sub>2</sub>), 5,45 (m, 1 H, C<sub>α</sub>-NH), 7,32 (m, 10 H, arom.), 9,26 (br., 1 H, -COOH).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 24,90, 26,29, 28,58, 29,68, 32,24 (-CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>, 40,98 (-CH<sub>2</sub>-NH), 53,73 (-C<sub>α</sub>H-), 66,76, 67,08 (Z-CH<sub>2</sub>), 127,03, 128,09, 128,19, 128,57, 136,22, 136,54 (C<sub>arom.</sub>), 156,11, 156,61 (-CO-, Z), 176,17 (-COOH).

MS (L-Sims<sup>+</sup>) m/z (rel. Int.): 443 M<sup>+</sup>+H (20%), 309 (21%), 185 (100%,Matrix), 91 (41%), 45 (18%).

## Boc-Gly-Gly-OH

Glycylglycin (1,32 g; 10 mmol) wird in einer Mischung aus 10 ml Wasser, 20 ml Dioxan und 10 ml 1 N Natronlauge gelöst. Unter Eiskühlung wird Di-tert.-butyldicarbonat (2,48 g; 11,4 mmol) gelöst in 5 ml Dioxan zugegeben. Die Mischung wird 48 h bei 4 °C gerührt. Währenddessen wird der pH der Lösung mit 1 N Natronlauge stets bei 10 gehalten. Zur Aufarbeitung wird das Dioxan im Vakuum abgezogen, die wässrige Phase zunächst mit Diethylether extrahiert und nach Ansäuern mit Kaliumhydrogensulfat mit Ethylacetat extrahiert. Nach Waschen und Trocknen der Ethylacetatphase wird das Lösungsmittel entfernt und man erhält Boc-Gly-Gly durch Kristallisation aus Ethylacetat/Hexan.

Ausbeute: 0,89 g (4 mmol; 38%).

Schmelzpunkt: 135-136 °C.

DC: R<sub>f</sub> (E): 0,37.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,38 (s, 9 H, tert.-Butyl, Boc), 3,57 (d, 2 H, <sup>3</sup>J = 5,5 Hz, -CH<sub>2</sub>-CONH-), 3,76 (d, 2 H, <sup>3</sup>J = 5,6 Hz, -CH<sub>2</sub>-COOH), 6,93 (t, 1 H, -Boc-NH-), 8,00 (d, 1 H, <sup>3</sup>J = 5,5 Hz, -CONH-).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 28,20 (tert.-Butyl, Boc), 40,60 (-CH<sub>2</sub>-CONH-), 43,10 (-CH<sub>2</sub>-COOH), 78,12 (C<sub>q</sub>, Boc), 155,78 (-OCONH-), 169,76 (-CONH-), 171,15 (-COOH).

Gly-Gly-O<sup>t</sup>Bu

Boc-Gly-Gly (1,1 g; 4,7 mmol) wird in tert.-Butylacetat gelöst. Portionsweise wird 70%ige Perchlorsäure (470 µl; 5,5 mmol) zugegeben, während 48 h bei 4°C gerührt wird. Nach vollständigem Umsatz wird das Reaktionsgemisch mit 0,5 M Salzsäure mehrmals extrahiert. Die wässrige Phase wird sofort unter Eiskühlung mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird neutral gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird in Diethylether aufgenommen und der pH mit etherischer HCl auf 4-5 eingestellt (Tüpfeln auf feuchtes pH-Papier). Dabei bildet sich ein feiner Niederschlag. Durch Abziehen des Lösungsmittels erhält man Gly-Gly-O<sup>t</sup>Bu · HCl als farblosen hygroskopischen Feststoff. Ausbeute: 123 mg (0,55 mmol; 12%).

DC: R<sub>f</sub> (E): 0,38.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): 1,40 (s, 9 H, tert.-Butyl), 3,57 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-CONH-), 3,79 (d, 2 H, <sup>3</sup>J = 5,8 Hz, -CH<sub>2</sub>-COO<sup>t</sup>Bu), 8,22 (m, 3 H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8,80 (t, 1 H, <sup>3</sup>J = 5,8 Hz, -CONH-).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): 27,45 (tert.-Butyl), 39,68 (-CH<sub>2</sub>-CONH-), 41,04 (-CH<sub>2</sub>-COO<sup>t</sup>Bu), 80,98 (C<sub>q</sub>, tert.-Butyl), 166,39 (-CONH-), 169,49 (-COOH).

Z-Gly-Gly-O<sup>t</sup>Bu

Z-Glycin (2,0 g; 9,5 mmol) und Glycin-tert.butylester (1,25 g; 9,5 mmol) werden in 30 ml Dichlormethan gelöst. Bei 0 °C gibt man Dicyclohexylcarbodiimid (2,2 g; 10,5 mmol) hinzu und lässt langsam auf Raumtemperatur kommen. Nach 24 h ist eine vollständige Umsetzung erreicht. Der entstandene Harnstoff wird abfiltriert und mit Dichlormethan nachgewaschen. Der Rückstand, der beim Einengen der vereinigten Filtrate zurückbleibt, wird in Ethylacetat aufgenommen mit 10%iger Kaliumhydrogensulfatlösung, 5%iger Natriumcarbonat und anschließend mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen mit Natriumsulfat erhält man ein gelbliches Öl. Ausbeute: 2,3 g (7,1 mmol; 72%).

DC: R<sub>f</sub> (E): 0,78.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,46 (s, 9 H, tert.-Butyl), 3,94 (m, 4 H, beide -NH-CH<sub>2</sub>-CO), 5,13 (s, 2 H, Z-CH<sub>2</sub>-), 7,34 (m, 5 H, arom.), 5,54 (m, 1 H, Z-NH-), 6,56 (m, 1 H, -CONH-).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 28,04 (tert.-Butyl), 41,95 (-CH<sub>2</sub>-CONH-), 44,50 (-CH<sub>2</sub>-COO<sup>t</sup>Bu), 67,26 (Z-CH<sub>2</sub>-), 82,53 (C<sub>q</sub>, tert.-Butyl), 128,24, 128,39, 128,56, 128,74, 136,18, 136,29 (C<sub>arom.</sub>), 153,02 (-CO-, Z), 168,79 (-CONH-), 171,15 (-COO<sup>t</sup>Bu).

Gly-Gly-O<sup>t</sup>Bu · HCl

Z-Gly-Gly-O<sup>t</sup>Bu (1,0 g; 3,1 mmol) wird in 30 ml 95%igem Ethanol gelöst. Nach Zugabe von Palladium auf Aktivkohle (300 mg; 10% Pd) wird 2 h bei Normaldruck hydriert. Nach Abfiltrieren vom Katalysator wird mit 0,25 ml konz. HCl versetzt. Ethanol wird im Vakuum weitgehend abgezogen. Es wird mit Wasser auf ca. 10 ml aufgefüllt und lyophilisiert. Der Rückstand wird in wenig Ethanol gelöst und durch Zugabe von Diethylether zum Kristallisieren gebracht. Ausbeute: 600 mg (2,7 mmol; 87 %).

Schmelzpunkt: 173 °C.

DC: R<sub>f</sub>(E) 0,38.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): 1,40 (s, 9 H, tert.-Butyl), 3,57 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-CONH-), 3,79 (d, 2 H, <sup>3</sup>J = 5,8 Hz, -CH<sub>2</sub>-COO<sup>t</sup>Bu), 8,22 (m, 3 H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8,80 (t, 1 H, <sup>3</sup>J = 5,8 Hz, -CONH-).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): 27,45 (tert.-Butyl), 39,68 (-CH<sub>2</sub>-CONH-), 41,04 (-CH<sub>2</sub>-COO<sup>t</sup>Bu), 80,98 (C<sub>q</sub>, tert.-Butyl), 166,39 (-CONH-), 169,49 (-COO<sup>t</sup>Bu).

Z-Doa(Z)-Gly-Gly-O<sup>t</sup>Bu

Z-Doa-(Z)-OH (1,25 g; 3 mmol, Gly-Gly-O<sup>t</sup>Bu · HCl (800 mg; 3,6 mmol), HOBT (486 mg; 3,6 mmol) und Triethylamin (500 µl; 3,6 mmol) werden in 30 ml Tetrahydrofuran gelöst. Unter Rühren und Eiskühlung wird DCC (752 mg; 3,6 mmol) gelöst in 5 ml THF hinzugegeben. Es wird 3 h bei 0 °C und weitere 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Bei vermindertem Druck wird das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen, der ausfallende Harnstoff abfiltriert und es wird nacheinander mit 10%iger KHSO<sub>4</sub>-Lsg., 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und mit Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Das resultierende Öl wird chromatographisch über Kieselgel KG 60 (0,063-0,2 nm), Elutionsmittel Chloroform/Methanol 10:1, von weiteren Nebenprodukten gereinigt. Man erhält ein farbloses Öl. Ausbeute 780 mg (1,3 mmol; 36 %).

DC: R<sub>f</sub>(F) 0,48.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,23-1,87 (m, 8 H (-CH<sub>2</sub>-)<sub>4</sub>), 1,41 (s, 9 H, tert.-Butyl), 3,09 (m, 2 H, -C<sub>γ</sub>H<sub>2</sub>-NH), 3,85 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-CONH-, Gly), 3,94 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO-, Gly), 4,15 (m, 1 H, -C<sub>α</sub>H-, Doa), 5,00 (m, 1 H, -C<sub>γ</sub>H<sub>2</sub>-NH), 5,07 (m, 4 H, Z-CH<sub>2</sub>), 5,73 (m, 1 H, C<sub>α</sub>-NH, Doa), 6,98 (m, 1 H, -NH-CH<sub>2</sub>-CONH-, Gly), 7,19 (m, 1 H, -NH-CH<sub>2</sub>-COO-, Gly), 7,30 (m, 10 H, arom.).

<sup>13</sup>C-NMR (125,7 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 24,88, 26,00, 29,48, 32,24 (-CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>, 27,95 (-CH<sub>3</sub>, tert.-Butyl), 40,58 (-C<sub>γ</sub>H<sub>2</sub>-NH), 41,84 (-CH<sub>2</sub>-CONH-, Gly), 42,82 (-CH<sub>2</sub>-COO-, Gly), 55,00 (-C<sub>α</sub>H-, Doa), 66,52, 67,05

(Z- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 82,26 ( $\text{C}_q$ , tert.-Butyl), 127,84, 128,01, 128,15, 128,45 136,09, 136,60 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 156,46 ( $-\underline{\text{C}}\text{O}-$ , Z), 168,82, 168,88 ( $-\underline{\text{C}}\text{ONH}-$ ), 172,54 ( $-\underline{\text{C}}\text{OO}^t\text{Bu}$ ).

MS (L-Sims<sup>+</sup>) m/z (rel. Int.): 599  $\text{M}^+\text{H}$  (2%), 461 (1%), 369 (3%), 185 (100%, Matrix), 133 (5%), 75 (17%), 57 (12%), 44 (12%).

### Doa-Gly-Gly-O<sup>t</sup>Bu · 2 HCl

Z-Doa(Z)-Gly-Gly-O<sup>t</sup>Bu (720 mg; 1,2 mmol) wird in 30 ml 95%igem Ethanol gelöst. Nach Zugabe von Palladium auf Aktivkohle (120 mg; 10% Pd) und 1,2 ml 2 M HCl wird 2 h bei Normaldruck hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der farblose ölige Rückstand wird mehrfach in Acetonitril aufgenommen und bis zur Trockne eingengt. Man erhält einen farblosen sehr hygroskopischen Feststoff. Ausbeute: 340 mg (0,85 mmol; 71 %).

DC: R<sub>f</sub> (D) 0,57.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): 1,2-1,74 (m, 8 H ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ )<sub>4</sub>), 1,41 (s, 9 H, tert.-Butyl), 2,74 (m, 2 H,  $-\text{C}_\eta\text{H}_2\text{-NH}$ ), 3,71-3,83 (m, 5 H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CONH}-$ , Gly,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-COO}-$ , Gly,  $\text{C}_\alpha\text{H}-$ , Doa), 8,14 (m, 3 H,  $-\text{C}_\zeta\text{H}_2\text{-NH}_3^+$ ), 8,44 (m, 4 H,  $-\text{C}_\alpha\text{H-NH}_3^+$ ,  $-\text{NH-CH}_2\text{-CONH}-$ , Gly), 8,95 (m, 1 H,  $-\text{NH-CH}_2\text{-COO}-$ , Gly).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): 23,49, 25,30, 26,46, 30,52, 33,22 ( $-(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_4$ ), 27,63 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ , tert.-Butyl), 38,38 ( $-\text{C}_\zeta\text{H}_2\text{-NH}_3^+$ ), 41,09 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CONH}-$ , Gly), 41,67 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-COO}-$ , Gly), 52,04 ( $-\text{C}_\alpha\text{H}-$ , Doa), 80,51 ( $\text{C}_q$ , tert.-Butyl), 168,53, 168,86 ( $-\underline{\text{C}}\text{ONH}-$ ), 170,30 ( $-\underline{\text{C}}\text{OO}^t\text{Bu}$ ).

MS (L-Sims<sup>+</sup>) m/z (rel. Int.): 331  $\text{M}^+\text{H}$ , (100%), 275 (27%), 233 (7%), 177 (43%), 133 (28%), 98 (24%), 57 (48%).

### Z-Dcl(Z)-Gly-Gly-O<sup>t</sup>Bu

Z-Dcl(Z)-OH (787 mg; 1,8 mmol), Gly-Gly-O<sup>t</sup>Bu · HCl (400 mg; 1,8 mmol) und Triethylamin (276 µl; 2,0 mmol) werden in 25 ml Tetrahydrofuran gelöst. Unter Rühren und Eiskühlung wird DCC (435 mg; 2,1 mmol) hinzugegeben. Nach 3 h bei 0 °C lässt man auf Raumtemperatur kommen und rührt weitere 12 h. THF wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Ethylacetat/Diethylether aufgenommen und der ausgefallene Harnstoff wird abfiltriert. Die organische Phase wird mit 10%iger KHSO<sub>4</sub>-Lsg., 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Entfernen des Lösungsmittels unter

vermindertem Druck erhält man 750 mg eines gelblichen Öls. Eine chromatographische Reinigung über Kieselgel KG 60 (0,063-0,2 nm), Elutionsmittel Chloroform/Methanol 15:1, liefert ein farbloses Öl. Zur Abtrennung von restlichem DCU wird in wenig Dichlormethan aufgenommen, mehrere Tage bei 4 °C belassen, filtriert und vom Lösungsmittel befreit. Ausbeute: 530 mg (0,87 mmol; 49 %).

DC:  $R_f$  (G) 0,35.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,17-1,67 (m, 10 H ( $-\text{CH}_2-$ )<sub>5</sub>), 1,31 (s, 9 H, tert.-Butyl), 3,02 (m, 2 H,  $-\text{C}_\eta\text{H}_2-\text{NH}$ ), 3,76 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{CONH}-$ , Gly), 3,85 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ , Gly), 4,06 (m, 1 H,  $-\text{C}_\alpha\text{H}-$ , Dcl), 4,89 (m, 1 H,  $-\text{C}_\eta\text{H}_2-\text{NH}$ ), 4,96 (m, 4 H, Z- $\text{CH}_2$ ), 5,65 (m, 1 H,  $\text{C}_\alpha-\text{NH}$ , Dcl), 6,95 (m, 1 H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CONH}-$ , Gly), 7,16 (m, 1 H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COO}-$ , Gly), 7,20 (m, 10 H, arom.).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125,7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 25,21, 26,22, 28,57, 29,61, 32,22 ( $-(\text{CH}_2)_5$ ), 27,93 ( $-\text{CH}_3$ , tert.-Butyl), 40,79 ( $-\text{C}_\eta\text{H}_2-\text{NH}$ ), 41,82 ( $-\text{CH}_2-\text{CONH}-$ , Gly), 42,82 ( $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ , Gly), 55,11 ( $-\text{C}_\alpha\text{H}-$ , Dcl), 66,47, 67,01 (Z- $\text{CH}_2$ ), 82,21 ( $\text{C}_q$ , tert.-Butyl), 127,98, 128,12, 128,46, 128,74 136,08, 136,58 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 156,41 ( $-\text{CO}-$ , Z), 168,83, 168,92 ( $-\text{CONH}-$ ), 172,61 ( $-\text{COO}^t\text{Bu}$ ).

MS (L-Sims<sup>+</sup>)  $m/z$  (rel. Int.): 613  $\text{M}^+\text{+H}$  (6%), 557 (3%), 479 (7%), 185 (100%, Matrix), 91 (27%), 57 (14%), 45 (14%).

#### Dcl-Gly-Gly- $\text{O}^t\text{Bu} \cdot 2 \text{HCl}$

Z-Dcl-(Z)-Gly-Gly- $\text{O}^t\text{Bu}$  (520 mg, 0,85 mmol) wird in 20 ml 95%igem Ethanol gelöst. Es werden 85 mg Palladium auf Aktivkohle (10% Pd) und 850  $\mu\text{l}$  2 M HCl zugegeben und 2 h unter Normaldruck hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert und Ethanol bei vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Man erhält einen hygroskopischen farblosen Feststoff. Ausbeute: 300 mg (0,62 mmol; 76 %).

DC:  $R_f$  (D) 0,70.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 1,21-1,68 (m, 10 H ( $-\text{CH}_2-$ )<sub>5</sub>), 1,38 (s, 9 H, tert.-Butyl), 2,71 (m, 2 H,  $-\text{C}_\eta\text{H}_2-\text{NH}$ ), 3,64-3,83 (m, 5 H,  $-\text{CH}_2-\text{CONH}-$ , Gly,  $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ , Gly,  $\text{C}_\alpha\text{H}-$ , Dcl), 8,00 (m, 6 H,  $-\text{NH}_3^+$ ), 8,40 (m, 1 H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CONH}-$ , Gly), 8,85 (m, 1 H,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COO}-$ , Gly).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125,7 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): 24,05, 25,57, 26,79, 28,12, 31,17 ( $-(\text{CH}_2)_5$ ), 27,72 ( $-\text{CH}_3$ , tert.-Butyl), 38,57 ( $-\text{C}_\eta\text{H}_2-\text{NH}_3^+$ ), 41,19 ( $-\text{CH}_2-\text{CONH}-$ , Gly), 41,75 ( $-\text{CH}_2-\text{COO}-$ , Gly), 52,46 ( $-\text{C}_\alpha\text{H}-$ , Dcl), 80,60 ( $\text{C}_q$ , tert.-Butyl), 168,73 (2x  $-\text{CONH}-$ ), 169,77 ( $-\text{COO}^t\text{Bu}$ ).

MS (L-Sims<sup>+</sup>) m/z (rel. Int.): 345 M<sup>+</sup>+H (68%), 289 (35%), 133 (12%), 112 (25%), 91 (100%), 57 (62%).

### 3.2.2 [Lys<sup>15</sup>Ψ[COCH<sub>2</sub>]Gly<sup>16</sup>]TKI

#### Bz-Lys(Z)-OH

N<sub>ε</sub>-Z-Lys-OH (2,8 g; 10 mmol) und Triethylamin (1,39 ml; 10 mmol) werden in 10 ml THF und 10 ml 5%iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lsg. gelöst. Bei Raumtemperatur wird langsam Benzoylchlorid (1,15 ml; 10 mmol) hinzugegeben und 30 min gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wird das THF weitgehend abgezogen und das Reaktionsgemisch wird mit KHSO<sub>4</sub> angesäuert. Man extrahiert mehrfach mit Ethylacetat/Diethylether, wäscht die organische Phase mit 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lsg., 10%iger KHSO<sub>4</sub>-Lsg. und Wasser, trocknet über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und entfernt das Lösungsmittel. Der Rückstand wird in Ethylacetat/Hexan umkristallisiert abgesaugt und getrocknet. Man erhält Bz-Lys(Z)-OH als weißen Feststoff (7,3 mmol; 73 %).

Schmelzpunkt: 80 °C.

DC: R<sub>f</sub>(E) 0,31.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,49 (m, 4 H, (-CH<sub>2</sub>-)<sub>2</sub>), 1,89 (m, 2 H, -C<sub>β</sub>H<sub>2</sub>-), 3,18 (m, 2 H, -N<sub>ε</sub>-CH<sub>2</sub>-), 4,79 (m, 1 H, -C<sub>α</sub>H-), 5,02 (s, 2 H, Z-CH<sub>2</sub>-), 7,29, 7,78 (m, 10 H, arom.), 9,26 (-COOH)

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 22,32, 29,43, 31,44 ((-CH<sub>2</sub>-)<sub>3</sub>), 40,35 (-N<sub>ε</sub>-CH-), 52,69 (-C<sub>α</sub>H-), 66,84 (Z-CH<sub>2</sub>-), 127,30, 128,01, 128,15, 128,54, 128,67, 131,87, 133,49, 136,37 (C<sub>arom.</sub>), 157,06 (-CO-, Z), 168,12 (-CO-, Bz), 175,16 (-COOH)

#### MMS-Anhydrid

Monomethylsuccinat (3,96 g; 30 mmol) und EDC (3,84 g; 20 mmol) werden in 100 ml Dichlormethan gelöst. Nach 30 min Rühren wird die Reaktionsmischung mit eiskaltem Wasser, 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und temperiertem Wasser (RT) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und bei maximal 30 °C unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Man erhält 3,42 g farbloses Öl (13,8 mmol; 92 %), das sofort weiterverwendet werden muss.

Bz-Lys(Z) $\Psi$ [COCH<sub>2</sub>]Gly-OMe

Bz-Lys(Z)-OH (4,51 g; 12,2 mmol), Triethylamin (2,56 ml; 18,3 mmol) und DMAP (50 mg; 0,4 mmol) werden zu frisch synthetisiertem MMS-Anhydrid gegeben. Die ölige Mischung wird im Wasserbad leicht erwärmt und gerührt. Nach 1 h werden 10 ml Eisessig hinzugegeben. Man rührt weitere 30 min und engt dann im Vakuum ein. Der Rückstand wird in 120 ml 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. aufgenommen und nochmals 1 h gerührt. Anschließend wird mit Ethylacetat erschöpfend extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden mit 0,1 M Essigsäure und Wasser gewaschen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Es verbleibt ein gelber öliger Rückstand, der über Kieselgel KG 60 (0,063-0,2 nm), Elutionsmittel Chloroform/Aceton 7:1, chromatographisch weiter aufgereinigt wird. Man erhält ein farbloses Öl, das bei 4 °C erstarrt. Ausbeute 4,2 g (9,2 mmol; 75%).

DC: R<sub>f</sub> (F) 0,80.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,33 - 1,99 (m, 6 H, (-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), 2,51 - 2,97 (m, 4 H, -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), 3,18 (m, 2 H, -N<sub>ε</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3,63 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>), 4,84 (m, 1 H, -C<sub>α</sub>H-), 5,03 (s, 2 H, Z-CH<sub>2</sub>-), 7,27, 7,83 (m, 10 H, arom.).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 21,95, 27,51, 29,39, 30,69, 34,40 ((-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>), -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-, 40,21 (-N<sub>ε</sub>-CH-), 52,59 (-C<sub>α</sub>H-), 58,41 (-OCH<sub>3</sub>), 66,64 (Z-CH<sub>2</sub>-), 127,21, 127,81, 128,50, 128,93, 131,81, 133,82, 136,61 (C<sub>arom.</sub>), 156,81 (-CO-, Z), 167,52 (-CO-, Bz), 171,21 (-COOMe), 207,53 (-CO-CH<sub>2</sub>-).

MS (FAB<sup>+</sup>) m/z (rel. Int.): 455 M<sup>+</sup>+H (12%), 411 (5%), 174 (7%), 105 (59%), 91 (100), 77 (10%).

Lys $\Psi$ [COCH<sub>2</sub>]Gly-OH · HCl

Bz-Lys(Z) $\Psi$ [COCH<sub>2</sub>]Gly-OMe (4,1g; 9,0 mmol) wird in 100 ml 6 M Salzsäure suspensiert und 3 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird mit Ethylacetat extrahiert. Die wässrige Phase wird bis zur Trockne eingengt, mehrmals in Wasser aufgenommen und erneut eingengt bis der Geruch von HCl verschwunden ist. Ausbeute 2,17 g (7,9 mmol; 85%).

DC: R<sub>f</sub> (D) 0,40.

Boc-Lys(Boc) $\Psi$ [COCH<sub>2</sub>]Gly-OH

Lys $\Psi$ [COCH<sub>2</sub>]Gly-OH · HCl (2,0 g; 7,2 mmol) wird in 20 ml entgastem Wasser und 10 ml Dioxan gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt. Unter Schutzgasatmosphäre wird Di-tert.-butyldicarbonat (3,5 g; 16 mmol) gelöst in 10 ml Dioxan hinzugegeben. Der pH-Wert der Reaktionslösung wird durch Zugabe von 5%iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung stets bei 7,2 gehalten. Nach vollständiger Umsetzung der Aminosäure wird Dioxan im Vakuum entfernt und die Lösung mit Ethylacetat extrahiert. Die wässrige Phase wird auf 0 °C abgekühlt mit 10%iger KHSO<sub>4</sub>-Lsg. auf pH 2 gebracht und mit Ethylacetat extrahiert. Nach Waschen und Trocknen der organischen Phase wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält 150 mg farbloses Öl (0,37 mmol; 5%).

DC: R<sub>f</sub> (F) 0,68.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,28 - 2,02 (m, 6 H, (-CH<sub>2</sub>-)<sub>3</sub>), 1,52 (s, 18H, 2 x tert.-Butyl, Boc), 2,63 - 2,91 (m, 4 H, -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 3,11 (m, 2 H, -N<sub>ε</sub>-CH<sub>2</sub>-), 4,85 (m, 1 H, -C<sub>α</sub>H-), 9,34 (br., 1 H, -COOH).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 21,03, 27,45, 29,70, 30,76, 34,42 ((-CH<sub>2</sub>-)<sub>3</sub>, -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), 28,39 (tert.-Butyl, Boc), 40,07 (N<sub>ε</sub>-CH-), 53,51 (-C<sub>α</sub>H-), 176,88 (-COOH), 208,50 (-CO-CH<sub>2</sub>-).

Lys $\Psi$ [COCH<sub>2</sub>]GlyO<sup>t</sup>Bu

Boc-Lys(Boc) $\Psi$ [COCH<sub>2</sub>]Gly-OH · HCl (150mg; 0,37 mmol) wird in 5 ml Essigsäure-tert.-butylester gelöst. Nach Zugabe von 70%iger Perchlorsäure (30 µl; 0,4 mmol) wird 12 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit eisgekühlter 0,5 M HCl extrahiert. Die salzsaure Phase wird sofort mit festem NaHCO<sub>3</sub> neutralisiert und mit Ethylacetat/Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Das resultierende Öl wird in Diethylether aufgenommen und durch Zugabe von Diethylether/HCl auf pH 4-5 gebracht. Nach Entfernen des Lösungsmittels verbleibt ein hygroskopischer Feststoff (80 mg; 0,20 mmol).

DC: R<sub>f</sub> (D) 0,38.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): 1,29 - 1,83 (m, 6 H, (-CH<sub>2</sub>-)<sub>3</sub>), 1,37 (s, 9 H, tert.-Butyl), 2,38 (m, 2 H, -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 2,75 (m, 4 H, -N<sub>ε</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), 4,42 (m, 1 H, -C<sub>α</sub>H-), 9,34 (br., 1 H, -COOH).

$^{13}\text{C}$ -NMR (62,9 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ ): 22,56, 26,48, 27,56, 28,52, 33,46, ((- $\text{CH}_2$ -) $_3$ , -CO- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -CO-), 27,63 (tert.-Butyl, Boc), 38,32 ( $\text{N}_\epsilon$ - $\text{CH}$ -), 52,71 (- $\text{C}_\alpha$ H-), 79,58 ( $\text{C}_q$ , tert.-Butyl) 171,30 (-COOH), 208,31 (-CO- $\text{CH}_2$ -).

### Z-Phe-Lys(Z)-OMe

Z-Phe-OSu (4,0 g; 10 mmol) wird in 50 ml Dimethoxyethan gelöst. Unter Rühren wird Lys(Z)-OMe  $\cdot$  HCl (3,34 g; 10 mmol) und Triethylamin (1,46 ml, 10,5 mmol) hinzugefügt. Nach 48 h Rühren bei 4 °C wird das Reaktionsgemisch im Vakuum bei maximal 35 °C eingeengt. Der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen und mit 10%iger  $\text{KHSO}_4$ -Lsg. gewaschen. Anschließend wird mit Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Umkristallisieren aus Ethylacetat/Hexan liefert 5,17 g farblose Kristalle (9,0 mmol; 90%).

Schmelzpunkt: 220-222 °C.

DC:  $R_f$  (F) 0,48.

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,18 - 1,885 (m, 6 H, (- $\text{CH}_2$ -) $_3$ ), 2,90 (m, 2H, - $\text{CH}_2$ -, Phe) 3,01 (m, 2 H, - $\text{N}_\epsilon$ - $\text{CH}_2$ -), 3,69 (s, 3 H, - $\text{OCH}_3$ ), 4,28 (m, 1 H, - $\text{C}_\alpha$ H, Phe), 4,46 (m, 1 H, - $\text{C}_\alpha$ H-, Lys), 4,99, 5,02 (s, 4 H, Z- $\text{CH}_2$ -), 7,08, 7,26 (m, 15 H, arom.).

### Z-Phe-Lys(Z)-OH

Z-Phe-Lys(Z)-OMe (5,10 g; 8,9 mmol) wird in 100 ml THF gelöst. Es wird mit einem Überschuss wässriger NaOH versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wird mit 10%iger  $\text{KHSO}_4$ -Lsg. neutralisiert und THF wird unter vermindertem Druck weitgehend entfernt. Man extrahiert die wässrige Phase mit Ethylacetat und wäscht die organischen Extrakte mit Wasser. Nach Trocknen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  wird im Vakuum eingeengt. Der ölige Rückstand wird in wenig Ethylacetat aufgenommen und durch Zugabe von Diethylether ausgefällt. Man erhält 4,35 g Z-Phe-Lys(Z)-OH (7,7 mmol; 88%).

DC:  $R_f$  (E) 0,25.

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,38 - 1,86 (m, 6 H, (- $\text{CH}_2$ -) $_3$ ), 3,07 (m, 4H, - $\text{CH}_2$ -, Phe,, - $\text{N}_\epsilon$ - $\text{CH}_2$ -, Lys), 4,40 (m, 1 H, - $\text{C}_\alpha$ H, Phe), 4,54 (m, 1 H, - $\text{C}_\alpha$ H-, Lys), 4,85, 5,01 (s, 4 H, Z- $\text{CH}_2$ -), 7,12, 7,35 (m, 15 H, arom.).

Z-Phe-Lys(Z) $\Psi$ [COCH<sub>2</sub>]Gly-OMe

Zu frisch synthetisiertem MMS-Anhydrid (3,39 g; 15 mmol) werden Z-Phe-Lys(Z)-OH (4,25g; 7,6 mmol), Triethylamin (1,9 ml; 15 mmol) und DMAP (20 mg; 0,15mmol) gegeben. Man erwärmt auf 50 °C und rührt 2 Stunden. Nach Abziehen von Triethylamin wird der Rückstand in 50 ml 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. aufgenommen und 1 h gerührt. Das Produkt wird mit Ethylacetat extrahiert, die organische Phase mit 0,1 M Essigsäure und gesättigter Salzlösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Nach Umkristallisieren in Ethylacetat/Hexan erhält man 2,8 g farblose Kristalle (4,4 mmol; 58%).

Schmelzpunkt : 128-131 °C.

DC: R<sub>f</sub>(A) 0,55.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,04 - 1,77 (m, 6 H, (-CH<sub>2</sub>-)<sub>3</sub>, Lys), 2,46 - 2,75 (m, 4 H, -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), 3,07 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-, Phe), 3,12 (m, 2 H, -N<sub>ε</sub>-CH<sub>2</sub>-, Lys), 3,60 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>), 4,42 - 4,56 (m, 2 H, -C<sub>α</sub>H, Phe, -C<sub>α</sub>H-, Lys), 5,05, 5,06 (s, 4 H, Z-CH<sub>2</sub>-), 7,17, 7,32 (m, 15 H, arom.).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 21,53, 27,37, 29,33, 30,40, 34,19 ((-CH<sub>2</sub>-)<sub>3</sub>, -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), 38,57 (-CH<sub>2</sub>-, Phe), 40,23 (-N<sub>ε</sub>-CH-), 51,88 (-C<sub>α</sub>H-, Lys), 56,31 (-C<sub>α</sub>H-, Phe), 57,79 (-OCH<sub>3</sub>), 66,66, 67,12 (Z-CH<sub>2</sub>-), 127,05, - 136,67 (C<sub>arom.</sub>), 156,58, 156,68 (-CO-, Z), 170,77 (-COOMe), 173,00 (-CONH-), 206,61 (-CO-CH<sub>2</sub>-).

MS (EI, 70 eV) m/z (rel. Int.): 632 M<sup>+</sup> (3%), 425 (7%), 241 (19%), 149 (39%), 117 (15%), 93 (100%, Matrix), 75 (50%), 57 (26%), 45 (16%).

Phe-Lys $\Psi$ [COCH<sub>2</sub>]Gly-OMe

Z-Phe-Lys(Z) $\Psi$ [COCH<sub>2</sub>]Gly-OMe (2,8 g; 4,4 mmol) wird in HBr/Eisessig 33%ig aufgenommen und zunächst unter Eiskühlung, dann bei Raumtemperatur jeweils 30 min gerührt. Anschließend Zugabe von 100 ml eisgekühltem Diethylether bringt das Produkt zum ausfallen. Es wird abgesaugt, mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Produkt wird ohne Analytik sofort weiter umgesetzt.

DC: R<sub>f</sub>(D) 0,77.

Boc-Phe-Lys(Boc) $\Psi$ [COCH<sub>2</sub>]Gly-OH

Phe-Lys $\Psi$ [COCH<sub>2</sub>]Gly-OMe wird in 5 ml Wasser und 10 ml Dioxan gelöst. Die Reaktionsmischung wird mit 5 N NaOH auf pH 8 eingestellt und unter Rühren und Kühlung auf 0 °C mit Di-tert.-butyldicarbonat (1,96 g; 9,0 mmol) versetzt. Man lässt auf Raumtemperatur kommen und rührt weitere 24 h, dabei wird der pH-Wert stets bei 8 gehalten. Nach vollständiger Umsetzung wird das Dioxan im Vakuum entfernt, die wässrige Phase mit Ethylacetat gewaschen, mit KHSO<sub>4</sub> angesäuert und mit Diethylether extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen und durch Zugabe von Hexan zum Kristallisieren gebracht. Man erhält 1,85 g farblose Kristalle (3,3 mmol; 75 %).

Schmelzpunkt : 102-104 °C.

DC: R<sub>f</sub> (F) 0,48.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,05 - 1,81 (m, 6 H, (-CH<sub>2</sub>-)<sub>3</sub>, Lys), 1,37, 1,38 (s, 18 H, tert.-Butyl, Boc) 2,27 - 2,84 (m, 4 H, -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), 3,03 (m, 4 H, -CH<sub>2</sub>-, Phe, -N<sub>ε</sub>-CH<sub>2</sub>-, Lys), 4,41 (m, 1 H, -C<sub>α</sub>H-, Phe) 4,53 /m, 1 H, C<sub>α</sub>H-, Lys), 7,20, 7,26 (m, 5 H, arom.), 9,66 (br., 1 H, -COOH).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 21,80, 27,46, 29,56, 30,64, 34,27 ((-CH<sub>2</sub>-)<sub>3</sub>, -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), 28,47 (tert.-Butyl) 38,44 (-CH<sub>2</sub>-, Phe), 39,97 (-N<sub>ε</sub>-CH-), 51,89 (-C<sub>α</sub>H-, Lys), 57,81 (-C<sub>α</sub>H-, Phe), 127,01 - 136,66 (C<sub>arom.</sub>), 156,05 (-CO-, Boc), 171,12 (-COO-), 172,93 (-CONH-), 206,71 (-CO-CH<sub>2</sub>-).

MS (EI, 70 eV) m/z (rel. Int.): 550 M<sup>+</sup> (8%), 450 (8%), 394 (10%), 120 (24%), 93 (100%, Matrix), 75 (33%), 57 (63%), 45 (17%).

Boc-Phe-Lys(Boc) $\Psi$ [COCH<sub>2</sub>]Gly-OSu

Boc-Phe-Lys(Boc) $\Psi$ [COCH<sub>2</sub>]Gly-OH (0,55 g; 1,0 mmol) wird in 20 ml Acetonitril aufgenommen. Man gibt DSC (260 mg; 1,0 mmol) und 80 µl Pyridin zu und rührt bei Raumtemperatur. Nach 12 h wird weiteres DSC (130 mg; 0,5 mmol) zugegeben und nochmals 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird wenig Wasser addiert, 30 min gerührt und unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser gewaschen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Ausbeute: 520 mg farbloser Feststoff (0,80 mmol; 80%).

Schmelzpunkt: 152 °C.

DC: R<sub>f</sub> (F) 0,63.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,03 - 1,94 (m, 6 H,  $(-\text{CH}_2-)_3$ , Lys), 1,41, 1,43 (s, 18 H, tert.-Butyl, Boc) 2,75 - 2,88 (m, 4 H,  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ), 2,81 (s, 4 H,  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ , OSu), 3,05 (m, 4 H,  $-\text{CH}_2-$ , Phe,  $-\text{N}_\epsilon-\text{CH}_2-$ , Lys), 4,34 (m, 1 H,  $-\text{C}_\alpha\text{H}$ , Phe) 4,54 (m, 1 H,  $\text{C}_\alpha\text{H}$ , Lys), 4,67 (m, 1 H,  $\text{C}_\alpha-\text{NH}$ , Phe), 5,07 (m, 1 H,  $\epsilon\text{NH}$ ), 6,62 (m, 1 H,  $\text{C}_\alpha-\text{NH}$ , Lys) 7,21, 7,29 (m, 5 H, arom.).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 22,06, 24,96, 29,62, 30,62, 33,98 ( $(-\text{CH}_2-)_3$ ,  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ), 25,66 ( $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ , OSu), 28,48 (tert.-Butyl) 38,13 ( $-\text{CH}_2-$ , Phe), 40,11 ( $-\text{N}_\epsilon-\text{CH}_2-$ ), 49,16 ( $-\text{C}_\alpha\text{H}$ , Lys), 57,69 ( $-\text{C}_\alpha\text{H}$ , Phe), 127,01 - 136,65 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 156,06 ( $-\text{CO}-$ , Boc), 167,89 ( $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ , OSu), 168,93 ( $-\text{COO}-$ ), 171,41 ( $-\text{CONH}-$ ), 205,18 ( $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ).

MS ( $\text{FAB}^+$ )  $m/z$  (rel. Int.): 647  $\text{M}^++\text{H}^-$  (3%), 547 (5%), 225 (8%), 120 (35%), 93 (100%, Matrix), 75 (30%), 57 (87%), 45 (20%).

### 3.2.3 [N-Me-Ava<sup>16,17</sup>]TKI

#### Boc-N-Me-Ava

N-Methylpiperidon (500 mg; 4,4 mmol) wird in 1 ml konzentrierter Salzsäure 2 h unter Rühren refluxiert. Anschließend wird die salzsaure Lösung mit 5 M Natronlauge auf pH 10 eingestellt. Unter Eiskühlung wird Di-tert.-butyldicarbonat (950 mg; 4,4 mmol) gelöst in 5 ml Dioxan langsam zugegeben. Die Mischung wird 2 h bei 0°C gerührt. Der pH der Lösung wird mit 5 M Natronlauge stets bei 10 gehalten. Nach vollständiger Umsetzung wird das Dioxan im Vakuum entfernt, die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert und nach Ansäuern mit festem Kaliumhydrogensulfat mit Diethylether extrahiert. Nach Waschen und Trocknen der Etherphase über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Man erhält ein farbloses Öl. Ausbeute: 350 mg (1,5 mmol; 35%).

DC:  $R_f$  (B) 0,50.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,45 (s, 9H, tert.-Butyl, Boc), 1,60 (m, 4 H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 2,38 (t, 2 H,  $^3J = 6,7$  Hz,  $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ), 2,84 (s, 3 H, N- $\text{CH}_3$ ), 3,23 (t, 2 H,  $^3J = 7,0$  Hz, N- $\text{CH}_2-$ ), 9,82 (br., 1 H -  $\text{COOH}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 21,81, 27,21 ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), 28,47 (tert.-Butyl), 33,67 (N- $\text{CH}_3$ ), 34,11 ( $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ), 50,06 (N- $\text{CH}_2-$ ), 79,50 ( $\text{C}_q$ , tert.-Butyl), 155,95 ( $-\text{CO}-$ , Boc), 178,73 ( $-\text{COOH}$ ).

MS ( $\text{FAB}^+$ )  $m/z$  (rel. Int.): 232  $\text{M}^++\text{H}$  (39%), 176 (78%), 132 (83%), 114 (77%), 57 (100%).

## Boc-N-Me-Ava-OSu

Boc N-Me-Ava (350 mg; 1,5 mmol) und N-Hydroxysuccinimid (174 mg; 1,5 mmol) werden in 20 ml Dichlormethan gelöst. Unter Rühren und Eiskühlung wird mit DCC (309 mg; 1,5 mmol) versetzt. Nach 2 h bei 0 °C lässt man auf Raumtemperatur kommen und rührt weitere 12 h. Dichlormethan wird bei vermindertem Druck abgezogen. Der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen. Ausgefallener Harnstoff wird abfiltriert. Die Ethylacetatphase wird mit 10%iger KHSO<sub>4</sub>-Lsg., 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingeeengt. Nach Umkristallisieren aus Isopropanol erhält man 280 mg Boc-N-Me-Ava-OSu (0,85 mmol; 57%) als farblose Kristalle.

DC: R<sub>f</sub> (F) 0,78.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,46 (s, 9H, tert.-Butyl, Boc), 1,54-1,78 (m, 4 H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 2,65 (t, 2 H, <sup>3</sup>J = 6,7 Hz, -CH<sub>2</sub>-COO-), 2,84 (s, 3 H, N-CH<sub>3</sub>), 2,83 (s, 4 H, CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 3,25 (t, 2 H, <sup>3</sup>J = 6,9 Hz, N-CH<sub>2</sub>-).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 21,71 26,94 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 25,59 (CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 28,44 (tert.-Butyl), 30,61 (-CH<sub>2</sub>-COO-), 33,93 (N-CH<sub>3</sub>), 48,05 (N-CH<sub>2</sub>-), 77,26 (C<sub>q</sub>, tert.-Butyl), 156,30 (-CO-, Boc), 168,53 (-COO-), 169,15 (CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO).

MS (FAB<sup>+</sup>) m/z (rel. Int.): 329 M<sup>+</sup>+H (13%), 132 (76%), 93 (100%, Matrix), 57 (22%).

N-Me-Ava-O<sup>t</sup>Bu · HCl

Boc-N-MeAva (1,0 g; 4,3 mmol) wird in 10 ml Essigsäure-tert.-butylester gelöst. Nach Zugabe von 70%iger Perchlorsäure (370 µl; 4,3 mmol) wird 12 h bei 0 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit 0,5 M HCl extrahiert. Die wässrige Phase wird unter Eiskühlung mit 1 M Natronlauge auf pH 12 gebracht und sofort mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird neutral gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingeeengt. Das resultierende Öl wird in Diethylether aufgenommen und durch Zugabe von Diethylether/HCl ausgefällt. Ausbeute: 260 mg (1,2 mmol; 28 %).

DC: R<sub>f</sub> (D) 0,80.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,44 (s, 9H, tert.-Butyl), 1,66-1,93 (m, 4 H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 2,27 (t, 2 H, <sup>3</sup>J = 7,1 Hz, -CH<sub>2</sub>-COO<sup>t</sup>Bu), 2,68 (t, 3 H, <sup>3</sup>J = 5,6 Hz, N-CH<sub>3</sub>), 2,96 (m, 2 H, N-CH<sub>2</sub>-), 9,44 (br., 2 H, -NH<sub>2</sub><sup>+</sup>-).

$^{13}\text{C}$ -NMR (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 22,04, 25,22 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ), 28,13 (tert.-Butyl), 32,84 ( $\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 34,62 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{COOH}$ ), 49,03 ( $\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ), 80,60 ( $\text{C}_q$ , tert.-Butyl), 172,28 ( $-\underline{\text{C}}\text{OO}^t\text{Bu}$ ).

### Z-Lys(Z)-OSu

Z-Lys(Z)-OH (500 mg; 1,4 mmol) und N-Hydroxysuccinimid (155 mg; 1,4 mmol) werden in 10 ml Dichlormethan gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit DCC (310 mg; 1,5 mmol) versetzt. Nach 2 h bei 0 °C wird für weitere 24 h bei 4 °C gerührt. Dichlormethan wird bei vermindertem Druck abgezogen und der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen. Ausgefallener Harnstoff wird abfiltriert. Die Ethylacetatphase wird mit 10%iger  $\text{KHSO}_4$ -Lsg., 5%iger  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. und Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingeeengt. Nach Umkristallisieren aus Isopropanol erhält man 480 mg farblose Kristalle (0,94 mmol; 67%).

Schmelzpunkt: 110 °C.

DC:  $R_f$  (F) 0,70.

$^1\text{H}$ -NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,51 (m, 4 H ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ )<sub>2</sub>), 1,91 (m, 2 H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$ ), 2,75 (s, 4 H,  $-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CO}-$ ), 3,18 (m, 2 H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}$ ), 4,71 (m, 1 H,  $-\text{C}_\alpha\text{H}-$ ), 5,06 (m, 1 H,  $\text{C}_\epsilon-\underline{\text{N}}\text{H}$ ), 5,11 (s, 2 H,  $\text{Z}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 5,16 (s, 2 H,  $\text{Z}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 5,53 (m, 1 H,  $\text{C}_\alpha-\underline{\text{N}}\text{H}$ ), 7,32 (m, 10 H, arom.).

$^{13}\text{C}$ -NMR (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 21,71, 29,13, 31,94 ( $-(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_3$ ), 25,56 ( $-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CO}-$ ), 40,21 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}$ ), 52,22 ( $-\underline{\text{C}}_\alpha\text{H}-$ ), 66,62, 67,39 ( $\text{Z}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 128,03, 128,27, 128,48, 128,56, 136,02, 136,74 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 155,68, 156,64 ( $-\underline{\text{C}}\text{O}-$ , Z), 168,19 ( $-\underline{\text{C}}\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{O}-$ ), 168,66 ( $-\underline{\text{C}}\text{OO}-$ ).

### Z-Lys(Z)-N-Me-Ava-O<sup>t</sup>Bu

Z-Lys(Z)-OSu (340 mg; 0,66 mmol), N-Me-AvaO<sup>t</sup>Bu · HCl (148 mg; 0,66 mmol) und Triethylamin (85 µl; 0,66 mmol) werden in 10 ml Chloroform gelöst und 72 h bei 4 °C gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird in Ethylacetat aufgenommen, mit 10%iger  $\text{KHSO}_4$ -Lsg., 5%iger  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. und Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingeeengt. Man erhält Z-Lys(Z)-N-Me-Ava-O<sup>t</sup>Bu als farbloses Öl. Ausbeute: 150 mg (0,26 mmol; 39%).

DC:  $R_f$  (A) 0,45.

$^1\text{H}$ -NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,33-1,95 (m, 10 H  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ , Lys bzw. Ava), 1,43 (s, 9 H, tert.-Butyl), 2,25 (m, 2 H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{COO}^t\text{Bu}$ ), 2,90 (m, 3 H,  $\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 3,18 (m, 2 H,  $-\text{C}_\epsilon\text{H}_2-\text{NH}$ , Lys), 3,29 (m, 2 H,  $\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ , Ava), 4,61 (m, 1 H,  $-\text{C}_\alpha\text{H}-$ , Lys), 5,01 (m, 1 H,  $\text{C}_\epsilon-\underline{\text{N}}\text{H}$ , Lys), 5,07 (s, 4 H,  $\text{Z}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 5,71 (m, 1 H,  $\text{C}_\alpha-\underline{\text{N}}\text{H}$ , Lys), 7,32 (m, 10 H, arom.).

$^{13}\text{C}$ -NMR (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 22,19, 26,43, 29,39, 30,35, 32,73 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ , Lys bzw Ava), 28,17 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ , tert.-Butyl), 33,63 ( $\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 33,29 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{COO}^t\text{Bu}$ ), 40,72 ( $-\underline{\text{C}}_\epsilon\text{H}_2-\text{NH}$ , Lys), 47,69 ( $\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ , Ava), 50,62 ( $-\underline{\text{C}}_\alpha\text{H}-$ , Lys), 66,56, 66,84 ( $\text{Z}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 80,19 ( $\text{C}_q$ , tert.-Butyl), 127,99, 128,03, 128,07, 128,48, 136,47, 136, 74 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 156,39, 156,48 ( $-\underline{\text{C}}\text{O}-$ , Z), 171,57 ( $-\underline{\text{C}}\text{ON}(\text{CH}_3)-$ ), 172,76 ( $-\underline{\text{C}}\text{OO}^t\text{Bu}$ ).

MS ( $\text{FAB}^+$ )  $m/z$  (rel. Int.): 584  $\text{M}^++\text{H}$  (5%), 528 (5%), 222 (4%), 181 (5%), 132 (12%), 91 (100%), 57 (24%).

### Lys-N-Me-Ava- $\text{O}^t\text{Bu}$ · HCl

Z-Lys(Z)-N-Me-Ava $\text{O}^t\text{Bu}$  (427 mg; 0,73 mmol) wird in 20 ml 95%igem Ethanol gelöst. Nach Zugabe von Palladium auf Aktivkohle (73 mg; 10% Pd) und 730  $\mu\text{l}$  2 M HCl wird 2 h bei Normaldruck hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert und Ethanol wird bei vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in Acetonitril aufgenommen und bis zur Trockne eingengt. Man erhält ein farbloses Öl. Ausbeute 245 mg (0,63 mmol; 87%).

DC:  $R_f$  (D) 0,52.

$^1\text{H}$ -NMR (250 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 1,18-1,59 (m, 10 H  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ , Lys bzw Ava), 1,40 (s, 9 H, tert.-Butyl), 2,25 (t, 2 H,  $^3J = 6,5$  Hz,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{COO}^t\text{Bu}$ ), 2,73 (t, 2 H,  $^3J = 6,5$  Hz,  $\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ , Ava), 2,92 (m, 3 H,  $\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 3,23 (m, 2 H,  $-\underline{\text{C}}_\epsilon\text{H}_2-\text{NH}_3^+$ , Lys), 4,07 (m, 1 H,  $-\underline{\text{C}}_\alpha\text{H}-$ , Lys).

$^{13}\text{C}$ -NMR (62,9 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 22,14, 25,67, 26,52, 30,55, 32,93 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ , Lys bzw Ava), 27,71 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ , tert.-Butyl), 34,28 ( $\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 34,45 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{COO}^t\text{Bu}$ ), 40,49 ( $-\underline{\text{C}}_\epsilon\text{H}_2-\text{NH}$ , Lys), 46,67 ( $\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ , Ava), 49,31 ( $-\underline{\text{C}}_\alpha\text{H}-$ , Lys), 79,45 ( $\text{C}_q$ , tert.-Butyl), 169,83 ( $-\underline{\text{C}}\text{ON}(\text{CH}_3)-$ ), 172,04 ( $-\underline{\text{C}}\text{OO}^t\text{Bu}$ ).

### 3.2.4 $\alpha$ -Ketoamid-TKI und $\alpha$ -Hydroxyamid-TKI

#### Z,Z-Lysinal

Z-Lys(Z)-OH (20,7 g; 50 mmol) wird in 120 ml THF unter Schutzgasatmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von Carbonyldiimidazol (8,1 g; 50 mmol) wird 3 h gerührt. Die Temperatur des Reaktionsgemisches wird auf -40 °C eingestellt und Diisobutylaluminiumhydrid (100 ml; 1 M in THF) wird innerhalb von 30 min so zugetropft, dass die Temperatur konstant bleibt. Anschließend wird noch 2 h bei dieser Temperatur gerührt. Durch vorsichtige Zugabe von 280 ml 1,2 M Salzsäure wird die Reaktionsmischung hydrolysiert. Man lässt nun auf Raumtemperatur kommen, versetzt mit weiteren 150 ml 1,2 M Salzsäure,

gibt 300 ml Chloroform hinzu und rührt 2 h. Die organische Phase wird abgetrennt, die wässrige noch mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingengt. Zur Abtrennung nicht umgesetzter Carbonsäure wird der ölige Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, mit 10%iger  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lsg. und Wasser gewaschen, erneut über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Man erhält 8,5 g farbloses Öl (21 mmol; 43 %).

DC:  $R_f$  (F) 0,72.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ ): 1,36 - 1,70 (m, 6 H,  $(-\text{CH}_2-)_3$ ), 2,96 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 4,43 (t, 1 H,  $-\text{C}_\alpha\text{H-}$ ), 5,01 (s, 4 H,  $\text{Z-CH}_2$ ), 7,33 (m, 10 H, arom.), 9,46 (breit, 1 H,  $-\text{CHO}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62,9 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ ): 22,68, 29,32, 30,75 ( $(-\text{CH}_2-)_3$ ), 40,49 ( $-\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 54,90 ( $-\text{C}_\alpha\text{H-}$ ), 65,03, 65,58 ( $\text{Z-CH}_2$ ), 127,45, 127,61, 127,99, 128,23, 137,18, 137,24 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 155,83, 156,00 ( $-\text{CO-}$ , Z), 201,90 ( $-\text{CHO}$ ).

#### Z-Lys(Z) $\Psi$ [CHOH]-CN

Z,Z-Lysinal (8,40 g; 21 mmol) wird in einem Gemisch aus 25 ml Wasser, 25 ml Methanol und 50 ml Ethylacetat gelöst und mit KCN (2,50 g; 39 mmol) versetzt. Nach 20 h Rühren bei Raumtemperatur wird mit 20 ml Wasser versetzt, Methanol und Ethylacetat im Vakuum weitgehend abgezogen und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit 5%iger  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. und mit Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Man erhält 6,85 g gelbliches Öl (16 mmol; 76%).

DC:  $R_f$  (G) 0,36.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ ): 1,29 - 1,56 (m, 6 H,  $(-\text{CH}_2-)_3$ ), 3,13 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 3,37 (s, 1 H,  $-\text{CH-OH}$ ), 3,65 (m, 1 H,  $-\text{C}_\alpha\text{H-OH}$ ), 4,50 (t, 1 H,  $-\text{C}_\beta\text{H-}$ ), 5,06, 5,08 (s, 4 H,  $\text{Z-CH}_2$ ), 5,25 (m, 1 H,  $\text{NH}$ ), 5,64 (m, 1 H,  $\alpha\text{NH}$ ), 7,30 (m, 10 H, arom.).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62,9 MHz,  $\text{DMSO-D}_6$ ): 22,70, 29,47, 30,36 ( $(-\text{CH}_2-)_3$ ), 40,22 ( $-\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 54,90 ( $-\text{C}_\alpha\text{H-}$ ), 63,69 ( $-\text{C}_\alpha\text{H-}$ ), 66,79, 67,46 ( $\text{Z-CH}_2$ ), 118,74 ( $-\text{CN}$ ), 128,04, 128,12, 128,32, 128,56, 136,07, 136,58 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 156,94 ( $-\text{CO-}$ , Z).

Z-Lys(Z) $\Psi$ [CHOH]-COOMe

Z-Lys(Z) $\Psi$ [CHOH]-CN (3,8g; 8,3 mmol) wird in 50 ml absolutem Methanol gelöst und auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Es wird über 3 h HCl-Gas eingeleitet, wobei die Temperatur  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  nicht überschreiten darf. Nach 40 h Rühren bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  wird das Reaktionsgemisch auf eine Lösung von 50 g  $\text{NaHCO}_3$  in 200 ml Eiswasser gegeben. Die Lösung wird mit Ethylacetat überschichtet, der pH-Wert wird mit Eisessig auf 4 eingestellt und man lässt 40 min. rühren. Die organische Phase wird abgetrennt und es wird noch mehrmals mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 5%iger  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. und Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das zurückbleibende Öl wird über Kieselgel KG 60 (0,2-0,5 nm), Elutionsmittel Ethylacetat/Hexan 2:1, von Verunreinigungen getrennt. Man erhält 1,0 g farbloses Öl (2,2 mmol; 29%).

DC:  $R_f$  (F) 0,64.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,23 - 1,56 (m, 6 H,  $(-\underline{\text{CH}}_2-)_3$ ), 3,12 (m, 2 H,  $-\underline{\text{CH}}_2\text{-NH}$ ), 3,61 (s, 1 H,  $-\text{CH-OH}$ ), 3,67 (s, 3 H,  $-\text{OCH}_3$ ), 4,29 (t, 1 H,  $-\text{C}_{\beta}\underline{\text{H}}-$ ), 5,02, 5,05 (s, 4 H,  $\text{Z-CH}_2$ ), 5,33 (m, 1 H,  $-\text{C}_{\alpha}\underline{\text{H}}\text{-OH}$ ), 7,30 (m, 10 H, arom.).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 22,93, 29,40, 31,56 ( $(-\underline{\text{CH}}_2-)_3$ ), 40,62 ( $-\underline{\text{CH}}_2\text{-NH}$ ), 52,61 ( $-\text{OCH}_3$ ), 53,27 ( $-\text{C}_{\beta}\underline{\text{H}}-$ ), 66,58, 66,70 ( $\text{Z-CH}_2$ ), 72,07 ( $-\text{C}_{\alpha}\underline{\text{H}}-$ ), 127,87, 128,11, 128,27, 128,59, 136,41, 136,65 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 156,17, 156,65 ( $-\text{CO-}$ , Z), 173,78 ( $-\text{COOMe}$ ).

Z-Lys(Z) $\Psi$ [CHOH]-COOH

Z-Lys(Z) $\Psi$ [CHOH]-COOMe (980 mg, 2,2 mmol) wird in 20 ml 5%iger  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. aufgenommen, mit 10 ml Ethylacetat überschichtet und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wird abgetrennt, mit festem  $\text{KHSO}_4$  angesäuert und mehrfach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden neutral gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhält man 900 mg farbloses Öl (2,03 mmol; 92%).

DC:  $R_f$  (F) 0,37.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,21 - 1,60 (m, 6 H,  $(-\underline{\text{CH}}_2-)_3$ ), 3,11 (m, 2 H,  $-\underline{\text{CH}}_2\text{-NH}$ ), 3,61 (s, 1 H,  $-\text{CH-OH}$ ), 4,38 (t, 1 H,  $-\text{C}_{\beta}\underline{\text{H}}-$ ), 5,06, 5,07 (s, 4 H,  $\text{Z-CH}_2$ ), 5,14 (m, 1 H,  $-\text{C}_{\alpha}\underline{\text{H}}\text{-OH}$ ), 7,32 (m, 10 H, arom.).

$^{13}\text{C}$ -NMR (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 22,68, 29,59, 32,65 ( $(-\underline{\text{C}}\text{H}_2-)_3$ ), 40,43 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-NH}$ ), 54,85 ( $-\underline{\text{C}}_\beta\text{H-}$ ), 66,71, 67,04 ( $\text{Z-}\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 69,66 ( $-\underline{\text{C}}_\alpha\text{H-}$ ), 127,89, 128,22, 128,38, 128,64, 136,12, 136,56 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 156,74, 157,41 ( $-\underline{\text{C}}\text{O-}$ , Z), 174,60 ( $-\underline{\text{C}}\text{OOH}$ ).

MS (EI, 70 eV) m/z (rel. Int.): 445,  $\text{M}^+$  (4,8%), 401 (11%), 105 (10%), 91 (100%), 57 (8%).

#### Boc-4-Abu-OH

4-Aminobuttersäure (5,0 g; 48,5 mmol) wird in 100 ml Dioxan und 20 ml 1 M NaOH gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit Di-tert.-butyldicarbonat (10,6 g; 48,5 mmol) versetzt. Es wird 4 h bei dieser Temperatur gerührt. Der pH der Lösung wird mit 5 M NaOH stets bei 10 gehalten. Das Dioxan wird unter vermindertem Druck entfernt und die wässrige Phase wird mit Diethylether extrahiert. Nach Ansäuern mit  $\text{KHSO}_4$  auf pH 2 wird mit Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetatphase wird mit 10%iger  $\text{KHSO}_4$ -Lsg., 5%iger  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. und Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingeengt. Man erhält 4,9 g farbloses Öl (24,3 mmol; 51%).

DC:  $R_f$  (D) 0,65.

$^1\text{H}$ -NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,44 (s, 9 H, tert.-Butyl, Boc), 1,82 (m, 2 H,  $^3J = 7,0$  Hz,  $-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-$ ), 2,38 (t, 2 H,  $^3J = 7,3$  Hz,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{COOH}$ ), 3,17 (m, 2H,  $-\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ), 4,82 (br, 1 H,  $-\underline{\text{N}}\text{H-}$ ), 11,30 (br, 1 H,  $-\text{COOH}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 25,15 ( $-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-$ ), 28,39 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ , tert.-Butyl, Boc), 31,32 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{COOH}$ ), 39,86 ( $-\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ ), 79,49 ( $\text{C}_q$ , Boc), 178,27 ( $-\underline{\text{C}}\text{OOH}$ ).

#### 4-Abu- $\text{O}^t\text{Bu} \cdot \text{HCl}$

Boc-4-Abu-OH (1,5 g; 7,4 mmol) wird in 15 ml Essigsäure-tert.butylester gelöst, auf 0 °C gekühlt und portionsweise über 2 h mit 70%iger Perchlorsäure (640  $\mu\text{l}$ ; 7,4 mmol) versetzt. Nach weiteren 12 h Rühren bei 4 °C wird die Reaktionsmischung mit eiskalter 0,5 M Salzsäure extrahiert. Die wässrige Phase wird mit Ethylacetat überschichtet und sofort mit festem  $\text{NaHCO}_3$  neutralisiert. Man trennt die organische Phase ab und extrahiert die wässrige Phase erschöpfend mit Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wird in Diethylether aufgenommen und mit etherischer HCl auf pH 4-5 eingestellt. 4-Abu- $\text{O}^t\text{Bu} \cdot \text{HCl}$  kristallisiert,

wird abgesaugt mit Ether gewaschen und getrocknet. Man erhält 820 mg farblose Kristalle (4,2 mmol; 57 %).

Schmelzpunkt: 65 °C.

DC: R<sub>f</sub>(D) 0,79.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): 1,41 (s, 9 H, tert.-Butyl), 1,78 (m, 2 H, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 2,32 (t, 2 H, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz, -CH<sub>2</sub>-COOH), 2,78 (m, 2 H, -NH-CH<sub>2</sub>-), 8,08 (br, 3 H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): 22,58 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 27,80 (-CH<sub>3</sub>, tert.-Butyl), 31,68 (-CH<sub>2</sub>-COOH), 38,14 (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-), 79,94 (C<sub>q</sub>, tert.-Butyl), 171,53 (-COO<sup>t</sup>Bu).

### Z-Lys(Z)Ψ[CHOH]-CO-4-Abu-<sup>t</sup>Bu

Z-Lys(Z)Ψ[CHOH]-COOH (900 mg; 2 mmol), 4-Abu-O<sup>t</sup>Bu · HCl (390 mg; 2 mmol), HOBt (270 mg; 2 mmol) und Methylisopropylamin (680 µl; 4,4 mmol) werden in 5 ml Dichlormethan gelöst. Bei 0 °C und unter Schutzgasatmosphäre wird BroP (850 mg; 2,2 mmol) hinzugegeben. Man rührt 24 h bei 0 °C, entfernt dann das Lösungsmittel und nimmt den Rückstand in Diethylether auf. Die organische Phase wird mit 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lsg., 10%iger KHSO<sub>4</sub>-Lsg. und Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Das resultierende Öl wird chromatographisch über Kieselgel KG 60 (0,063-0,2 nm), Elutionsmittel Chloroform/Methanol 20:1, von weiteren Verunreinigungen getrennt. Man erhält ein farbloses Öl. Ausbeute (480 mg; 41 %).

DC: R<sub>f</sub>(G) 0,62.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,27 - 1,55 (m, 6 H, (-CH<sub>2</sub>-)<sub>3</sub>), 1,43 (s, 9 H, tert.-Butyl), 1,73 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, Abu), 2,21 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-COO-, Abu), 3,16 - 3,29 (m, 4 H, -CH<sub>2</sub>-NH, Lys, -NH-CH<sub>2</sub>-, Abu), 3,63 (s, 1 H, -CH-OH), 4,19 (t, 1 H, -C<sub>β</sub>H-), 5,07, 5,09 (s, 4 H, Z-CH<sub>2</sub>), 5,16 (m, 1 H, -C<sub>α</sub>H-OH), 7,34 (m, 10 H, arom.).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 22,65, 24,59, 24,79, 29,72, 32,81, 38,58, 40,31 ((-CH<sub>2</sub>-)<sub>4</sub>, Lys, (-CH-)<sub>3</sub>, Abu), 52,97 (-C<sub>β</sub>H-), 66,69, 66,93 (Z-CH<sub>2</sub>), 70,76 (-C<sub>α</sub>H-), 80,55 (C<sub>q</sub>, tert.-Butyl), 127,84, 128,09, 128,12, 128,22, 136,50, 136,62 (C<sub>arom.</sub>), 156,74, 156,62 (-CO-, Z), 172,17, 172,54 (-CONH-, -COO<sup>t</sup>Bu).

LysΨ[CHOH]-CO-4-Abu-O<sup>t</sup>Bu

Z-Lys(Z)Ψ[CHOH]-CO-4-Abu-<sup>t</sup>Bu (450 mg; 0,77 mmol) wird zusammen mit Palladium auf Aktivkohle und 770 µl 2 M HCl in 10 ml 95%igem Ethanol gelöst. Nach 2 h Hydrieren unter Normaldruck wird der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in 20 ml Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Man erhält 210 mg hygroskopischer Feststoff (0,54 mmol; 70 %).

DC: R<sub>f</sub>(D) 0,79.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): 1,10 - 1,78 (m, 8 H, (-CH<sub>2</sub>-)<sub>3</sub>, Lys, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, Abu), 1,38 (s, 9 H, tert.-Butyl), 2,17 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-COO-, Abu), 2,97 - 3,30 (m, 4 H, -CH<sub>2</sub>-NH, Lys, -NH-CH<sub>2</sub>-, Abu), 3,60 - 4,05 (m, 2 H, -CH-OH, -C<sub>β</sub>H-), 5,03 (m, 1 H, -C<sub>α</sub>H-OH).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): 23,24, 24,64, 25,50, 33,29, 37,51, 37,78, 40,29 ((-CH<sub>2</sub>-)<sub>4</sub>, Lys, (-CH-)<sub>3</sub>, Abu), 53,71 (-C<sub>β</sub>H-), 73,40 (-C<sub>α</sub>H-), 79,40 (C<sub>q</sub>, tert.-Butyl), 171,91, 172,10 (-CONH, -COO<sup>t</sup>Bu).

### 3.2.5 [α-Me-Ala<sup>16</sup>]TKI und [α-Hbs<sup>16</sup>]TKI

#### Boc-α-Me-Ala

α-Methylalanin (6,20 g; 60 mmol) wird in einer Mischung aus 120 ml Dioxan, 60 ml 1 M Natronlauge und 60 ml Wasser gelöst. Es wird Di-tert-butyldicarbonat (14,6 g; 66 mmol), gelöst in 20 ml Dioxan, hinzugegeben. Man lässt auf Raumtemperatur kommen und rührt weitere 2 h. Der pH-Wert der Lösung wird währenddessen stets bei 10 gehalten. Zur Aufarbeitung wird das Dioxan bei vermindertem Druck weitgehend entfernt, die Lösung wird mit Ethylacetat überschichtet und unter Eiskühlung mit festem Kaliumhydrogenphosphat auf pH 2 gebracht. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase wird erschöpfend mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organische Extrakte werden neutral gewaschen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels und anschließendem Umkristallisieren aus Diethylether/Hexan erhält man 7,15 g farblose Kristalle (35 mmol; 58%).

Schmelzpunkt: 124-125 °C.

DC: R<sub>f</sub>(D) 0,82.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,44 (s, 9 H, tert.-Butyl, Boc), 1,53 (s, 6 H, -CH<sub>3</sub>), 11,02 (br, 1 H, -COOH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 25,36 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 28,31 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ , tert.-Butyl, Boc), 56,18 ( $-\underline{\text{C}}_{\alpha}$ ), 156,30 ( $-\underline{\text{C}}\text{O}$ -, Boc), 179,95 ( $-\underline{\text{C}}\text{OOH}$ )

MS ( $\text{EI}^+$ ) m/z (rel. Int.): 102 (14%), 86 (18%), 84 (34%), 59 (96%), 57 (96%), 42 (100%).

### Boc- $\alpha$ -Me-Ala-OSu

Boc- $\alpha$ -Me-Ala (606 mg; 3 mmol) und Pyridin (242  $\mu\text{l}$ ; 3 mmol) werden in 20 ml Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von DSC (769 mg; 3 mmol) wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Acetonitril wird im Vakuum weitgehend entfernt und der verbleibende Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wird mit 10%iger  $\text{KHSO}_4$ -Lsg., 5%iger  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. und mit Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeengt. Das resultierende farblose Öl erstarrt bei 4 °C.

Ausbeute: 340 mg (1,1 mmol; 38%).

DC:  $R_f$  (G) 0,51.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,47 (s, 9 H, tert.-Butyl, Boc), 1,56 (s, 6 H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 2,86 (s, 4 H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{O}$ -).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 25,62 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 28,18 ( $-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ , tert.-Butyl, Boc), 55,77 ( $-\underline{\text{C}}_{\alpha}$ ), 154,23 ( $-\underline{\text{C}}\text{O}$ -, Boc), 168,75 ( $-\underline{\text{C}}\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{O}$ -), 169,48 ( $-\underline{\text{C}}\text{OO}$ -).

### $\alpha$ -Me-Ala-O<sup>t</sup>Bu

Boc- $\alpha$ -Me-Ala (1,07 g; 5 mmol) wird unter Eiskühlung in 20 ml Essigsäure-tert.-Butylacetat gelöst. Portionsweise wird innerhalb von 2 h 70%ige Perchlorsäure (430  $\mu\text{l}$ ; 5 mmol) zugegeben. Nach weiteren 12 h bei 4 °C wird die Reaktionsmischung mit 0,5 M HCl extrahiert. Die HCl saure Phase wird mit Ethylacetat überschichtet und sofort mit festem  $\text{NaHCO}_3$  neutralisiert. Die wässrige Phase wird erschöpfend mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen werden vereinigt, neutral gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird das resultierende farblose Öl in wenig Diethylether aufgenommen. Man tropft etherische HCl zu, ohne dabei einen pH-Wert von 3 zu unterschreiten (Tüpfeln auf feuchtes pH-Papier). Der ausfallende farblose Feststoff wird abgesaugt, mit kaltem Diethylether gewaschen und getrocknet. Man erhält 450 mg  $\alpha$ -Me-Ala-O<sup>t</sup>Bu · HCl (2,33 mmol; 46%) als farblose Kristalle.

Schmelzpunkt: 167-169 °C.

DC: R<sub>f</sub>(D) 0,43.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): 1,31 (s, 6 H, -CH<sub>3</sub>), 1,46 (s, 9 H, tert.-Butyl), 8,66 (m, 3 H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): 23,17 (-CH<sub>3</sub>), 27,28 (-CH<sub>3</sub>, tert.-Butyl), 56,05 (-C<sub>α</sub>-), 82,58 (C<sub>q</sub>, tert.-Butyl), 170,63 (-COO-).

MS (EI<sup>+</sup>) m/z (rel. Int.): 160 (27%), 88 (33%), 58 (100%), 41 (11%), 32 (15%), 28 (66%).

### Z-Lys(Z)-α-Me-Ala-O<sup>t</sup>Bu

α-Me-Ala-O<sup>t</sup>Bu · HCl (1,1 g; 5,6 mmol), Z-Lys(Z)-OH (2,3 g; 5,6 mmol), 770 μl Triethylamin und HOBt (0,9 g; 5,6 mmol) werden in 30 ml Dichlormethan gelöst. Bei 0 °C wird unter Rühren EDC (1,1 g; 5,6 mmol), gelöst in 5 ml Dichlormethan, zugegeben. Man lässt auf Raumtemperatur kommen und gibt nach 12 h nochmals EDC (1,1 g; 5,6 mmol) hinzu. Nach weiteren 12 h Rühren bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wird mit 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lsg., 10%iger KHSO<sub>4</sub>-Lsg. und Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingengt. Man erhält 1,6 g Z-Lys(Z)-α-Me-Ala-O<sup>t</sup>Bu (2,9 mmol; 51%) als farblosen Feststoff.

Schmelzpunkt: 71 °C.

DC: R<sub>f</sub>(E) 0,29.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,25-1,62 (m, 4 H, (-CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 1,43 (s, 9 H, tert.-Butyl, Boc), 1,49 (s, 6 H, -CH<sub>3</sub>), 1,79 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 3,17 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-NH), 4,10 (m, 1 H, -C<sub>α</sub>H-), 4,94 (m, 1 H, εNH), 5,07 (s, 2 H, Z-CH<sub>2</sub>), 5,10 (s, Z-CH<sub>2</sub>), 5,47 (m, 1 H, C<sub>α</sub>-NH), 6,64 (m, 1 H, -CONH-, Me-Ala), 7,32 (m, 10 H, arom.).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 22,24, 29,41, 31,59 (-(-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-), 24,34 (-CH<sub>3</sub>), 27,82 (-CH<sub>3</sub>, tert.-Butyl), 40,36 (-CH<sub>2</sub>-NH), 54,85 (-C<sub>α</sub>-, Me-Ala), 57,02 (-C<sub>α</sub>-, Lys), 66,64, 67,00 (Z-CH<sub>2</sub>), 81,72 (C<sub>q</sub>, tert.-Butyl), 128,04, 128,15, 128,49, 128,52, 136,32, 136,67 (C<sub>arom.</sub>), 156,62 (-CO-, Z), 170,52 (-CONH-), 173,50 (-COO-).

MS (EI<sup>+</sup>) m/z (rel. Int.): 238 (12%), 108 (56%), 91 (66%), 79 (60%), 56 (50%), 41(100%), 28 (34%).

Lys- $\alpha$ -Me-Ala-O<sup>t</sup>Bu · HCl

(Z)-Lys(Z)- $\alpha$ -Me-Ala-O<sup>t</sup>Bu (800 mg; 1,4 mmol) wird in 50 ml 95%igem Ethanol gelöst. Nach Zugabe von Palladium auf Aktivkohle (140 mg; 10% Pd) wird 2 h bei Normaldruck hydriert. Man filtriert vom Katalysator ab und entfernt das Lösungsmittel unter vermindertem Druck. Der Rückstand wird in Diethylether aufgenommen und mit etherischer HCl versetzt. Dabei sollte der pH nicht unter einen Wert von 3 sinken (Tüpfeln auf feuchtes pH-Papier). Der ausfallende Feststoff wird abgesaugt, mit kaltem Diethylether neutral gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhält einen farblosen hygroskopischen Feststoff.

Ausbeute: 340 mg (0,95 mmol; 68%).

DC: R<sub>f</sub> (D) 0,62.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): 1,25-1,74 (m, 6 H, (-CH<sub>2</sub>-)<sub>3</sub>), 1,36 (s, 6 H, -CH<sub>3</sub>), 1,37 (s, 9 H, tert.-Butyl), 2,74 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-NH), 3,51 (m, 1 H, -C <sub>$\alpha$</sub> H-), 6,50-7,00 (br., 6 H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8,59 (-CONH-).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>): 21,43, 24,96, 31,93 (-(-CH<sub>2</sub>-)<sub>3</sub>-), 24,42 (-CH<sub>3</sub>), 27,43 (-CH<sub>3</sub>, tert.-Butyl), 38,23 (-CH<sub>2</sub>-NH), 52,48 (-C <sub>$\alpha$</sub> -, Me-Ala), 55,90 (-C <sub>$\alpha$</sub> -, Lys), 79,64 (C<sub>q</sub>, tert.-Butyl), 170,23 (-CONH-), 172,46 (-COO-).

MS (EI<sup>+</sup>) m/z (rel. Int.): 186 (12%), 101 (58%), 84 (100%), 66 (48%), 58 (38%), 28 (12%).

 $\alpha$ -Hbs-OMe

$\alpha$ -Hydroxy-iso-buttersäure (5,0 g; 48 mmol) wird in 50 ml Methanol gelöst. Es wird bei Raumtemperatur gerührt und über 6 h HCl-Gas in einem konstanten leichten Strom eingeleitet. Zur Aufarbeitung wird Methanol unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen, mit festem NaHCO<sub>3</sub> neutralisiert und mit Ethylacetat extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Entfernen des Lösungsmittels wird im Wasserstrahlvakuum destilliert. Man erhält 4,5 g  $\alpha$ -HBS-OMe (38 mmol; 80%) als farblose Flüssigkeit.

K<sub>p</sub>20 mm: 37 °C.

RP-HPLC: R<sub>t</sub> 19,2 min.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,43 (s, 6 H, -CH<sub>3</sub>), 3,72 (s, 3 H, O-CH<sub>3</sub>), 4,43 (s, 1 H, -OH).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 27,18 (-CH<sub>3</sub>), 52,76 (-OCH<sub>3</sub>), 72,07 (-C <sub>$\alpha$</sub> -), 177,53 (-COO-).

$\alpha$ -Hbs-OSu

$\alpha$ -Hydroxybuttersäure (1,5 g; 12,6 mmol) wird in 60 ml Acetonitril gelöst und mit Pyridin (1 ml; 12,6 mmol) versetzt. Nach Zugabe von Di-(N-succinimidyl)-carbonat (3,2 g; 12,6 mmol) wird 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Ausbeute: 1,5 g ( 7,2 mmol; 57%) farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,63 (s, 6 H,  $-\text{CH}_3$ ), 2,84 (s, 4 H,  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ), 3,93 (s, 1 H,  $-\text{OH}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 25,69 ( $-\text{CH}_3$ ), 27,27 ( $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ), 72,39 ( $-\text{C}_{\alpha-}$ ), 169,20 ( $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ), 172,06 ( $-\text{COO}-$ ).

Z-Lys(Z)- $\alpha$ -Hbs-O<sup>t</sup>Bu

$\alpha$ -Hydroxybuttersäure-tert.-butylester (500 mg; 3,1 mmol), Z-Lys(Z)-OH (1,29 g; 3,1 mmol) und HOBt (445 mg; 3,1 mmol) werden in 80 ml Dichlormethan gelöst. Man kühlt das Reaktionsgemisch auf 0 °C und gibt EDC (594 mg; 3,1 mmol) unter Rühren hinzu. Nach 20 h bei 4 °C wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen. Es wird mit 10%iger  $\text{KHSO}_4$ -Lsg., 5%iger  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg. und Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingeeengt. Das resultierende Öl wird chromatographisch über Kieselgel KG 60 (0,2-0,5 nm), Elutionsmittel Chloroform/Methanol 10:1, von weiteren Nebenprodukten gereinigt. Man erhält ein farbloses Öl. Ausbeute 1,1g (1,9 mmol; 64%).

DC:  $R_f$  (F) 0,84.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 1,28-1,83 (m, 6 H,  $(-\text{CH}_2-)_3$ ), 1,38 (s, 6 H,  $-(\text{CH}_3)_2$ ), 1,48 (s, 9 H, tert.-Butyl), 3,16 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}$ ), 4,34 (m, 1 H,  $-\text{C}_{\alpha\text{H}}-$ , Lys), 4,78 (m, 1 H,  $\epsilon\text{NH}$ ), 5,08 (s, 2 H, Z- $\text{CH}_2$ ), 5,10 (s, Z- $\text{CH}_2$ ), 5,34 (m, 1 H,  $\text{C}_{\alpha\text{NH}}$ ), 7,33 (m, 10 H, arom.).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 22,26, 29,40, 32,26 ( $(-\text{CH}_2-)_3$ ), 27,13 ( $-\text{CH}_3$ ), 27,90 ( $-\text{CH}_3$ , tert.-Butyl), 40,15 ( $-\text{CH}_2-\text{NH}$ ), 52,40 ( $-\text{C}_{\alpha-}$ , Lys), 66,73, 67,09 (Z- $\text{CH}_2$ ), 77,23 ( $-\text{C}_{\alpha-}$ , Hbs), 82,50 ( $\text{C}_q$ , tert.-Butyl), 128,13, 128,21, 128,53, 128,62, 136,52, 136,88 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ ), 156,13, 156,45 ( $-\text{CO}-$ , Z), 172,52, 173,50 ( $-\text{COO}-$ ).

MS ( $\text{FAB}^+$ ) m/z (rel. Int.): 556  $\text{M}^+\text{+H}$  (1,2%), 443 (63%), 235 (53%), 140 (61%), 123 (69%), 91 (60%), 71 (78%), 57 (100%).

Z-Lys(Z)- $\alpha$ -Hbs-OMe

Z-Lys(Z)-OH (1,5 g; 3,6 mmol),  $\alpha$ -Hbs-OMe (500 mg; 4,2 mmol) und HOBt (486 mg; 3,6 mmol) werden bei 0 °C in 20 ml Dichlormethan gelöst. Unter Rühren wird EDC (767 mg; 4 mmol), gelöst in 5 ml Dichlormethan, hinzugegeben. Man lässt auf Raumtemperatur kommen und rührt über Nacht. Dichlormethan wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen. Es wird mit 10%iger KHSO<sub>4</sub>-Lsg. und 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. gewaschen und eingengt. Die Lösung wird über Kieselgel KG 60 (0,2-0,5 nm), Elutionsmittel Chloroform/Methanol 15:1, von weiteren Nebenprodukten getrennt. Man erhält 800 mg Z-Lys(Z)- $\alpha$ -Hbs-OMe (1,6 mmol; 44%) als farbloses Öl.

DC: R<sub>f</sub>(G) 0,83.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 1,31-1,82 (m, 6 H, (-CH<sub>2</sub>-)<sub>3</sub>), 1,42 (s, 6 H, -CH<sub>3</sub>), 3,16 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-NH), 3,66 (s, 3 H, -OCH<sub>3</sub>), 4,33 (m, 1 H, -C $\alpha$ H-), 4,87 (m, 1 H,  $\epsilon$ NH), 5,07 (s, 2 H, Z-CH<sub>2</sub>), 5,09 (s, Z-CH<sub>2</sub>), 5,41 (m, 1 H, C $\alpha$ -NH), 7,32 (m, 10 H, arom.).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 22,27, 29,39, 32,25 (-(-CH<sub>2</sub>-)<sub>3</sub>-), 27,18 (-CH<sub>3</sub>), 40,59 (-CH<sub>2</sub>-NH), 52,36 (-OCH<sub>3</sub>), 53,76 (-C $\alpha$ - Lys), 60,37 (-OCH<sub>3</sub>), 66,65, 67,00 (Z-CH<sub>2</sub>), 72,30 (-C $\alpha$ - Hbs), 128,08, 128,11, 128,17, 128,51, 136,32, 136,65 (C<sub>arom.</sub>), 156,02, 156,55 (-CO-, Z), 172,38, 172,80 (-COO-).

MS (FAB<sup>+</sup>) m/z (rel. Int.): 515 M<sup>+</sup>+H (1,2%), 235 (48%), 140 (56%), 123 (66%), 91 (64%), 69 (55%), 57 (100%), 43 (85%).

## Boc-Gly-OTMSE

Boc-Gly (2,2 g; 12,5 mmol), HOTMSE (1,78 ml; 12,5 mmol) und DMAP (1,53 g; 12,5 mmol) werden in 10 ml Dichlormethan gelöst. Bei 0 °C wird DCC (2,57 g; 14 mmol) hinzugegeben und man rührt 2 h. Anschließend lässt man auf Raumtemperatur kommen und rührt über Nacht. Nach vollständigem Umsatz wird der Harnstoff abfiltriert, Dichlormethan im Vakuum abgezogen und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Es wird mit 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lsg., 10%iger KHSO<sub>4</sub>-Lsg. und Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingengt. Es verbleiben 2,5 g farbloses Öl (9,1 mmol; 73 %).

DC: R<sub>f</sub>(G) 0,85.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0,05 (s, 9 H, -Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,96 (t, 2 H, <sup>3</sup>J = 8,5 Hz, -CH<sub>2</sub>-Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,40 (s, 9 H, tert.-Butyl, Boc), 3,82 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-, Gly), 4,19 (t, 2 H, <sup>3</sup>J = 8,5 Hz, -COO-CH<sub>2</sub>-).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): -1,51 (-Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17,36 (-CH<sub>2</sub>-Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28,34 (tert.-Butyl, Boc), 42,60 (-CH<sub>2</sub>-, Gly), 63,54 (-COO-CH<sub>2</sub>-), 155,77 (-O-CO-NH-), 170,45 (-COO-).

## Gly-OTMSE

Boc-Gly-OTMSE (1,5 g; 5,4 mmol) wird in 10 ml Trifluorethanol gelöst. Man gibt 1,2 ml halbkonzentrierte Salzsäure hinzu und rührt 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wird mit 300 ml Wasser versetzt und lyophilisiert. Ausbeute: 1,1 g (5,2 mmol; 96 %) farbloser Feststoff.

DC:  $R_f$  (E) 0,44.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,04 (s, 9 H,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 1,02 (t, 2 H,  $^3J = 8,5$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{-Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 3,97 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-$ , Gly), 4,28 (t, 2 H,  $^3J = 8,5$  Hz,  $-\text{COO-CH}_2-$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): -1,50 ( $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 17,31 ( $-\text{CH}_2\text{-Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 40,67 ( $-\text{CH}_2-$ , Gly), 64,91 ( $-\text{COO-CH}_2-$ ), 167,74 ( $-\text{COO-}$ ).

 $\alpha$ -Hbs-Gly-OTMSE

$\alpha$ -Hydroxyisobuttersäure (500 mg; 4,7 mmol), Gly-OTMSEEHCl (1,0 g; 4,7 mmol), HOBt (674 mg; 4,7 mmol) und Triethylamin (600  $\mu\text{l}$ ; 4,7 mmol) werden in 30 ml Dichlormethan gelöst. Bei  $0^\circ\text{C}$  gibt man DCC (1,0 g; 5,2 mmol) hinzu, rührt 4 h, lässt auf Raumtemperatur kommen und rührt weitere 12 h. Dichlormethan wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Nicht löslicher Harnstoff wird abfiltriert. Die organische Phase wird mit 5%iger  $\text{NaHCO}_3$ -Lsg., 10%iger  $\text{KHSO}_4$ -Lsg. und Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingeeengt. Man erhält 1,2 g farbloses Öl (4,6 mmol; 98 %).

DC:  $R_f$  (G) 0,52.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,05 (s, 9 H,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 1,02 (t, 2 H,  $^3J = 8,7$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{-Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 1,47 (s, 6 H,  $-(\text{CH}_3)_2$ ), 2,94 (s, 1 H,  $-\text{OH}$ ), 4,12 (m, 2 H,  $-\text{CH}_2-$ , Gly), 4,25 (t, 2 H,  $^3J = 8,5$  Hz,  $-\text{COO-CH}_2-$ ), 7,24 (s, 1 H,  $-\text{NH-}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (62,9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): -1,51 ( $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 14,21 ( $-\text{CH}_2\text{-Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 26,12 ( $-(\text{CH}_3)_2$ ), 41,31 ( $-\text{CH}_2-$ , Gly), 63,91 ( $-\text{COO-CH}_2-$ ), 73,63 ( $-\text{C}_\alpha-$ , Hbs), 170,11 ( $-\text{COO-}$ ), 176,84 ( $-\text{CONH-}$ ).

Z-Lys(Z)- $\alpha$ -Hbs-Gly-OTMSE

$\alpha$ -Hbs-Gly-OTMSE (900 mg; 3,45 mmol) Z-Lys(Z)-OH (1430 mg; 3,45 mmol) und DMAP (420 mg; 3,45 mmol) werden in 30 ml Dichlormethan gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Es wird DCC (780 mg; 3,8 mmol) hinzugegeben. Nach 4 h bei 0 °C wird noch 12 h bei 4 °C gerührt. Der ausgefallene Harnstoff wird abfiltriert und das Lösungsmittel wird entfernt. Der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen und mehrmals mit 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lsg., 10%iger KHSO<sub>4</sub>-Lsg. und Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Es verbleibt ein gelbes Öl, das über Kieselgel KG 60 (0,2-0,5 nm), Elutionsmittel Chloroform/Methanol 10:1, von weiteren Nebenprodukten gereinigt wird. Man erhält 1,8 g farbloses Öl (2,7 mmol; 79%).

DC: R<sub>f</sub> (A) 0,72.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0,03 (s, 9 H, -Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,99 (t, 2 H, <sup>3</sup>J = 8,7 Hz, -CH<sub>2</sub>-Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,16 - 1,89 (m, 6 H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-), 1,62 (s, 6 H, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,19 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-NH), 3,94 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-, Gly), 4,22 (m, 2 H, -COO-CH<sub>2</sub>-), 5,00 (m, 1 H,  $\epsilon$ NH, Lys), 5,06 (s, 2 H, Z-CH<sub>2</sub>), 5,09 (s, 2 H, Z-CH<sub>2</sub>), 5,46 (m, 1 H, C $\alpha$ -NH, Lys), 6,89 (s, 1 H, -CO-NH-, Gly), 7,32 (m, 10 H, arom.).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): -1,52 (-Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17,35 (-CH<sub>2</sub>-Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 22,10, 29,36, 32,14 (-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, 24,53 (-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-, 41,42 (-CH<sub>2</sub>-, Gly), 54,45 (-C $\alpha$ -, Lys), 63,91 (-COO-CH<sub>2</sub>-), 66,69, 67,17 (Z-CH<sub>2</sub>), 77,25 (-C $\alpha$ -, Hbs), 128,09, 128,26, 128,51, 128,56, 136,17, 136,62 (C<sub>arom.</sub>), 156,73, 156,79 (-CO-, Z), 169,89, 170,88 (-COO-), 172,69 (-CONH-).

Lys-  $\alpha$ -Hbs-Gly-OTMSE

Z-Lys(Z)- $\alpha$ -Hbs-Gly-OTMSE (658 mg; 1mmol) wird in 20 ml 95%igem Ethanol gelöst. Man gibt Palladium auf Aktivkohle (100 mg; 10% Pd) und 1 ml 2 M Salzsäure hinzu und hydriert 2 h unter Normaldruck. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird mit 20 ml Wasser verdünnt. Ethanol wird im Vakuum weitgehend entfernt. Die wässrige Phase wird mit Ethylacetat überschichtet und extrahiert. Die Ethylacetatphase wird mit eisgekühlter 0,5 M Salzsäure extrahiert und verworfen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden sofort mit festem NaHCO<sub>3</sub> neutralisiert und mit Ethylacetat erschöpfend extrahiert. Nach Waschen mit 10%iger KHSO<sub>4</sub>-Lsg., 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und Wasser wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Man erhält 158 mg gelbes Öl (0,4 mmol; 40%).

DC: R<sub>f</sub> (E) 0,42.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0,03 (s, 9 H, -Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0,98 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,16 - 1,89 (m, 6 H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-), 1,62 (s, 6 H, -(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,19 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-NH), 3,94 (m, 2 H, -CH<sub>2</sub>-, Gly), 4,22 (m, 2

H, -COO-CH<sub>2</sub>-), 5,00 (m, 1 H,  $\epsilon$ -NH, Lys), 5,06 (s, 2 H, Z-CH<sub>2</sub>), 5,09 (s, 2 H, Z-CH<sub>2</sub>), 5,46 (m, 1 H, C $\alpha$ -NH, Lys), 6,89 (s, 1 H, -CO-NH-, Gly). 7,32 (m, 10 H, arom.).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): -1,52 (-Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17,35 (-CH<sub>2</sub>-Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 22,10, 29,36, 32,14 (-CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-), 24,53 (-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 41,42 (-CH<sub>2</sub>-, Gly), 54,45 (-C $\alpha$ -, Lys), 63,91 (-COO-CH<sub>2</sub>-), 66,69, 67,17 (Z-CH<sub>2</sub>), 77,25 (-C $\alpha$ -, Hbs), 128,09, 128,26, 128,51, 128,56, 136,17, 136,62 (C<sub>arom.</sub>), 156,73, 156,79 (-CO-, Z), 169,89, 170,88 (-COO-), 172,69 (-CONH-).

### 3.3 Hemmtests

Die Tests zur Inhibierung der verschiedenen Proteinasen erfolgen durch Messung der proteolytischen Restaktivitäten vorinkubierter Ansätze, die gleiche Mengen an Enzym und verschiedene Mengen des jeweiligen Inhibitors enthalten. Enzymaktivitäten werden nach photometrischen Standardmethoden (Bergmeyer, 1984) bestimmt. Die Gleichgewichtskonstanten werden nach der Methode von Green und Work (1953) berechnet. Die Enzymaktivitäten gegenüber den chromogenen Substraten werden bei 25 °C bestimmt. Das abgespaltene 4-Nitroanilin wird bei 405 nm detektiert. Inhibitorkonzentrationen werden per HPLC (unter Annahme gleicher Extinktionskoeffizienten für die verschiedenen TKI-Derivate) bestimmt. Enzymkonzentrationen werden durch Titration mit TKI-Lösungen bekannter Konzentrationen bestimmt.

#### Geräte

Photometer: Photometer 1101, CKE-Rechner, 6522-Drucker, Eppendorf, Hamburg.

#### Materialien

##### Enzyme:

Trypsin aus Rinderpankreas (EC 3.4.21.4)	Merck, Darmstadt
Chymotrypsin aus Rinderpankreas (EC 3.4.21.1)	Merck, Darmstadt
Kallikrein aus Schweinepankreas (EC 3.4.21.35)	Merck, Darmstadt

##### Substrate:

L-BAPA	Merck, Darmstadt
Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-Nan	Serva, Heidelberg
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Nan	Serva, Heidelberg
D-Val-Leu-Arg-Nan (S-2266)	Chromogenix AB, Mölndal, Schweden

### Trypsin-Test

Puffer: 0,05 M Tris, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,8  
 Enzym: 0,5 mg Rinder-Trypsin/ml 1 mM HCl  
 Inhibitor: 20-40 mg/ml H<sub>2</sub>O  
 Substrat: 1 mg L-BAPA/ml H<sub>2</sub>O  
 Messansatz: 770 µl Puffer, (100-x) µl H<sub>2</sub>O, 30 µl Trypsinlösung, x µl  
 Inhibitorlösung 100 µl Substratlösung; vor der Substratzugabe  
 wird 5 min inkubiert.

### Trypsin-Test mit Bz-Ile-Glu-Gly-Arg.Nan (Geiger & Fritz, 1984)

Puffer: 0,2 M Tris, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,02% PEG 6000, pH 8,0  
 Enzym: 1,6 µg Rinder-Trypsin/ml 1 mM HCl  
 Inhibitor: 0,25 µg/ml Messpuffer  
 Substrat: 0,74 mg/ml H<sub>2</sub>O  
 Messansatz: 800 µl Puffer, (100-x) µl H<sub>2</sub>O, 100 µl Trypsinlösung, x µl  
 Inhibitorlösung 100 µl Substratlösung; vor der Substratzugabe  
 wird 90 min inkubiert.

### Chymotrypsin-Test

Puffer: 0,1 M Tris, 20 mM Ca<sub>2</sub>Cl, 0,05% Triton X-100, pH 7,8  
 Enzym: 10 mg Rinder-Chymotrypsin/ml 1 mM HCl  
 Inhibitor: 20-40 mg/ml H<sub>2</sub>O  
 Substrat: 2 mg Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Nan/ml 0,05 M Tris-Puffer, pH 7,8  
 Messansatz: 780 µl Puffer, (100-x) µl H O, 20 µl Chymotrypsinlösung, x µl  
 Inhibitorlösung, 100 µl Substratlösung; vor der Substratzugabe  
 wird 10 min inkubiert.

### Kallikrein-Test

Puffer: 0,05 M Tris, 0,02% PEG 6000, 0,01 M EDTA, pH 9,0  
 Enzym: 0,1 mg Kallikrein (Rinderpankreas)/ml H<sub>2</sub>O  
 Inhibitor: 20-40 mg/ml H<sub>2</sub>O  
 Substrat: 1 mg D-Val-Leu-Arg-Nan (S-2266)/ml H<sub>2</sub>O

Messansatz: 760  $\mu$ l Puffer, (100-x)  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 40  $\mu$ l Kallikreinlösung, x  $\mu$ l  
Inhibitorlösung, 100  $\mu$ l Substratlösung; vor der Substratzugabe  
wird 10 min inkubiert.

#### 4. Literaturverzeichnis

Arad, O., Goodman, M.: Depsipeptide analogues of elastin repeating sequences: Conformational analysis. *Biopolymers* **29** 1651-1668 (1990).

Auerswald, E.-A., Hörlein, D., Reinhardt, G., Schröder, W., Schnabel, E.: Expression, isolation and characterisation of recombinant Arg15, Glu52 Aprotinin. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **369** 27-35 (1988).

Baker, E.N., Hubbard, R.E.: Hydrogen bonding in globular proteins. *Prog. Biophys. molec. Biol.* **44** 97-197 (1984).

Bastiaans, H. M. M., van der Baan, J. L., Ottenheijm, H. C. J.: Total synthesis of Cyclotheonamide B, a facile route towards analogues. *Tetrahedron Letters* **36** 5963-5966 (1995).

Beckmann, J.: Semisynthetischer Aminosäureaustausch im reaktiven Zentrum des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors. Dissertation an der Universität Bielefeld (1987).

Beckmann, J., Mehlich, A., Schröder, W., Wenzel, H.R., Tschesche, H.: Preparation of chemically "mutated" aprotinin homologues by semisynthesis. P<sub>1</sub> substitutions change inhibitory specificity. *Eur. J. Biochem.* **176** 675-682 (1988).

Beckmann, J., Mehlich, A., Schröder, W., Wenzel, H.R., Tschesche, H.: Semisynthesis of Arg<sup>15</sup>, Glu<sup>15</sup>, Met<sup>15</sup>, and Nle<sup>15</sup>-Aprotinin involving enzymatic peptide bond resynthesis. *J. Prot. Chem.* **8** 101-113 (1989).

Bigler, T.L., Lu, W., Park, S.J., Tashiro, M., Wieczorek, M., Wynn, R., Laskowski, Jr.: Binding of amino acid side chains to preformed cavities: Interaction of serine proteinases with turkey ovomucoid third domains with coded and noncoded P<sub>1</sub> residues. *Protein Science* **2** 786-799 (1993).

Bizzozero, S.A., Zweifel, B.O.: The importance of the tetrahedral intermediate for the  $\alpha$ -Chymotrypsin-catalyzed hydrolysis of peptide substrates. *FEBS Letters* **59** 105-108 (1975).

Bizzozero, S.A., Dutler, H.: Stereochemical aspects of peptide hydrolysis catalyzed by Serineproteases of the chymotrypsin type. *Bioorganic Chemistry* **10** 46-62 (1981).

Bode, W., Huber, R.: Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* **204** 433-451 (1992).

Bode, W., Huber, R.: Proteinase-protein inhibitor interactions. *Fibrinolysis* **8** Suppl.1 161-171 (1994).

Chen, Z., Bode, W.: Refined 2,5 Å x-ray crystal structure of the complex formed by porcine kallikrein a and the bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* **164** 283-311 (1983).

Bodanszky, A., Bodanszky, M., *The Practise of Peptide Synthesis*. Springer Verlag, Berlin (1981).

Bramson, H. N., Thomas, N. E., Kaiser, E. T.: The Use of N-methylated peptides and depsiptides to probe the binding of heptapeptide substrates to cAmp-dependent protein. *J. Biol. Chem.* **260** 15452-15457 (1985).

Cacciola, J., Alexander, R., S., Fevig, J., M., Stouten, P., F., W., The synthesis of lysin  $\alpha$ -ketoamide thrombin inhibitors via an epoxy amide ring opening. *Tetrahedron Letters*, **38** 5741-5744 (1997).

Casimir, J.R., Turetta, C., Ettouati, L., Paris, J., First application of the Dakin-West-Reaction to Fmoc chemistry: Synthesis of the ketomethylene tripeptide Fmoc-N $\alpha$ -Asp(<sup>t</sup>Bu-(R,S)Tyr(<sup>t</sup>Bu) $\Psi$ (CO-CH<sub>2</sub>)Gly-OH. *Tetrahedron Letters* **36** 4797-4800 (1995).

Coggins, J.R., Benoiton, N.L.: Synthesis of N-Methylamino acid derivatives from amino acid derivatives using sodium hydride/methyl iodide. *Canadian Journal of Chemistry* **49** 1968-1971 (1971).

Dawson, P.E., Muir, T. W., Clark, L.I., Kent, S.B.H.: Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **266** 776-779 (1994).

Deimer, K. H., Thamm, P., Stelzel, P.: Blockierung der  $\alpha$ -Carboxyl Funktion. In: Houben Weyl, *Methoden der Organischen Chemie*, Bd. 15/1, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, S. 315-338.

Deitermann, M.: Darstellung von *backbone*-Varianten des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors. Diplomarbeit, Universität Bielefeld 1994.

Delongchamps, P.: Stereoelectronic control in the cleavage of tetrahedral intermediates in the hydrolysis of esters and amides. *Tetrahedron* **33** 2643-2490 (1975).

Deng, J., Hamada, Y., Shioiri, T.: A new synthesis of Cyclotheonamide B via guanidination of ornithin. *Tetrahedron Letters* **37** 2261-2264 (1996).

Denisov, V.P., Halle, B., Peters, J., Hörlei, H.D.: Residence times of the buried water molecules in bovine pancreatic trypsin inhibitor and its G36S mutant. *Biochemistry* **34** 9046-9051 (1995).

Dess, D.B., Martin, J.C.: A useful 12-I-5 triacetoxyperiodane (the Dess-Martin-Periodane) for the selective oxidation of primary or secondary alcohols and a variety of related 12-I-5-species. *J. Am. Chem. Soc.* **113** 7277-7287 (1991).

Dess, D.B., Wilson, S.R., Martin, J.C., Synthesis, reactions and crystal structure of a stable 10-I-4 periodonium ion. *J. Am. Chem. Soc.* **115** 2488-2495 (1993).

Deziel, R., Plante, R., Caron, V., Grenier, L., Llinas-Brunet, M., Duceppe, J., Malenfant, E., Moss, N.: A practical and diastereoselective synthesis of ketomethylene dipeptide isosteres of the type AAΨ[COCH<sub>2</sub>]Asp. *J. Org. Chem.* **61** 2901-2903 (1996).

DiMaio, J., Ni, F., Gibbs, B., Konishi, Y.: A new class of potent thrombin inhibitors that incorporates a scissile pseudopeptide bond. *FEBS Lett.* **282** 47-52 (1991)

Dietl, T., Huber, C., Geiger, R., Iwanaga, S., Fritz, H.: Inhibition of porcine glandular Kallikreins by structurally homologous proteinase inhibitors of the Kunitz (Trasylol) type. Significance of the basic nature of amino acid residues in subsite positions for Kallikrein inhibition. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **360** 67-71 (1979).

Dutler, H., Bizzozero, S.A.: Mechanism of the serine protease reaction. Stereoelectronic, structural, and kinetic considerations as guidelines to deduce reaction paths. *Acc. Chem. Res.* **22** 322-327 (1989).

Fusetani, N., Matsunaga, S., Matsamoto, H., Takebayashi, Y.: Cyclotheonamides, potent thrombin inhibitors from marine sponge theonella sp. *J. Am. Chem. Soc.* **112** 7053-7054 (1990).

Ganesh, V., Lee, A. Y., Clardy, J., Tulinsky, A.: Comparison of the structures of the cyclotheonamide A complexes of human  $\alpha$ -thrombin and bovine  $\beta$ -trypsin. *Protein Science* **5** 825-835 (1996).

Gaudry, R.: A convenient synthesis of DL-ornithine. *Can. J. Chem.* **31** 1060-1063 (1953).

Geiger, R., Fritz, H.: Trypsin. In: Bergmeyer, H. U. (Hrsg.): *Methods of enzymatic analysis*, Vol 5, Verlag Chemie, Weinheim 1984, 119-129.

- Giannis, a., Kolter, T.: Peptidmimetica für Rezeptorliganden - Entdeckung, Entwicklung und medizinische Perspektiven. *Angew. Chem.* **105** 1303-1326 (1993).
- Goldenberg, D.P., Creighton, T.E.: Folding pathway of a circular form of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* **179** 527-545 (1984).
- Green, N.M., Work, E.: Pancreatic trypsin inhibitor. 2. Reaction with trypsin. *Biochem. J.* **54** 347-352 (1953).
- Groeger, C., Wenzel, H.R., Tschesche, H.: Enzymatic semisynthesis of aprotinin homologues mutated in P' positions. *J. Prot. Chem.* **10** 245-251 (1991a).
- Groeger, C., Wenzel, H.R., Tschesche, H.: Chemical semisynthesis of aprotinin homologues and derivatives mutated in P' positions. *J. Prot. Chem.* **10** 527-532 (1991b).
- Groeger, C., Wenzel, H.R., Tschesche, H.: Die Bedeutung der Rigidität des Peptidrückgrats für die Inhibitoreigenschaften des BPTI - gezeigt mit semisynthetischen Strukturvarianten. *Angew. Chem.* **105** 948-950 (1993).
- Groeger, C., Wenzel, H.R., Tschesche, H.: BPTI backbone variants and implication for inhibitory activity. *Int. J. Peptide Protein Res.* **44** 166-172 (1994a).
- Groeger, C., Struktur-Funktions-Varianten des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors. Dissertation an der Universität Bielefeld (1994b).
- Hagihara, M., Schreiber, S. L.: Reassignment of stereochemistry and total synthesis of the thrombin inhibitor Cyclotheonamide B. *J. Am. Chem. Soc.* **114** 6570-6571 (1992).
- Hann, M.M., Sammes, P.G., Kennewell, P.D., Taylor, J.B.: On double bond isostere of the peptide bond; An enkephalin analogue. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 234-235 (1980).
- Huber, R., Kukla, D., Steigemann, W., Deisenhofer, J., Jones, A.: The basic trypsin inhibitor of bovine pancreas. I. Structure, analysis and conformation of the polypeptide chain. *Naturwissenschaften* **57** 389-392 (1970).
- Huber, R., Kukla, D., Steigemann, W., Deisenhofer, J., Jones, A.: Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine trypsin inhibitor refinement of the crystal structure analysis. In: Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J., Truscheit, E. (Hrsg.): *Bayer Symp. V. Proteinase Inhibitors*, Springer Verlag, Berlin 1974, 497-512.
- IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN): Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. *Eur. J. Biochem.* **138** 9-37 (1984).

Jakubke, H.-D., Kuhl, P., Könnecke, A.: Grundprinzipien der Proteasen-katalysierten Knüpfung der Peptidbindung. *Angew. Chem.* **97** 79-87 (1985).

Jakubke, H.-D., Enzymatic peptide synthesis. In: *The Peptide: Analysis, Synthesis, Biology.* (Udenfriend, S., Meienhofer, eds) Academic Press, New York, 1987, 103-165.

Jean, F., Basak, A., DiMaio, J., Seidah, N.G., Lazure, C.: An internally quenched fluorogenic substrate of prohormone convertase 1 and furin leads to a potent prohormone convertase inhibitor. *Biochem. J.* **307** 689-695 (1995).

Jering, H., Tschesche, H.: Replacement of lysine by arginine, phenylalanine and tryptophan in the reactive site of the bovine trypsin kallikrein inhibitor (Kunitz) and change of the inhibitory properties. *Eur. J. Biochem.* **61** 453-463(1976a).

Jering, H., Tschesche, H.: Preparation and characterization of the active derivative of bovine trypsin-kallikrein-inhibitor (Kunitz) with the reactive site Lysine-15-Alanine-16 hydrolyzed. *Eur. J. Biochem.* **61** 443-452 (1976b).

Jones, J.: *The chemical synthesis of peptides.* Clarendon Press, Oxford. 1991.

Jones, D.M., Nilson, B., Szelke, M.: A short stereocontrolled synthesis of hydroxyethylene dipeptide isosteres. *J. Org. Chem.* **58** 2286-2290 (1993).

Kassel, B., Radicevic, M., Ansfield, M.J., Laskowsky, M. Sr.: The basic trypsin inhibitor of bovine pancreas. IV. The linear sequence of the 58 amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18** 255-258 (1965).

Kowalski, D., Laskowski, M. Jr.: Chemical enzymatic replacement of Ile64 in the reactive site of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *Biochemistry* **15** 1300-1309 (1976).

Kraut, H., Frey, E.K., Werle, E.: Über die Inaktivierung des Kallikreins. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **192** 1-21 (1930).

Kim, Y., H., Byun, I., S., Choi, J., Y., Highly diastereoselective addition of organometallics to novel  $\alpha$ -ketoamides of (S)-2-Methoxymethylindoline. *Tetrahedron: Asymmetry* **6** 1025-1026 (1995).

Krishnan, R., Tulinsky, A., Vlasuk, G. P., Pearson, D., Vallar, P., Bergum, P., Brunck, T. K., Ripka, W. C.: Synthesis, structure, and structure-activity relationships of divalent thrombin inhibitors containing an  $\alpha$ -keto-amide transition-state mimetic. *Protein Science* **5** 422-433 (1996).

- Krystek, S., Stouch, T., Novotny, J.: Affinity and specificity of serin endopeptidase-protein inhibitor interactions. *J. Mol. Biol.* **234** 661-679 (1993).
- Kunitz, M., Northrop, J.H.: Isolation from beef pancreas of a crystalline trypsinogen, trypsin, trypsin inhibitor and an trypsin inhibitor complex. *J. Gen.Physiol.* **19** 991-1007 (1936).
- Laskowski, M. Jr., Kato, I.: Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* **49** 593-626 (1980).
- Lee, A. Y., Clardy, J.: Structure of the Trypsin-Cyclotheonamide A complex: an all-natural approach. *Chemistry & Biology (Introductory Issue)* 10-11 (1994).
- Lee, A. Y., Hagihara, M., Karmacharya, R., Albers, M. W., Schreiber, S. L., Clardy, J.: Atomic structure of the Trypsin-Cyclotheonamide A complex: Lessons for the design of serine protease inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **115** 12619-12620 (1993).
- Lu, W., Qasim, M.A., Laskowsky, M. Jr., Kent, B.H.: Probing intermolecular main chain hydrogen bonding in serine proteinase-protein inhibitor complexes: Chemical synthesis of backbone-engineered turkey ovomucoid third domain. *Biochemistry* **36** 673-679 (1997a).
- Lu, W., Apostol, I., Qasim, M.A., Warne, N., Wynn, R., Zhang, W.L., Anderson, S., Chiang, Y.W., Ogin, E., Rothberg, I., Ryan, K., Laskowski, M.jr.: binding of amino acid side-chains to S<sub>1</sub> cavities of serin proteinases. *J. Mol. Biol.* **266** 441-461 (1997b).
- Marinier, A., Toth, M.V., Houseman, K., Mueller, R., Marshal, G.R.: HIV-1 Protease inhibitors: Ketomethylene isosteres with unusually high affinity compared with hydroxyethylene isostere analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **9** 919-925 (1994).
- Maryanoff, B. E., Greco, M. N., Zhang, H., Andrade-Gordon, P., Kauffman, J. A., Nicolaou, K. C., Liu, A., Brungs, P. H.: Macrocyclic peptid inhibitors of serin proteases. Convergent total synthesis of Cyclotheonamid A and B via a late-stage primary amine intermediate. study of thrombin inhibition under diverse conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **117** 1225-1239 (1995).
- Maryanoff, B.E., Qiu, X.Y., Padmanabhan, K.P., Tulinsky, A., Almond, H.R, Andrade-Gordon, P., Greco, M.N., Kauffman, J. A., Nicolaou, K.C., Liu, A.J., Brungs, P.H., Fusetani, N.: Molecular-basis for the inhibition of human alpha-thrombin by the macrocyclic peptide Cyclotheonamide A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** 8048-8052 (1993).
- Maryanoff, B. E., Zhang, H., Greco, M. N., Glover, K., A., Kauffman, J. A., Andrade-Gordon, P.: Cyclotheonamide derivatives: synthesis and thrombin inhibition. Exploration of specific structure-function issues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **8** 1025-1038 (1995).

- Maryanoff, B. E., Zhang, H., Greco, M. N.: Transformation of marine natural product Cyclotheonamide A by aqueous base. X-Ray analysis of a novel ligand complexed with human  $\alpha$ -thrombin. *Tetrahedron Letters* **37** 3667-3670 (1996).
- McMurray, J., Dyckes, F.: A simple and convenient method for the preparation of ketomethylene peptide analogues. *J. Org. Chem.* **50** 1112-1115 (1985).
- Mehlich, A.: Semisynthetische Untersuchungen zur Struktur-Funktionsbeziehung des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aus Rindermastzellen. Dissertation an der Universität Bielefeld (1987).
- Mehlich, A.: Unveröffentlicht (1988).
- Metzger, J.W., Beck, W., Jung, G.: Ion-spray mass spectrometry of lipopeptide vacciness. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **31** No. 2 226-228 (1992).
- Moroder, L., Hallet, A., Wünsch, E., Keller, O., Wersin, G.: Di-tert.-butyldicarbonat - ein vorteilhaftes Reagenz zur Einführung der tert.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **357** 1651-1653 (1976).
- Moss, R. A., Scimin, P., Battaacharya, S., Chatterjee, S.: A convenient preparation of 1,2-diacylglycerols; o-Iodbezoyl as a protecting group. *Tetrahedron Letters* **28** 5005-5008 (1987).
- Muir, T.W.: A chemical approach to the construction of multimeric protein assemblies. *Structure* **3** 649.652 (1995).
- Munoz, B., Giam, C., Wong, C.:  $\alpha$ -Ketoamide phe-pro isostere as a new core structure for the inhibition of HIV-Protease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2** 1085-1090 (1994).
- Murphy, K.P., Freire, E.: Thermodynamics of structural stability and cooperativ folding behavior in proteins. *Adv. Prot. Chem.* **43** 313-361 (1992).
- Naray-Szabo, G., Nagy, P., Electrostatic lock and key model for the study of biological isosterism: Role of structural water in the binding of basic pancreatic trypsin inhibitor to  $\beta$ -trypsin. *Enzyme* **36** 44-53 (1986).
- Noren, C.J., Anthony-Cahill, S.J., Griffith, M.C., Schultz, P.G.: A general method for site specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science* **244** 182 188 (1989).
- Payne, L.S., Boger, J.: Synthesis of  $\alpha,\omega$ -diamino acids: An efficient preparation of DL-homolysine and protected derivatives. *Synthetic Communications* **15** 1277-1290 (1985).

- Petri, R.: Röntgenstrukturuntersuchungen am Trypsin-Aprotinin-Komplex. Diplomarbeit, Max-Planck-Institut Martinsried, 1995.
- Rich, D.H.: Peptidase inhibitors. In: Hansch, C., Sammes, P.G., Taylor, J.G., (Hrsg.): *Comprehensiv Medicinal Chemistry Vol.2*, Pergamon Press Oxford 1991, 391-441.
- Rühlmann, A. Kulka, D., Schwager, P., Huber, R., R.: Structur of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J. Mol. Biol.* **77** 413-436 (1973).
- Schechter, I., Berger, A.: On the size of the active site in proteases. 1. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27** 157-162 (1967).
- Schnabel, E., Schröder, W., Reinhardt, G.: [Ala<sub>2</sub><sup>14,38</sup>]aprotinin: Preparation by partial desulphurization of aprotinin by means of raney nickel and comparison with other aprotinin derivatives. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **367** 1167-1176 (1986).
- Schuster, M., Munoz, B., Yuan, W., Wong, C. H.: Papain catalyzed synthesis of peptide isosters. *Tetrahedron Letters* **34** 1247-1250 (1993).
- Sieber, P.: Der 2-Trimethylsilylethyl-Rest als selektiv abspalbare Carboxy-Schutzgruppe. *Helvetica Chimica Acta* **264** 2711-2716 (1977).
- Siekmann, J., Wenzel, H.R., Schröder, W., Tschesche, H.: Characterisation and sequence determination of six Aprotinin homologues from bovine lungs. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369** 157 163 (1988 ).
- Siekmann, J., Beckmann, J., Mehlich, A., Wenzel, H.R., Tschesche, H., Schnabel, E., Müller-Esterl, W.: Immunological characterisation of natural and semisynthetic Aprotinin variants. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **370** 677-681 (1989).
- Song, H.K., Suh, S.W.: Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: Refined Structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue-type plasminogen activator. *J. Mol. Biol.* **275** 347-363 (1998).
- Spatola, A.F.: Peptide backbone modifications. In: Weinstein, B. (Hrsg.): *Chemistry and Biochemistry of amino acids, peptides and proteins*, Marcel Dekker, New York 1983, 267-357.
- Steiner, J.R., Barnes, C.L.: Crystal and molecular structure of destruxin B. *Int. J. Peptide and Protein Res.* **31** 212-219 (1988).

Stickley, S. H., Martin J., C., A mild 10-I-4 iodine oxide, oxidant for primary and secondary alcohols. *Tetrahedron Letters* **36** 9117-9120 (1995).

Tan, N. H., Kaiser, E.T.: Synthesis and characterisation of a pancreatic trypsin inhibitor homologue and a model inhibitor. *Biochemistry* **16** 1531-1541 (1977).

Thomas, N.E., Bramson, H.N., Miller, W.T., Kaiser, E.T.: Role of enzyme backbone hydrogen bonding in determining protein kinase substrate specificities. *Biochemistry* **26** 4461-4466 (1987).

Tschesche, H., Beckmann, J., Mehlich, A., Schnabel, E., Truscheit, E., Wenzel, H.R.: Semisynthetic engineering of proteinase inhibitor homologues. *Biochimica et Biophysica Acta* **913** 97-101 (1987).

Tschesche, H.: Eugen Werles kallikrein inaktivator: The route from its discovery to semisynthetic homologues with new biological activities. In: Fritz, H., Schmidt, I., Dietze, G. (Hrsg.): *The kallikrein system in health and disease*. Verlag Limbach, Braunschweig, 1989, 237-260.

Tschesche, H., Beckmann, J., Mehlich, A., Feldmann, A., Wenzel, H.R.: Semisynthetic arginine-15-*aprotinin*, an improved inhibitor for human plasma kallikrein. *Adv. Exp. Med. Biol.* **247** B 15-21 (1989b).

Tschesche, H., Groeger, C., Wenzel, H.R.: Enzymatic fragment substitution as a tool in protein design. *Biomedica Biochemica Acta* **50** 175-180 (1991).

Vincent, J.-P., Lazdunski, M.: Trypsin-pancreatic trypsin inhibitor association and role of disulfide bridges. *Biochemistry* **11** 2967-2977 (1972).

Warshel, A., Naray Szabo, G., Sussmann, F., Hwang, J. K.: How do serine proteases really work?. *Biochemistry* **28** 3629-3637 (1989).

Wenzel, H.R., Tschesche, H.: "Chemische Mutation" durch Aminosäureaustausch im reaktiven Zentrum eines Proteinase Inhibitors und Änderung seiner Hemmspezifität. *Angew. Chem.* **93** 292-293 (1981).

Wenzel, H.R., Beckmann, J., Mehlich, A., Siekmann, J., Tschesche, H.: Potentials of high performance ion exchange chromatography in protein separations - synthesis and characterisation of *Aprotinin* derivatives and homologues. In: Tschesche, H. (Hrsg.): *Modern methods in protein chemistry*, Vol.2, Walter de Gruyter & Co, Berlin, New York 1985, 174-184.

Wenzel, H. R., Beckmann, J., Feldmann, A., Mehlich, A., Siekmann, J., Tschesche, H.: Protein tailoring on the model of aprotinin. The bovine trypsin inhibitor (Kunitz). In: Jung, G., Bayer, E. (Hrsg.): Peptides 1988, Walter de Gruyter & Co Berlin, New York 1989, 381-383.

Wipf, P., Kim, H.: Total synthesis of Cyclotheonamide A. J. Org. Chem. **58** 5592-5594 (1993).

Wlodawer, A., Nachman, J., Gilliland, G.L., Gallagher, W., Woodward, C.: Structure of form III crystals of bovine pancreatic trypsin inhibitor. J. Mol. Biol. **198** 469-480 (1987).

Yagisawa, S.: Studies on protein semisynthesis. I. Formation of esters, hydrazides, and substituted hydrazides of peptides by the reverse action of trypsin. J. Biochem. **89** 491-501 (1981).



