

Kombinatorische Festphasensynthese von Peptidomimetika

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2000

vorgelegt von

Holger Bandel

Tag der mündlichen Prüfung: 27.9.2000

Dekan: Professor Dr. U. Nagel

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Jung

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Maier

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. G. Jung

in der Zeit von November 1997 bis Juli 2000 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Jung danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen während dieser Arbeit.

1 Einleitung	1-1
1.1 Kombinatorische Chemie – ein effektives Syntheseprinzip	1-1
1.2 Synthesemethoden	1-3
1.2.1 Festphasensynthese organischer Verbindungen	1-3
1.2.2 Synthese in flüssiger Phase	1-7
1.3 Synthesekonzepte zum Aufbau festphasengebundener Verbindungskollektionen	1-7
1.3.1 Synthese von Einzelverbindungen	1-7
1.3.2 Bibliothekssynthese mit Reaktanten-Mischungen	1-8
1.3.3 Split and Combine Methode	1-8
1.3.4 Multipin-Methode	1-10
1.4 Diversität von Verbindungskollektionen	1-10
1.4.1 Computergestützte Methoden in der Kombinatorischen Chemie	1-12
1.5 Charakterisierung festphasengebundener Verbindungen	1-13
1.6 Evaluierung von Verbindungsbibliotheken	1-14
1.6.1 Bibliothekskonzepte	1-14
1.6.2 Dekonvolution von Verbindungsbibliotheken	1-14
1.6.3 Tagging-Methoden	1-16
2 Aufgabenstellung	2-18
3 Ergebnisse	3-21
3.1 Kombinatorische Synthese hochsubstituierter Pyrrolidine und deren Charakterisierung durch FT-IR-Mikroskopie	3-21

3.1.1 Synthesemöglichkeiten	3-21
3.1.2 Möglichkeiten der Festphasensynthese	3-22
3.1.3 Mechanismus und Stereochemie der Cycloaddition bei der Pyrrolidinsynthese	3-23
3.1.4 Mechanismus der Derivatisierung der Pyrrolidingrundstruktur am Imidring	3-25
3.1.5 Pyrrolidinsynthese an fester Phase	3-26
3.1.5.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen	3-26
3.1.5.2 Variation der eingesetzten Synthesebausteine	3-29
3.1.5.3 Modifikation des Grundkörpers durch Mitsunobu-Reaktion	3-34
3.1.6 Charakterisierung einer Split-Mix-Pyrrolidin-Kollektion mittels FT-IR-Mikroskopie	3-36
3.1.6.1 Synthese der Pyrrolidin-Kollektion	3-36
3.1.6.2 Charakterisierung der Verbindungskollektion	3-38
3.1.7 Zusammenfassung	3-42
3.2 Kombinatorische Synthese modifizierter α-Hydroxy-β-amino-aldehyde	3-44
3.2.1 Peptidomimetische Enzyminhibitoren	3-44
3.2.2 Synthesestrategie zur Herstellung von α-Hydroxy-β-amino-Aldehyden	3-46
3.2.3 C_1-Kettenverlängerung - Thiazol als maskierte Aldehydfunktion	3-47
3.2.4 Wahl des polymeren Trägermaterials	3-49
3.2.5 Synthese der polymeren Boc-Schutzgruppe	3-51
3.2.6 Belegung des polymeren Trägermaterials mit Aminosäureestern	3-53
3.2.7 Übertragung der C_1-Kettenverlängerung auf die feste Phase	3-57
3.2.7.1 Synthese harzgebundener Weinreb-Amide	3-57
3.2.7.2 Umsetzung mit Lithiumthiazol	3-58
3.2.7.3 Reduktion der polymergebundenen Ketone zu sekundären Alkoholen	3-60
3.2.7.4 Einführung einer Alkoholschutzgruppe	3-61
3.2.7.5 Abbausequenz zur Freisetzung der Aldehydfunktion	3-62
3.2.8 Modifizierung harzgebundener α-Hydroxy-β-amino-Aldehyde	3-64
3.2.8.1 Reduktive Aminierung harzgebundener α-Hydroxy-β-amino-aldehyde	3-65
3.2.8.2 Herstellung von Sulfonphosphonaten	3-67
3.2.8.3 Horner-Emmons-Reaktion an fester Phase	3-69
3.2.9 Zusammenfassung	3-71

3.3 Kombinatorische Synthese von Tripeptidanaloga	3-73
3.3.1 Wirkung und Verwendung von Peptidyl-vinylsulfonen als irreversible Enzyminhibitoren	3-73
3.3.2 Synthesemöglichkeiten zur Herstellung C-terminal modifizierter Peptide	3-75
3.3.3 Herstellung harzgebundener Aminoaldehyde	3-76
3.3.3.1 Derivatisierung harzgebundener Aminoaldehyde	3-78
3.3.4 Synthese von Tripeptiden an fester Phase	3-82
3.3.5 Synthese von Tripeptidylvinylsulfonen	3-86
3.3.6 Beispiel der N-Acylierung von Tripeptidylvinylsulfonen	3-87
3.3.7 Zusammenfassung	3-90
3.4 Single-Bead-Analytik durch FT-ICR-MS von Split-and-Combine-Bibliotheken	3-92
3.4.1 FT-ICR-MS	3-93
3.4.2 Untersuchung einer Split-and-Combine Pyrrolidin-Bibliothek	3-94
3.4.3 Zusammenfassung	3-97
4 Experimenteller Teil	4-98
4.1 Chemikalien und Lösungsmittel	4-98
4.2 Analytik	4-98
4.2.1 Dünnschichtchromatographie	4-98
4.2.2 FT-IR-Spektroskopie	4-99
4.2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	4-99
4.2.4 Massenspektrometrie	4-100
4.2.5 ESI-FT-ICR-Massenspektrometrie	4-100
4.2.6 NMR-Spektroskopie	4-101
4.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von Pyrrolidinen	4-101
4.3.1 Synthese von Einzelverbindungen	4-101
4.3.2 Synthese der Pyrrolidinbibliotheken	4-102
4.4 Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Polymer-Boc-Schutzgruppe	4-103

4.5 Arbeitsvorschrift zur Beladung der Polymer-Boc-Schutzgruppe	4-104
4.5.1 Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von Aminosäureallyl-estern	4-104
4.5.2 Allgemeine Vorschrift zur Belegung des Polymer-Boc-Harzes mit Aminosäureestern	4-105
4.5.3 Allgemeine Vorschrift zur Abspaltung von der Polymer-Boc-Schutzgruppe	4-106
4.5.4 Allgemeine Vorschrift zur Abspaltung der Allylschutzgruppe	4-106
4.5.5 Allgemeine Vorschrift zur Abspaltung der Methylschutzgruppe	4-106
4.6 Synthese von α-Hydroxy-β-aminoaldehyden	4-107
4.6.1 Darstellung von Polymer-Boc-Aminosäure-N-methoxy-N-methyl-amiden (Weinreb-Amide)	4-107
4.6.2 Weinreb-Keton-Darstellung mit Thiazolyl-Lithium	4-107
4.6.3 Darstellung von Polymer-Boc-1-Thiazolyl-aminoalkoholen mittels Reduktion	4-108
4.6.4 Einführung der TBDMS-Schutzgruppe bei Polymer-Boc-1-Thiazolyl-aminoalkoholen	4-108
4.6.5 Dondoni-Abbaureaktion von Polymer-Boc-1-(TBDMS)-1-thiazolyl-aminosäure-Harz zu Polymer-Boc-β-Amino-α-hydroxy-aminosäurealdehyd-Harz	4-109
4.7 Derivatisierung von α-Hydroxy-β-aminoaldehyden	4-110
4.7.1 Darstellung von Polymer-Boc-β-Amino-α-hydroxy-amino-vinyl-sulfonen durch Wittig-Horner-Reaktion	4-110
4.7.2 Darstellung von Polymer-Boc-β-Amino-α-hydroxy-ethylaminen durch reduktive Aminierung	4-110
4.7.3 Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe	4-111
4.8 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Polymer-Boc-Aminoaldehyden	4-111
4.8.1 Darstellung von 1,2,3,4-Tetrahydrocarbolinen aus Polymer-Boc-Aminoaldehyden	4-111
4.8.2 Darstellung von sekundären Aminen ausgehend von Polymer-Boc-aminoaldehyd-Harz	4-112

4.9 Darstellung N,C-modifizierter Tripeptide	4-113
4.9.1 Aktivierung der Carboxylfunktion mittels Pentafluorphenol-trifluoracetat	4-113
4.9.2 Darstellung von Polymer-Boc-Tripeptiden	4-113
4.9.3 Darstellung von Polymer-Boc-Tripeptid-Weinreb-Amiden	4-114
4.9.4 Darstellung von Polymer-Boc-Tripeptid-Aldehyden	4-114
4.9.5 Darstellung von Polymer-Boc-Tripeptid-Vinylsulfonen	4-114
4.9.6 Darstellung von N-acylierten Tripeptid-Vinylsulfonen	4-114
4.9.7 Synthese von Sulfonyl-diethylphosphonaten	4-115
5 Abkürzungsverzeichnis	5-117
6 Literaturverzeichnis	6-119

1 Einleitung

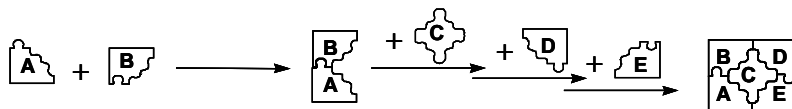
1.1 Kombinatorische Chemie – ein effektives Syntheseprinzip

Der erste Schritt bei der Suche nach neuen Therapeutika ist in der Regel die Identifizierung von Leitverbindungen, welche an ein bestimmtes biologisches Target (Rezeptor, Enzym) selektiv binden. Durch Fortschritte in der Molekularbiologie und der Gentechnologie nimmt die Anzahl an Targets, die durch diese neuen Methoden identifiziert und isoliert werden stark zu. Darauf basierende Testsysteme werden mit neuen Methoden der Automatisierungs- und Robotertechnik kombiniert, wodurch nun die Möglichkeit besteht, drastisch mehr Verbindungen pro Zeiteinheit auf ihre potentielle Aktivität zu untersuchen. Der Engpass bei der Suche nach aktiven Verbindungen liegt nicht mehr auf der Seite des High-Throughput-Screenings (HTS), sondern bei der Synthese von Testverbindungen.

Mit Hilfe des der Natur entlehnten kombinatorischen Ansatzes in der Synthesechemie ist es möglich, deutlich mehr verschiedenartige Verbindungen pro Zeiteinheit herzustellen, als mit konventionellen Methoden [Frü96] [Jun96] [Her97] [Jun99] [And99]. In der Natur wird aus nur 20 Bausteinen, den natürlichen Aminosäuren, eine praktisch unbeschränkte Anzahl an Peptiden aufgebaut. Bereits die Synthese von Hexameren liefert 64 000 000 sequentiell unterschiedliche Hexapeptide. Analog zu diesem Modell werden in der Kombinatorischen Chemie jetzt auch Verbindungsbibliotheken bzw. Verbindungskollektionen mit einer großen Anzahl von strukturell unterschiedlichen Verbindungen erzeugt. Dies geschieht durch die systematische oder repetitive kovalente Kupplung unterschiedlicher Gruppen (Building Blocks) von Grundbausteinen miteinander [War97]. Schematisch ist ein Vergleich in Abb. 1-1 dargestellt. Diese Synthesestrategie weicht von der klassischen Synthesechemie ab. Anstatt Synthesewege auf ein einzelnes Zielmolekül hin zu

entwickeln, sind hier Wege von Bedeutung, die eine höchst effiziente und kompatible Verknüpfung der Edukte gestatten. Endprodukte sollen mit wenig Nebenprodukten entstehen und der arbeitstechnische Syntheseaufwand soll minimiert werden oder sich auf Syntheseautomaten übertragen lassen. Insgesamt wird eine Rationalisierung der Synthese vollzogen.

Aufbau von nicht-oligomeren organischen Molekülen



Aufbau von Oligomeren (Peptide Peptoide)



Abb. 1-1 oben: Aufbau kombinatorischer Bibliotheken durch Verknüpfung von Bausteinen (A - E) in einer Reaktionsfolge; unten: Aufbau von Oligomeren mittels bifunktioneller Bausteine

Neben der Synthese stellt das Screening-Verfahren den zweiten wichtigen Bestandteil des kombinatorischen Ansatzes dar. Idealerweise findet eine vollständige spektroskopische Charakterisierung der getesteten Verbindungen nur im Falle einer positiven Rückmeldung vom Screening statt. Die Implementierung der Kombinatorischen Chemie in den Prozess der Leitstuktursuche gibt Abb. 1-2 wieder. Neue Targets werden mit, durch kombinatorische Methoden synthetisierte, Verbindungen in Screening Tests auf Aktivität untersucht, um so die Suche nach Leitstrukturen zu beschleunigen.

Identifizierung eines Targets

Entdeckung durch molekularbiologische oder gentechnologische Verfahren



Design einer Verbindungsbibliothek

Erzeugung virtueller Bibliotheken mittels Computational Chemistry



Kombinatorische Chemie

Synthese hochdiverser Bibliotheken



Screening Assays

z.B. Enzym- oder Rezeptorassay



Leitstruktur

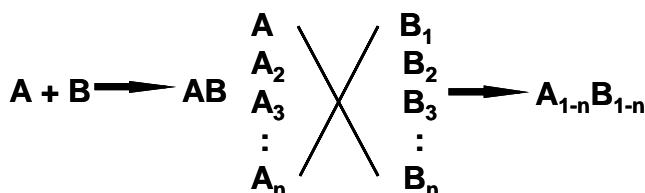


Abb. 1-2: Ablaufdiagramm der Leitstruktursuche durch Kombinatorische Chemie

Außer auf dem Gebiet der Leitstruktursuche für biologische Targets findet die Kombinatorische Chemie eine immer größer werdende Verbreitung, da sich damit prinzipiell alle Substanzeigenschaften optimieren lassen. Der Einsatz dieser Methode zur Verbesserung von Katalysatoren, Liganden oder Supraleitern ist in [Hof99] [Bur96] [Pes99] beschrieben.

1.2 Synthesemethoden

1.2.1 Festphasensynthese organischer Verbindungen (Solid Phase Organic Synthesis SPOS)

Durch die einfachere Möglichkeit der Parallelisierung bei der Synthese an fester Phase beruhen die meisten Arbeiten auf dem Gebiet der Kombinatorischen Chemie auf dieser Methode. Neben den Vorteilen der erleichterten Reaktionsführung, der Möglichkeit des Einsatzes hoher Eduktüberschüsse und

der einfachen Aufarbeitung, lassen sich auch viele Screening-Assays für den Test harzgebundener Verbindungen verwenden.

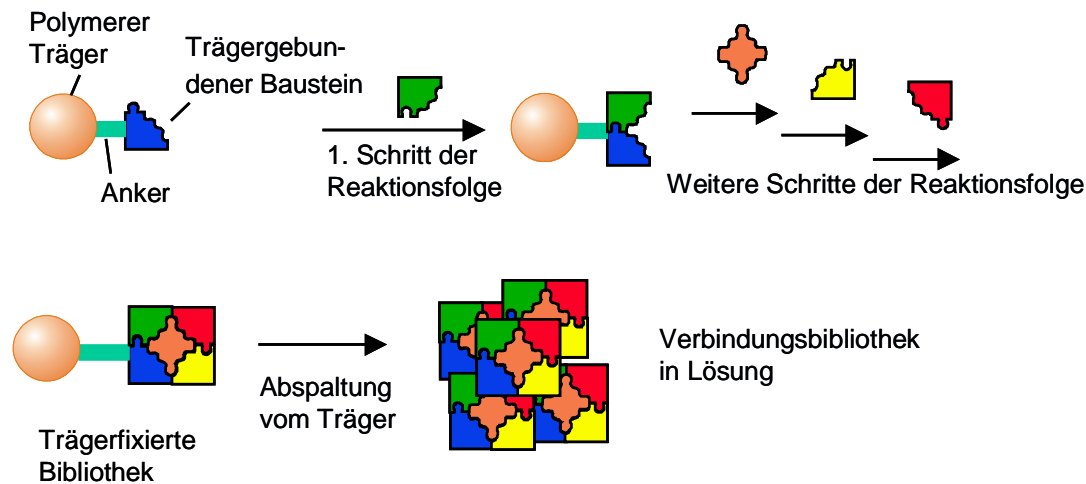


Abb. 1-3: Festphasensynthese nicht-oligomerer Moleküle

Schema 1 zeigt eine Übersicht der Vor- und Nachteile der organischen Festphasenchemie. Das Konzept der Festphasensynthese wurde erstmals 1963 von Merrifield in der Peptidsynthese verwendet [Mer63] (Solid Phase Peptide Synthesis SPPS) [Jun92]. Das Peptid ist hierbei C-terminal am polymeren Trägermaterial gebunden und wird dann sukzessive durch die Anknüpfung weiterer Aminosäurebausteine verlängert. Bei allen Festphasensynthesen dient das polymere Trägermaterial auch als Schutzgruppe während der Synthese (Abb. 1-3). Am Ende wird das Peptid vom Trägermaterial abgespalten. Erst 10 Jahre später erkannten auch organische Chemiker das Potential dieser Synthesemethode zur Herstellung nichtpeptidischer, organischer Moleküle [Lez72] [Won73].

Vorteile der Festphasenchemie:

- Vereinfachte Reaktionsführung: Zeitaufwendige Reinigungs- und Isolierungsschritte entfallen.
- Thermodynamische und kinetische Beeinflussung des Reaktionsverlaufs: Durch hohe Überschüsse können hohe Ausbeuten erhalten werden.
- Leichte Automatisierbarkeit: Wie bei Peptidsynthesen etabliert, können parallele Synthesen leicht automatisiert werden.
- Durch das Prinzip der hohen Verdünnung (Trägern mit geringer Beladung ($\leq 0,8$ mmol/g) kann eine unerwünschte Nebenreaktion durch räumlich isolierte reaktive Gruppen unterdrückt werden.
- Einfluß des Polymer-Rückgrates auf die lokale Umgebung des Substrates, z.B. Template-Effekt bei asymmetrischen Synthesen und Cyclisierungen.

Nachteile:

- Alle Reaktionsschritte einer Synthesesequenz müssen mit dem Trägermaterial und der Ankergruppe kompatibel sein.
- Die analytische Verfolgung von Festphasenreaktionen ist durch den polymeren Träger erschwert.
- Da die Synthese ohne zeitaufwendige Zwischenreinigung erfolgt, muß jeder Reaktionsschritt möglichst quantitativ verlaufen. In der Peptidchemie entstehen so Fehlsequenzen, die die maximal erreichbare Proteinkettenlänge begrenzen (Abb. 1-4).
- In Lösung bekannte und etablierte Reaktionen müssen den Festphasenbedingungen erst angepaßt werden, damit sie mit den verwendbaren Materialien kompatibel sind.

Schema 1: Vor- und Nachteile der SPOS

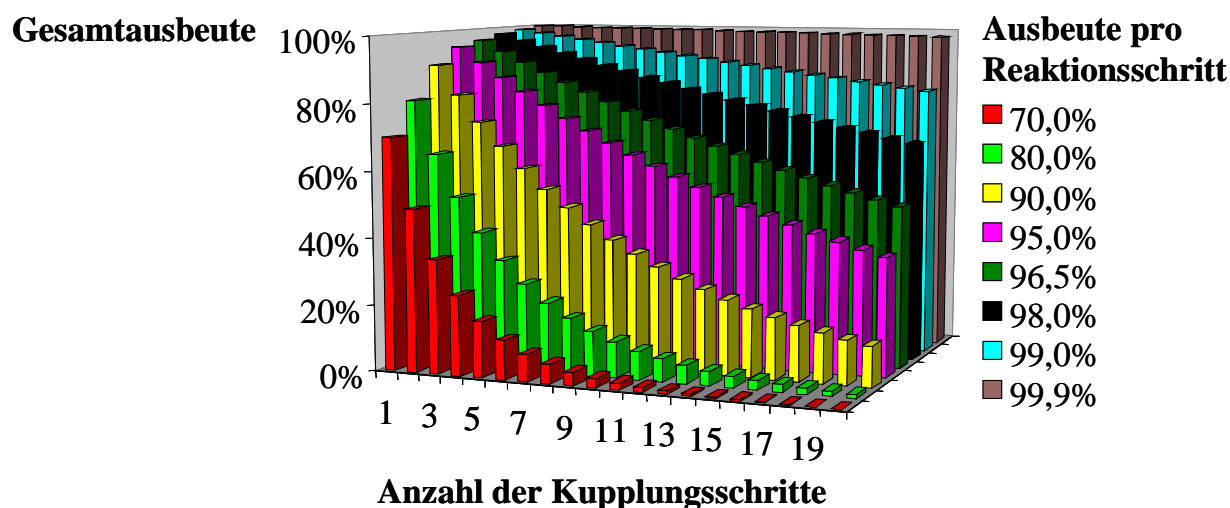


Abb. 1-4: Abhängigkeit der Ausbeute (Reinheit) von der Anzahl an Reaktionsschritten und deren Umsetzungsgrad.

Konsequent wird die Kombinatorische Chemie erst seit Anfang der 90er Jahre erforscht und eingesetzt [Bun92]. Mittlerweile haben die synthetischen Möglichkeiten der Festphasenchemiker deutlich zugenommen [Her97] [And99] [Jun96] [Jun99]. Bei der Entwicklung neuer SPOS-Reaktion lässt sich die Vorgehensweise wie folgt beschreiben.

Die Übertragung von organischen Reaktionen auf die feste Phase beginnt mit den Ausgangsdaten der Flüssigphasensynthese, sofern diese überhaupt vorhanden sind und mit gängigen Anker- und Trägermaterialien in Bezug auf Temperatur und Beständigkeit kompatibel sind. Der nächste Schritt stellt die Optimierung der Produktreinheit und Ausbeute dar, welche durch Variation der Reaktionsparameter erreicht wird (Temperatur, Lösungsmittel, Dauer, Überschüsse, Konzentrationen). Hilfreich dafür sind automatisierte Synthesysteme. Je nach Komplexität der Reaktionssequenz kann eine komplette Machbarkeitsstudie Übertragungsphase zwischen 3 und 6 Monate betragen bevor die Produktion einer großen Bibliothek begonnen werden kann.

1.2.2 Synthese in flüssiger Phase

Die kombinatorische Chemie in Lösung [Aus99] [Wag99] hat bisher noch einen geringen Anteil an den kombinatorisch durchgeführten Synthesen, da bisher geeignete automatisierte Geräte für die Aufarbeitung der Flüssigphasenchemie fehlten. Durch fortschreitende Entwicklungen auf diesem Gebiet ist man heute in der Lage wieder die bekannten Reaktionsfolgen der klassischen Synthese zu verwenden. Allerdings werden bis jetzt nur kurze, mit hoher Ausbeuten verlaufende Reaktionssequenzen durchgeführt. Ebenso finden damit als Eintopfreaktionen verlaufende Multikomponentenreaktionen (Ugi, Biginelli) eine neue Anwendung [Dax99] [Ugi99].

1.3 Synthesekonzepte zum Aufbau festphasengebundener Verbindungskollektionen

1.3.1 Synthese von Einzelverbindungen

Die bevorzugte Art der Reaktionsführung in der Kombinatorischen Chemie ist die Herstellung von Einzelverbindungen in multipler paralleler Synthese. Hierzu werden in N Einzelgefäßen N Einzelverbindungen synthetisiert. Diese lassen sich analytisch leicht charakterisieren und Ergebnisse aus Screening-Assays können ohne Aufwand direkt auf die jeweilige Verbindung zurückverfolgt werden. Der einfachen Handhabbarkeit dieser Methode steht der oft sehr hohe Verbrauch an Materialien und Zeit gegenüber. Um diese Nachteile zu minimieren wurden deshalb mehrere Strategien entwickelt.

1.3.2 Bibliothekssynthese mit Reaktanten-Mischungen (Premix-Methode)

Eine äquimolare Mischung an Reaktanten wird mit dem polymergebundenen Edukt zur Reaktion gebracht. Theoretisch erhält man dadurch ohne großen Syntheseaufwand eine sehr umfangreiche Bibliothek. Praktisch ist diese Anzahl an Verbindungen in äquimolarem Verhältnis außer bei Oligomeren kaum zu erreichen. Das Produkteverhältnis ist von der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der einzelnen Edukte abhängig. Desaktivierte oder sterisch anspruchsvolle Substrate reagieren langsamer ab als aktivierte und sorgen so für ein nichtäquimolares Verhältnis der Produkte. Sinnvoll ist der Einsatz daher nur bei Reaktanten mit vergleichbarer Reaktivität [Gey86]. Aus diesem Grund hat sich diese Methode hauptsächlich in der Peptidsynthese bewährt [Wie96]. Bei vielstufigen Synthesen organischer Moleküle besitzt sie dagegen keinerlei Bedeutung.

1.3.3 Split and Combine Methode (Portionierungsmischungs-Methode)

Das Problem unterschiedlicher Reaktivität der Reaktanten kann durch räumliche Auftrennung des Trägermaterials in Aliquote umgangen werden [Fur91]. Die Teilmengen werden dann mit einem Synthesebaustein umgesetzt. Diese Methode erlaubt einen sehr effektiven und schnellen Aufbau komplexer Bibliotheken (Abb. 1-5). Nach der Reaktion werden die Aliquote wieder vermischt und anschließend für den nächsten Schritt wieder geteilt. Insgesamt entstehen so Verbindungskollektionen mit äquimolaren Mischungen aller Komponenten.

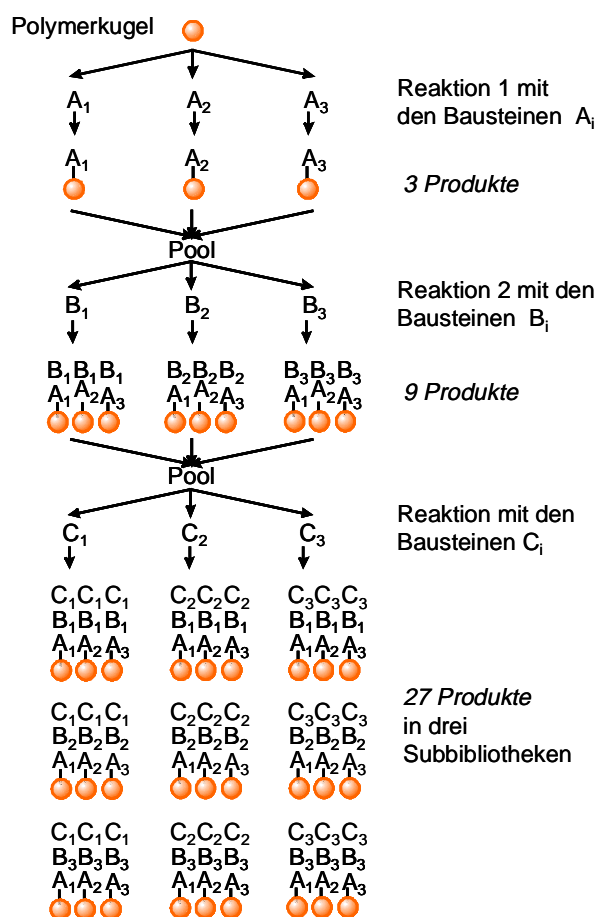


Abb. 1-5: Split-Mix-Reaktionsschema: Ein Reaktionsschritt besteht aus Mischen, Aufteilen und Reaktion der Edukte in separaten Gefäßen.

Die einzelne Harzkugel stellt das kleinste nichtteilbare Kompartiment in der Mischung dar. Jede Kugel trägt damit genau nur eine Verbindung, jedoch liegen vielfache Kopien in der Mischung vor (*one bead-one-compound*).

Die Anzahl der Bibliothekskomponenten N steigt mit wenig Synthesaufwand exponentiell an. Die Anzahl der Harzkugeln sollte die Zahl der Bibliothekskomponenten mindestens um eine, besser um zwei Zehnerpotenzen übersteigen [Jun96]. So kann eine Heptamer-Peptidbibliothek X^7 mit 20^7 Peptiden schlecht hergestellt werden, weil die benötigte Harzmenge bereits bei 400 g liegt (Bead-Durchmesser 40 μm). Kollektionen mit unter 10 000 Komponenten sind mit weniger als einem Gramm Trägermaterial zu realisieren [Bur94].

1.3.4 Multipin-Methode

Die multiple, parallele Synthese von Peptiden an funktionalisierten Polyethylenstäbchen wurde von Geysen et al. entwickelt. Im Format von Multiwellplatten kann so eine effektive Bibliothekssynthese erfolgen. Weiterentwicklungen auf diesem Gebiet ermöglichen auch den Einsatz in der Kombinatorischen Chemie.

1.4 Diversität von Verbindungskollektionen

Um ein Screening möglichst effektiv zu gestalten, müssen die zu testenden Verbindungen eine maximale Diversität besitzen. Damit werden redundante Informationen vermieden und die Chance erhöht sich bei einem Testverfahren Aktivität zu finden. Die Diversität einer Kollektion muss deshalb schon in der Planungsphase berücksichtigt werden [Mat97] [Kir99].

Diversität kann über die Eigenschaften der Komponenten einer Bibliothek beschrieben werden. Sind viele funktionelle Gruppen (hydrophile, hydrophobe, H-Brückenbildner...) vorhanden, die mit dem Target wechselwirken können, ist eine Vielzahl sterischer Anordnungen möglich. Ebenso steigt die Diversität, wenn eine große Anzahl an unterschiedlichen Edukten zur Synthese verfügbar ist. Der Begriff lässt sich unterteilen in:

Globale Diversität (Random Library): Verwendung bei der Suche nach neuen Leitstrukturen. Eine hohe Diversität soll einen möglichst großen chemischen Raum abdecken, um so zu einer Leitstruktur zu kommen.

Lokale Diversität (Focused Library): Sie wird bei der Leitstrukturoptimierung verwendet. Hierbei wird nur ein kleiner Ausschnitt des chemischen Raumes um

die neue Leitstruktur herum untersucht. Hieraus erhaltene Screening-Daten können für SAR (Struktur-Activity-Relationship) Studien eingesetzt werden.

Bei den Reaktionsschritten ist für eine maximale Diversität zu beachten:

- die Sequenz sollte unter Bindungsknüpfung verlaufen, um gleichzeitig viele Bausteine zu verwenden
- die Reaktionsbedingungen müssen für jeden Baustein optimal sein, um zuverlässig zum Produkt zu führen
- die kommerzielle Verfügbarkeit einer großen Anzahl an Bausteinen muß gewährleistet sein
- die Bausteine müssen eine breite Palette an Eigenschaften (zusätzliche funktionelle Gruppen, verschiedene Größen...) aufweisen

Ein Ausgangspunkt in der Strategie zur Synthese von Bibliotheken in der Kombinatorischen Chemie ist eine Struktur, die bereits in bekannten Pharmakophoren enthalten ist, und deshalb die Entdeckung weiterer Leitstrukturen wahrscheinlicher gestaltet.

Die Synthese neuer Strukturklassen bilden einen weiteren Startpunkt auf der Suche nach biologischer Aktivität. Mehrkomponenten-Reaktionen wurden hierzu eingesetzt. Polyfunktionelle Template (Zucker, Polysäuren), weiterfunktionalisiert in mehreren Schritten, lassen eine schnelle Herstellung hochkomplexer Bibliotheken zu. Dadurch werden die am Templat fixierten Reste in einer definierten räumlichen Position dem Rezeptor oder Enzym präsentiert [Jun99].

1.4.1 Computergestützte Methoden in der Kombinatorischen Chemie

Eine grobe Abschätzung der Diversität für die Auswahl an Bausteinen zur Bibliothekssynthese kann vom Chemiker durchgeführt werden. Exaktere Daten zur Beschreibung von Moleküleigenschaften liefern aber Molecular Modelling Programme. Physikalische, chemische und topographische Eigenschaften können dabei durch die Auswahl an geeigneten Deskriptoren ermittelt werden. Diese Daten können zur Selektion herangezogen werden, um einen maximal diversen Datensatz an Edukten zu generieren. Der Vergleich verschiedener Deskriptoren wurde von Matter [Mat97] beschrieben. Zusätzlich zu dieser computergestützten Auswahl wurde der Einsatz von neuronalen Netzen auf diesem Gebiet beschrieben [Sad95].

Die Verwendung dieser Hilfsmittel erlaubt die Untersuchung sehr großer virtueller Bibliotheken auf ihre diversen Eigenschaften. Es kann damit beispielsweise ein Teil ausgewählt werden, welcher die gesamte Bibliothek repräsentiert. Eine Zusammenfassung der Vorteile der computergestützten Methoden zeigt Schema 2.

- Abschätzungen zwischen der Diversität einer virtuellen Bibliothek und ihrer Redundanz an Information können schnell getroffen werden.
- Die Wahl optimal diverser Mitglieder der Bibliothek ergibt gleiche Information, wie die Synthese aller Mitglieder.
- Verringerter Material- und Syntheseaufwand
- Daten von Kollektionen mit hoher lokaler Diversität ermöglichen SAR-Untersuchungen.

Schema 2: Vorteile computergestützter Methoden in der Kombinatorischen Chemie

1.5 Charakterisierung festphasengebundener Verbindungen

Die Reaktionsverfolgung und Charakterisierung von Molekülen an fester Phase wird durch die Absorption des Trägermaterials im Vergleich zur herkömmlichen Synthese stark eingeschränkt. Neuentwickelte Methoden auf dem Gebiet der NMR-Spektroskopie minimieren den Einfluß der festen Phase und bieten zwischenzeitlich weitere Möglichkeiten bei der Charakterisierung immobilisierter Verbindungen [Ban99].

ATR-FT-IR-Spektroskopie: durch die Messung in abgeschwächter Totalreflektion ist die direkte Messung von Harzbeads ohne vorherige Probenpräparation möglich. Reaktionsverfolgungen und die Bestimmung ihrer Kinetik sind damit einfach möglich [Haa97] [Hub99].

FT-IR-Mikroskopie: Durch die Fixierung von Harzbeads in Kaliumbromid können einzelne Harzkugeln vermessen werden. Diese Miniaturisierung der IR-Spektroskopie kann der Reaktionsverfolgung oder dem Mapping harzgebundener Verbindungskollektionen dienen [Haa98] [Yan99] [Yan00].

Weitere IR-Methoden, wie DRIFTS-, FT-Raman- und Photoakustikspektroskopie werden ebenfalls in der Kombinatorischen Chemie verwendet [Cha97] [Gos96] [Jia99] [Rah98].

MAS-NMR-Spektroskopie: Sowohl ^1H - und ^{13}C -Kerne, als auch andere NMR-aktive Heteroatome können an fester Phase aussagekräftig charakterisiert werden [Kei96] [Llo99] [Hoc99] [Sha99]. Eine Miniaturisierung durch die Vermessung einzelner Harzkugeln ist möglich [Sar96, Pur96]. Neben der MAS-Technik wird mit Hilfe spezieller Pulsfolgen der Einfluss des polymeren Trägers auf das Spektrum minimiert.

1.6 Evaluierung von Verbindungsbibliotheken

1.6.1 Bibliothekskonzepte

Für das Screening der Aktivität können unterschiedliche Ansätze verfolgt werden. Entscheidend ist das Syntheseformat der Bibliothek. Die Herstellung von Einzelverbindungen erfordert einen hohen synthetischen Aufwand, jedoch ist die Zuordnung von Testergebnissen zu der jeweiligen Verbindung einfach möglich.

Die Herstellung von Verbindungsgemischen mit den zuvor beschriebenen Methoden erfordert einen deutlich geringeren synthetischen Aufwand, jedoch ist die Zuordnung der Testergebnisse erschwert. Außerdem ist die Verlässlichkeit durch den Test von Mischungen kritisch.

Einen Mittelweg in dieser Problematik bei harzgebundenen Verbindungsbibliotheken stellt das „Herausfischen“ einzelner Trägerteilchen, dem Test auf Aktivität und der anschließenden Bestimmung der Struktur. Damit können beide Methoden gekoppelt werden.

1.6.2 Dekonvolution von Verbindungsbibliotheken

Die Identifizierung aktiver Bibliotheksbestandteile wird mit Dekonvolutionsmethoden erzielt, um eine Zuordnung zwischen Testergebnis und Struktur zu ermöglichen.

Rekursive Dekonvolution [Erb94]

Es werden dazu iterativ Subbibliotheken hergestellt, welche definierte Bausteine besitzen, während ein Baustein variiert wird. Weitere Test führen so zu den aktivsten Bausteinen in einer Position. Anschließend werden diese Informationen

für alle anderen Positionen im Molekül durchgeführt, bis alle Verbindungen hergestellt und getestet sind.

Positional Scanning-Methode [Pin92]

Hier werden die iterativen Schritte der oben beschriebenen Methode vermieden.

Abb. 1-6 zeigt dies am Beispiel einer Trimeren Bibliothek.

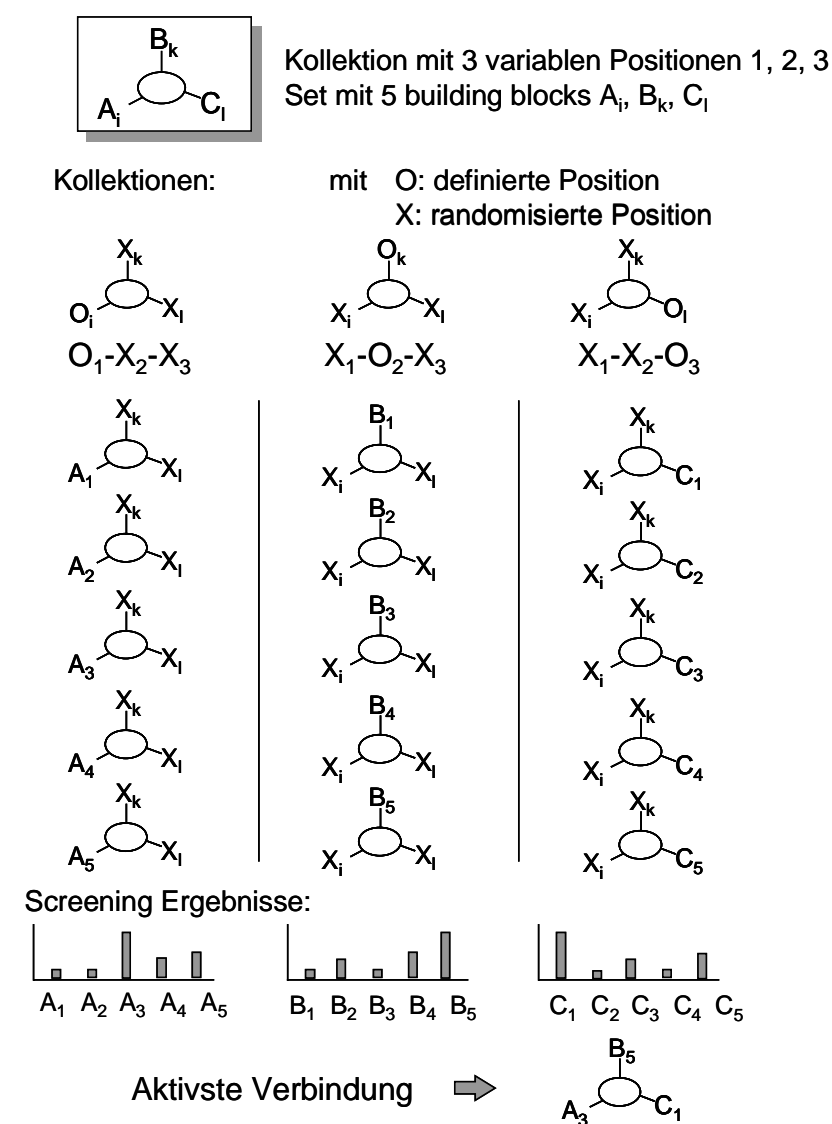


Abb. 1-6: Schema des Positional Scanning einer Trimerenbibliothek mit je 5 Bausteinen.

Es werden Teile von Sub-Bibliotheken erzeugt, bei denen eine Position definierte Bausteine enthält (O-Position), während die weiteren Positionen variiert werden (X-Positionen). In diesen Positional Libraries wird nach dem Screening die jeweils aktivste Position ermittelt. Es werden so alle Positionen abgedeckt und nach der Testung aller Bibliotheken direkt die aktivste Verbindung erhalten. Der Vorteil liegt im geringeren Syntheseaufwand, jedoch müssen bei einer nicht eindeutigen Präferenz eines Bausteins für eine Position alle Kombinationen hergestellt und getestet werden, womit sich der Vorteil dieser Methode verringert [Blo99].

1.6.3 Tagging-Methoden

Durch Tagging werden einzelne Verbindungen während der Synthese codiert. Dies soll die Strukturzuordnung in einem Bioassay harzgebundener Verbindungen anhand ihres spezifischen Codes ermöglichen.

Die Codierung kann geschehen, indem man bei einer Split-Mix-Synthese an derselben Harz-Kugel noch ein Peptid- oder Oligonucleotid-Strang [Bre92] [Ker93] aufgebaut wird. Die Tagging-Sequenz wird im Falle einer Aktivität durch Edman-Abbau (Peptid) oder PCR (Oligonucleotid) des Tags zur Decodierung verwendet. Allerdings kann die biologische Aktivität auch durch die Tags vorgetäuscht werden. Dieser Nachteil wird in einer anderen Methode, die zum Tagging einer Hexapeptid-Bibliothek polyhalogenierte Phenole einsetzt, umgangen [Ohl93]. Diese Phenole werden direkt an den freien Aminoterminus des Peptidstrangs gebunden. In jedem Syntheseschritt werden nur etwa 0,5 % des wachsenden Peptidstrangs markiert. Die Analyse erfolgt nach Abspaltung vom Harz gaschromatographisch. Alle chemischen Tagging-Methoden bedeuten einen erheblichen synthetischen Mehraufwand. Zudem müssen die Tags unter den Reaktionsbedingungen chemisch stabil sein, weshalb diese Methoden wenig Anwendung finden.

Eine effektivere Tagging-Methode hingegen ist die Radiofrequenz-verschlüsselung. Nicolaou et al. [Nic95] [Mor95] synthetisierten nach dieser Methode eine Peptid-Bibliothek aus 24 Verbindungen im Split-Mix-Verfahren. Dafür wurden Mikroreaktoren entwickelt, die aus einem programmierbaren Speicherchip, polymerem Trägermaterial für die Synthese und einer inerten, porösen Ummantelung bestehen. Zur Kodierung kann der Chip nun Radiofrequenzsignale Aufzeichnen, Speichern und Wiedergeben. Die Codierung wird dann vor jedem Reaktionsschritt durchgeführt, indem der Reaktor mit einem Radiofrequenzsignal, entsprechend der zu kuppelnden Komponente, verschlüsselt wird. Bei mehrstufigen Synthesen erhält man so für jede Verbindung ein spezifisches elektronisches Label, welches mit Hilfe eines entsprechenden Empfängers decodiert werden kann.

Eine weitere einfache Methode des Taggings geschieht mit Hilfe der Molekülmasse der harzgebundenen Verbindung [Wal99]. Eine Bibliothek wird nach dem Split-Mix-Verfahren hergestellt. Die Harzbeads werden in separate Gefäße überführt in denen ein Screening erfolgt. Ein Teil der Verbindung wird mit FT-ICR-MS untersucht. Über die sehr genau bestimmte Molmasse kann nun auf die Elementzusammensetzung und damit auf die synthetisierte Struktur zurückgeschlossen werden. Sowohl die Separation der Polymerbeads, als auch die FT-ICR-MS-Messungen können vollständig automatisiert verlaufen.

2 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden vier Gebiete bearbeitet, welche verschiedene Teilbereiche der Kombinatorischen Chemie darstellen.

a. Kombinatorische Synthese von hochsubstituierten Pyrrolidinen an fester Phase

Verbindungen, welche dieses Grundgerüst enthalten zeigen biologische Aktivitäten und finden sich in einigen Therapeutika wieder.

Ausgehend von harzgebundenen Aminosäuren, die mit Benzaldehyden zu den entsprechenden Iminen umgesetzt werden, lässt sich in einer Cycloaddition diese Vorstufe mit Maleinimiden zu Pyrrolidinen umsetzen. Eine abschliessende Mitsunobu-Alkylierung erweitert die Zahl der synthetisierbaren Verbindungen. Es wurden sowohl Einzelverbindungen als auch eine Bibliothek nach der Split-and-Combine-Methode synthetisiert und charakterisiert. Letztere konnte mittels FT-IR-Mikroskopie untersucht werden, um die statistische Verteilung der Einzelverbindungen in der Mischung zu überprüfen und um räumliche Positionen von Polymerbeads mit den darauf gebundenen Pyrrolidinen zu bestimmen.

b. Kombinatorische Synthese von modifizierten α -Hydroxy- β -aminoaldehyden

Die Herstellung von Peptidomimetika als Enzyminhibitoren in einer konvergenten Synthesestrategie stellt den Ausgangspunkt dar. Durch eine N-terminale Fixierung von Aminosäuren kann sowohl eine inverse Peptidsynthese, als auch eine C-terminale Modifizierung erfolgen. In einer zweiten parallelen Synthese können Bausteine hergestellt werden, welche dann in weiteren Schritten

mit den harzgebundenen Produkten zu potentiellen Enzyminhibitoren umgesetzt werden können.

Nach der Synthese des nicht kommerziell erhältlichen Polystyrol-Boc-Harzes als Trägermaterial konnte eine Übertragung von Reaktionssequenzen auf die feste Phase erfolgen. Das Harz mit dem Boc-Linker wird in einer vierstufigen Synthese ausgehend von PS-Brommethylharz hergestellt.

Ausgehend von Aminosäuren lassen sich in einer insgesamt neunstufigen Festphasensynthese somit α -Hydroxy- β -aminoaldehyde durch C_1 -Kettenverlängerung herstellen. Diese Synthon kann derivatisiert werden und liefert nach Umsetzung mit Sulfonylphosphonaten potentielle irreversible Enzyminhibitoren. Durch Reaktion mit primären Aminen können ebenfalls neue, durch die Flüssigphasenchemie nur sehr schwer zugängliche Verbindungskollektionen aufgebaut werden.

c. Synthese von harzgebundenen Aminoaldehyden als Synthon

Basierend auf der C-terminalen Modifikation von Aminosäuren und Peptiden soll die Herstellung von Aminoaldehyden als ein vielseitig verwendbares Synthon zur Synthese weiterer potentiell biologisch aktiver Verbindungen dienen. Die Verwendung der polymergebundenen Boc-Schutzgruppe als Linker ermöglicht die selektive Reduktion von N-terminal harzgebundenen Weinreb-Aminosäureamiden zu Aminoaldehyden. Parallel dazu hergestellte Sulfonylphosphonate dienen zum Einsatz bei der konvergenten Synthese mit der harzgebundenen Spezies, wodurch das zu Additionsreaktionen aktivierte Zentrum von Enzyminhibitoren in Form von Vinylsulfonen entsteht. In einer zweiten Schiene erfolgt die Derivatisierung der Aldehyde mittels Pictet-Spengler-Reaktion, die Verbindungen mit dem Tetrahydro- β -Carbolin-Grundgerüst ergibt. Verbindungen dieser Art finden sich in einigen Alkaloiden. Die gewonnenen Erkenntnisse der Reduktion zu Aldehyden und deren Modifikation sollen auf

Tripeptide übertragen werden. An fester Phase soll durch inverse Kupplung von Aminosäuren und Dipeptide harzgebundene Tripeptide hergestellt und zu Vinylsulfonen modifiziert werden. Diese Bausteine können dann in flüssiger Phase mit Carbonsäuren N- α -acyliert werden, um Cystein-Proteaseinhibitoren zu erhalten.

d. Single-Bead-Analytik durch FT-ICR-Massenspektrometrie von Split and Combine Bibliotheken

Die Vorteile der Bibliothekssynthese mittels der Split-Mix-Methode und die Vorteile des Screenings von Einzelverbindungen soll durch den Einsatz von FT-ICR-MS miteinander verbunden werden. Die Problematik bei der Dekonvolution von Verbindungskollektionen nach einem Screening und der hohe Aufwand bei der Einzelverbindungssynthese kann reduziert werden. Harzbeads aus Verbindungskollektionen werden in separate Gefäße vereinzelt und durch hochauflösendes FT-ICR-MS eines Bruchteils der abgespaltenen Verbindungsmenge kann so die Struktur ermittelt und dem einzelnen Vial zugeordnet werden. Die restliche Probenmenge kann anschließend einem Screening zugeführt werden. Anhand einer Verbindungskollektion wird die Handhabbarkeit dieser Methode demonstriert.

3 Ergebnisse

3.1 Kombinatorische Synthese hochsubstituierter Pyrrolidine und deren Charakterisierung durch FT-IR-Mikroskopie

3.1.1 Synthesemöglichkeiten

Verbindungen mit Prolinstruktur stellen einen in der Pharmakologie häufig vorkommenden Grundkörper dar. Hochaktive ACE-Inhibitoren wie Captopril, Enalapril (Abb. 3-1) [Huf99] oder Thrombininhibitoren leiten sich von der Prolinstruktur ab.

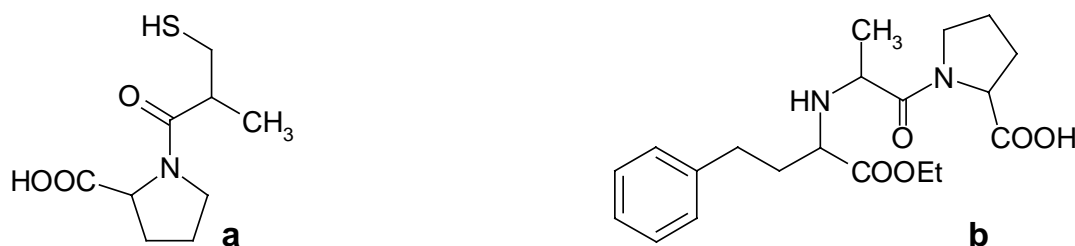


Abb. 3-1: Struktur der ACE-Inhibitoren: a. Captopril; b. Enalapril

Die Synthese von Prolinanaloga mit kombinatorischen Methoden ist deshalb einen aussichtsreicher Weg, um auf weitere biologisch aktive Derivate zu stoßen. Zur Darstellung von Pyrrolidinen stehen mehrere Synthesemöglichkeiten zur Verfügung:

- intramolekulare Cyclisierung von 4-Chloralkylaminen [Pat59]
- Hoffman-Löffler-Freytag Reaktion von N-Halogenaminen [Nor68]
- Cyclisierung von Dihalogeniden mit Cyanamiden [Nor68]
- 1,3-dipolare Cycloaddition von Azomethin-Yliden an elektronenarme Alkene [Gri80]

3.1.2 Möglichkeiten der Festphasensynthese

Die Synthese über harzgebundene Imine mit anschließender Cycloaddition ist dabei die Methode, die sich mit der Kombinatorischen Chemie am einfachsten durchführen lässt. Im Vergleich zu den anderen Synthesewegen sind die Reaktionsbedingungen zur Pyrrolidinsynthese mild, und es läßt sich eine höhere Diversität im Zielmolekül erreichen. Auch ist eine größere Anzahl an Bausteinen kommerziell erhältlich. Ferner sind Postmodifikationen entgegen den bisher beschriebenen Synthesen einfach möglich [Mac97] [Mur95].

In der vorliegenden Arbeit wird Wang-PS-Harz als polymeres Trägermaterial verwendet, da dieser Linker im Vergleich zu Tritylharz eine höhere thermische Stabilität besitzt. Aus Fmoc-geschützten Aminosäuren werden durch die Kondensation mit Benzaldehyden harzgebundene Imine erzeugt. Bei der thermischen Behandlung entstehen daraus Azomethin-Ylide, die durch ein zugesetztes Dipolarophil in einer [3+2]-Cycloaddition zum Pyrrolidin abreagieren [Gri78]. Als Dipolarophile werden ausschliesslich Maleinimide verwendet, weil die Reaktivität und damit die Reaktionsbedingungen stark von der Elektronendichte an der Mehrfachbindung abhängig sind, die durch die elektronischen Effekte der benachbarten funktionellen Gruppen beeinflusst werden. Eventuell vorhandene Substituenten am Stickstoffatom von Maleinimid sind weit genug vom reaktiven Zentrum entfernt, um keinen Einfluß auf die Cycloaddition auszuüben. Der Einsatz von unsubstituiertem Maleinimid hat den Vorteil, dass Postmodifikationen mittels Mitsunobu-Reaktion durchgeführt werden können, wodurch sich die Anzahl an synthetisierbaren Verbindungen beträchtlich steigern lässt [Mit81]. Es lassen sich bei dem gewählten Reaktionsweg damit Fmoc-Aminosäuren, Benzaldehyde, Maleinimide und Alkohole einsetzen.

Neben der Synthese von Pyrrolidinen wird in dieser Arbeit die spezielle Analytik einer harzgebundenen Bibliothek durchgeführt. Mittels der Split-and-Combine-

Methode wird eine Kollektion aus 24 unterschiedlich substituierten Pyrrolidinen hergestellt. Bei der Auswahl der Bausteine für diese Bibliothek wird darauf geachtet, dass diese IR-aktive Gruppe enthalten. Einige Milligramm der Harzmischung werden auf einem KBr-Fenster fixiert und von einem IR-Mikroskop in kleinen Schritten abgerastert. Man erhält so neben dem sichtbaren Bild auch eine IR-Aufnahme (IR-Landkarte) der polymergebundenen Verbindungskollektion. Es lassen sich so hunderte von Harzkugeln vermessen um statistische Aussagen über die Qualität der Kollektion zu machen. Zum anderen lassen sich einzelne Harzkugeln identifizieren, die eine bestimmte Verbindung tragen.

3.1.3 Mechanismus und Stereochemie der Cycloaddition bei der Pyrrolidinsynthese

Die Kondensation eines Aldehyds mit einem Aminosäureester führt zu einem Imin (Abb. 3-2). Das dabei entstehende Imin steht mit der entsprechenden dipolaren Form im Gleichgewicht, die durch die Verschiebung des Protons vom C₁-Kohlenstoffatom zum Stickstoff zustande kommt (Abb. 3-3).

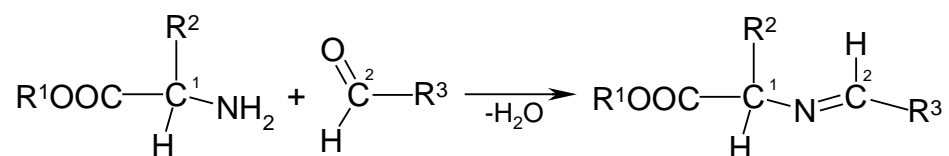


Abb. 3-2: Bildung eines Imins

Die negative Ladung ist hierbei durch die elektronenziehende Carboxygruppe stabilisiert. Bei einer Rotation um die Einfachbindung C₁-N wird sich der größtmögliche Abstand zwischen den Substituenten R¹⁻³ einstellen [Gri78].

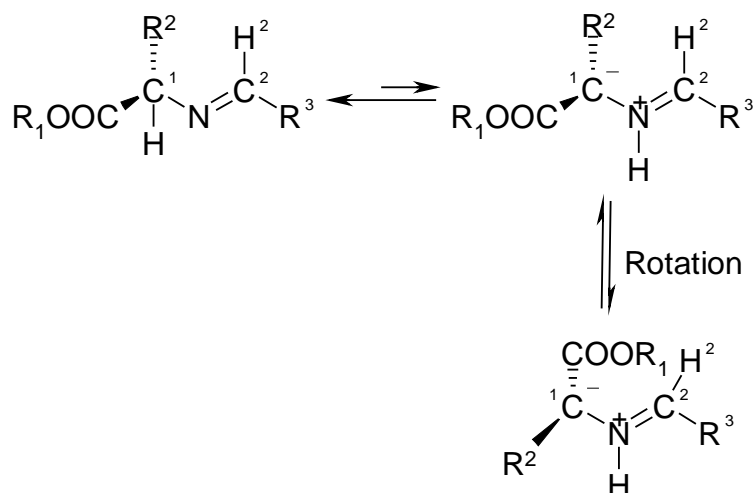


Abb. 3-3: Gleichgewicht zwischen Imin und Azomethin-Ylid

Die Zwischenstufe kann von dem zugesetzten Dipolarophil unter Bildung des Pyrrolidins abgefangen werden (Abb. 3-4).

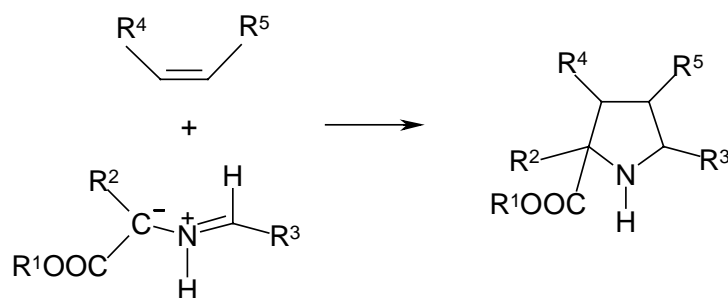


Abb. 3-4: Cycloaddition eines Azomethin-Ylides mit einem Dipolarophil

Bei der Cycloaddition kann das Dipolarophil endo- oder exo-ständig an das Azomethin-Ylid koppeln. Bei den normalerweise verwendeten Reaktionsbedingungen, die einer kinetischen Reaktionsführung entsprechen, bildet sich nur das endo-Produkt [Hof65] [Gre75], das thermodynamisch betrachtet das energiereichere Produkt ist.

3.1.4 Mechanismus der Derivatisierung der Pyrrolidingrundstruktur am Imidring

Die Modifikation des Imidrings kann durch eine der Gabriel-Synthese analoge Reaktion, Deprotonierung und Alkylierung mit Halogenalkanen, durchgeführt werden. Auch die Mitsunobu-Reaktion, bei der aliphatische Alkohole mit Triphenylphosphan und DEAD umgesetzt werden, ist prinzipiell möglich. Es wurde die zweite Möglichkeit ausgewählt, um unter schonenderen Bedingungen arbeiten zu können.

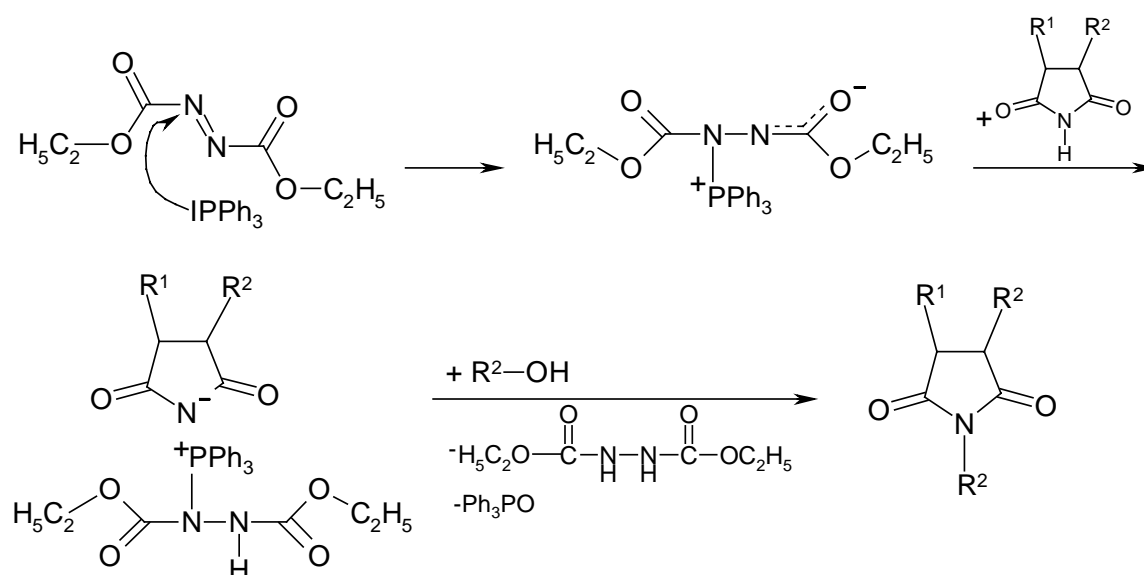


Abb. 3-5: Mechanismus der Mitsunobu-Reaktion

Im ersten Schritt greift ein Molekül Triphenylphosphan an einem Stickstoffatom des zugesetzten DEAD unter Bildung eines Phosphoniumsalzes an. Dieses bildet mit dem Imidring am Pyrrolidin ein Phosphoniumsalz, das in einer S_N2-Reaktion mit dem aliphatischen Alkohol zum N-alkylierten Produkt abreagiert (Abb. 3-5). Man kann das System Triphenylphosphan/DEAD auch als Redoxsystem ansehen: Während der Oxidation von Triphenylphosphan wird DEAD reduziert.

3.1.5 Pyrrolidinsynthese an fester Phase

3.1.5.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Ergebnisse anderer Autoren zeigten eine ungenügende thermische Belastbarkeit bei der Verwendung von PS-Trityl-Chlorid als Ankermaterial [Frü98]. Wurde eine Reaktionszeit von 4 h bei 80 °C überschritten, so traten Reinheits- und Ausbeuteverluste ein. Die Synthese wurde deshalb an dem deutlich stabileren Wang-Linker durchgeführt, der außerdem den Einsatz von Fmoc-Aminosäuren und substituierten Benzaldehyden als iminbildende Bausteine zulässt. Der Einsatz dieser Benzaldehyde anstelle von Hydroxybenzaldehyden erhöht die Zahl der verfügbaren Bausteine erheblich.

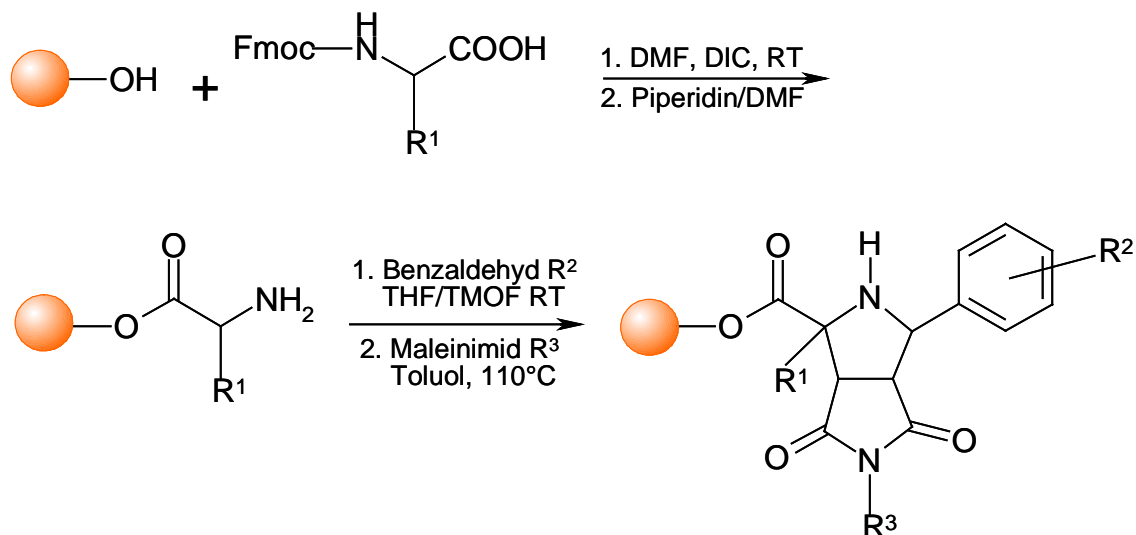


Abb. 3-6: Synthese des Pyrrolidingrundkörpers an Wang-Harz

Der erste Syntheseschritt, die Belegung des Harzes mit Aminosäure, erfolgt analog zu den Vorschriften der Peptidchemie. Das in DMF suspendierte Harz wird mit einer Lösung aus Fmoc-Aminosäure und DIC versetzt, geschüttelt und danach die Schutzgruppe mit Piperidin entfernt (

Abb. 3-6). Bei der Wahl des Lösungsmittels in der Kondensationsreaktion zum Imin erweist sich ein 1:1 Gemisch aus THF und TMOF als geeignet [Loo95]. In reinem TMOF sind die Benzaldehyde unlöslich und bei der Verwendung von reinem THF zeigt sich eine deutliche kleinere Iminabsorption im IR-Spektrum bei 1670 cm^{-1} . Die so gefundenen optimalen Reaktionsbedingungen wurden IR-spektroskopisch ermittelt.

10 eq Benzaldehyd, THF/TMOF, 16 h Reaktionszeit, Wiederholung des Imin-Bildungsschrittes.

Für die Cycloaddition fällt die Wahl des Lösungsmittels auf Toluol, das auch in der Flüssigphasenchemie bei der Cycloaddition zur Anwendung kommt [Gri88] [Bro96]. Polare Lösungsmittel sind ungeeignet, weil sie die Azomethin-Ylid-Zwischenstufe solvatisieren und somit die Reaktivität gegenüber dem Dipolarophil herabsetzen.

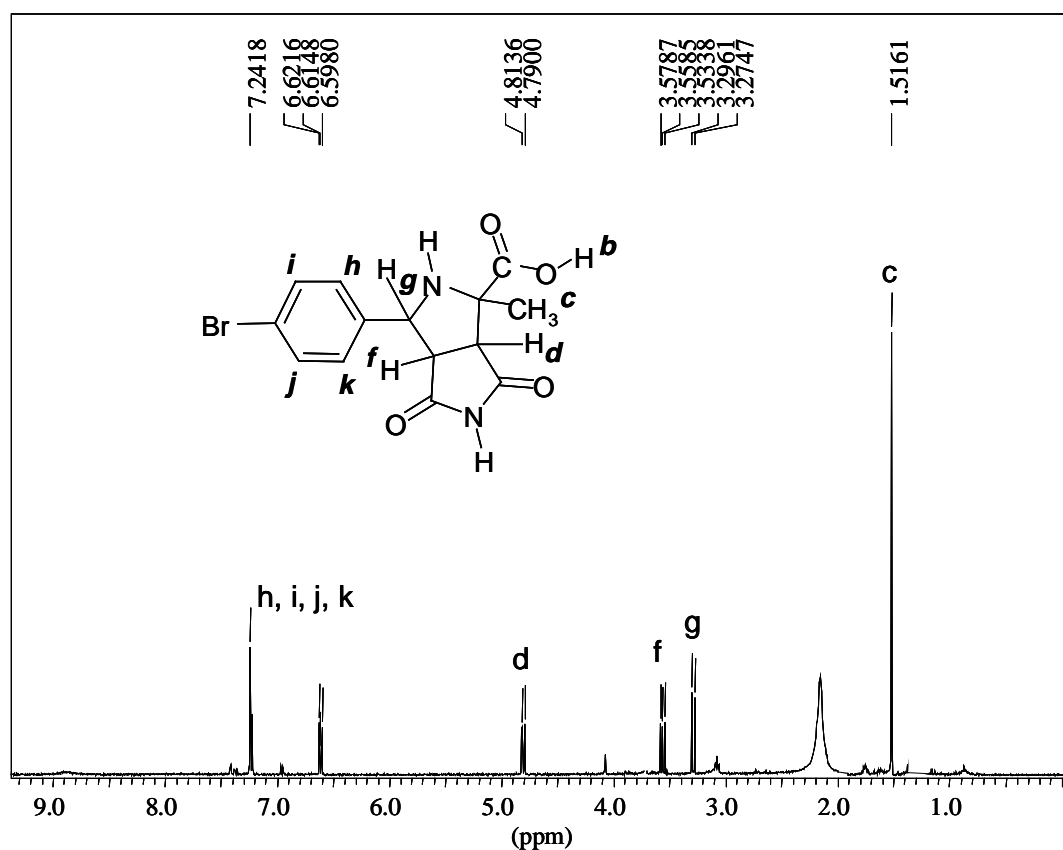
Die optimalen Bedingungen für diesen Schritt liegen bei:

24 h Reaktionsdauer, 110 °C Reaktionstemperatur und 12 eq Maleinimid. Diese Optimierungsversuche wurden mit Alanin, 4-Brom-Benzaldehyd und Maleinimid durchgeführt. Die HPLC-Reinheit der Produkte lag dabei bei 82 % (214 nm).

Vor der NMR-spektroskopischen Charakterisierung erfolgt eine Aufreinigung dieses Pyrrolidins mittels präparativer HPLC (Abb. 3-7, Tab. 3-1). Ein Vergleich der Kopplungskonstanten der Protonen f und g mit Literaturdaten ergibt, dass es sich um das endo-Produkt der Cycloaddition handelt [Gri78], Signale der Protonen an den Stickstoffatomen sind nicht sichtbar. Eine Aussage über die Konfiguration an allen C-Atomen ist nicht möglich. Das ESI-MS zeigt die für eine Bromverbindung erwartete Isotopenaufspaltung des Molekülionenpeaks (Abb. 3-8).

Tab. 3-1: $^1\text{H-NMR}$ -Daten (Strukturformel: Abb. 3-7)

H-Atom	Anzahl der H-Atome	chem. Verschiebung (ppm)	Kopplung (Hz)
a	1	6,62 d	
c	3	1,51 s	
d	1	4,79 d	8,5
e	1	8,87 s	
f	1	3,55 d	8,5
g	1	3,29 d	8,5
h, i, j, k	4	6,59-7,24 m	

Abb. 3-7: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Pyrrolidins (Acetonitril- ^2H , 400 MHz)

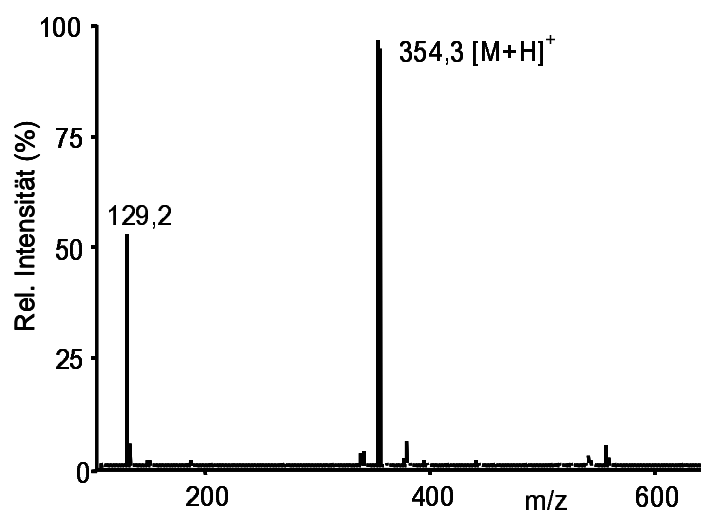


Abb. 3-8: ESI-MS eines Pyrrolidins (Struktur siehe Abb. 3.7)

3.1.5.2 Variation der eingesetzten Synthesebausteine

Um die Übertragbarkeit der optimierten Reaktionsbedingungen auf die Herstellung weiterer Pyrrolidine zu untersuchen, werden die drei Synthesebausteine variiert, um einen Eindruck über den Einfluß unterschiedlicher Substituenten auf die Produktreinheit zu gewinnen.

a. Variation der Aminosäure

Es werden 2-Brom-Benzaldehyd und Maleinimid sowie fünf verschiedene Aminosäuren verwendet.

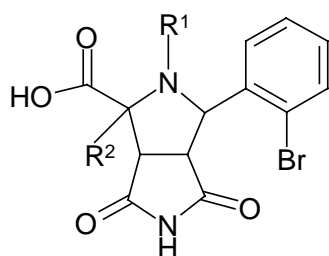


Abb. 3-9: Scaffold bei der Variation der Aminosäuren ($R^1 = \text{H}$ bzw. CH_3 ; $R^2 =$ Aminosäurerest)

Tab. 3-2: Verwendete Aminosäuren, erzielte HPLC-Reinheiten (%; 214 nm) und Molekülmasse der Produkte.

Aminosäure R^2	Produktreinheit	Masse $[M+H^+]$
Alanin	82	354,17
Phenylalanin	84	430,27
Sarcosin	83	354,17
Tryptophan	82	469,31
Valin	79	382,23

b. Variation der Benzaldehyde

Es werden 12 Pyrrolidine als Einzelverbindungen hergestellt, mit Alanin (A) und Phenylalanin (B) als Aminosäurekomponenten und Maleinimid als Dipolarophil sowie 6 Benzaldehyden.

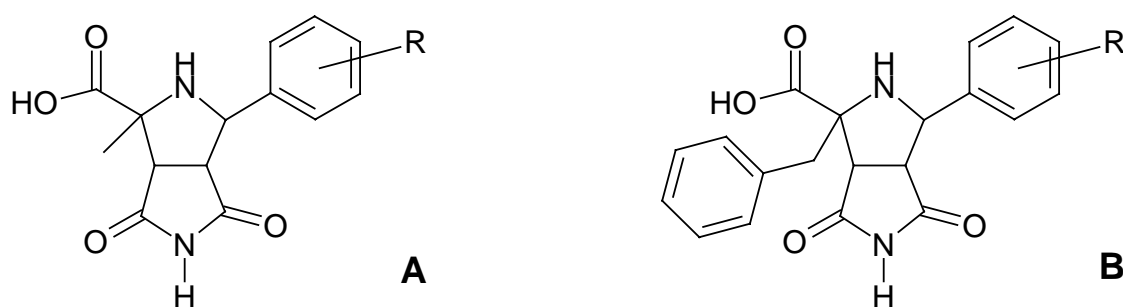


Abb. 3-10: Scaffolds bei der Benzaldehydvariation

Tab. 3-3: Verwendete Benzaldehyde (BA), erzielte HPLC-Reinheiten (% , 214 nm) und Molmassen der Produkte.

Benzaldehyd R	Produktreinheit Scaffold A (%)	Masse [M+H⁺]	Produktreinheit Scaffold B (%)	Masse [M+H⁺]
4-Brom-BA	82	354,17	84	430,27
2,4-Dimethoxy-BA	82	335,33	83	411,43
4-Nitro-BA	76	320,28	75	383,36
2-Cyano-BA	77	300,29	78	361,36
2-Chlor-BA	81	309,72	80	385,82
2,5-Dimethyl-BA	83	303,33	84	379,43

Zusätzlich wird ein Pyrrolidin aus Leucin, 2,5-Dimethyl-Benzaldehyd und N-Ethyl-Maleinimid hergestellt und mit hochauflösendem FT-ICR-MS vermessen. Abb. 3-11 zeigt das Spektrum der Verbindung, in dem neben der Molekülmasse auch ein Fragment zu beobachten ist, welches der Molekülmasse abzüglich der formalen Abspaltung von CO₂ und H₂ entspricht. Erklärbar wäre dieses Fragment mit der Abspaltung der Säurefunktion und der Ausbildung einer Doppelbindung zwischen dem Pyrrolidinstickstoff und dem C-Atom welches den Aminosäurerest trägt. Zusätzlich sind noch jeweils die Massen der ersten Kohlenstoffisotopen zu beobachten. Aus dem Massenpeak 373,209238 des FT-ICR-MS ergibt sich die Summenformel C₂₁H₂₈N₂O₄ für dieses Pyrrolidin. Dies entspricht genau der theoretisch vorhergesagten Summenformel.

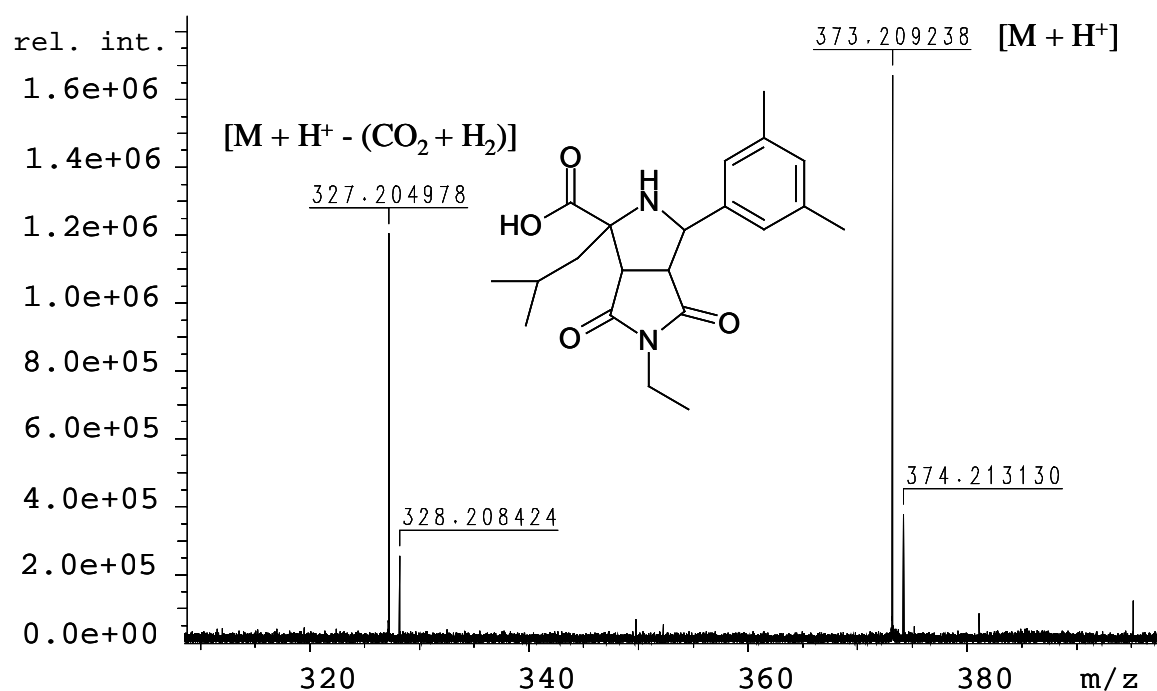


Abb. 3-11: FT-ICR-MS des Pyrrolidins hergestellt aus Leucin, 2,5-Dimethyl-Benzaldehyd und N-Ethyl-Maleinimid. ([M+H]⁺ theor.: 373,208923)

c. Variation der Maleinimide

Bei der Variation der Maleinimide wird Phenylalanin und 2,5-Dimethylbenzaldehyd eingesetzt. Ein Einfluß der Substituenten auf die Produktreinheit ist nicht zu beobachten, was darauf schliessen lässt, dass sich die Substituenten im Dipolarophil weit genug vom reaktiven Zentrum entfernt befinden.

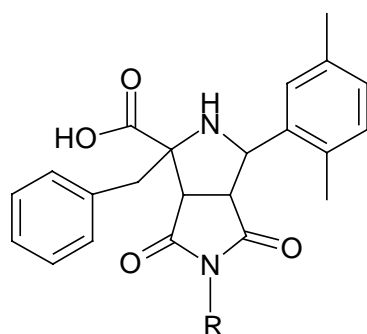


Abb. 3-12: Scaffold bei der Variation der Maleinimide

Tab. 3-4: Verwendete Maleinimide, erzielte HPLC-Reinheiten (%; 214 nm) und Molmassen der Produkte.

Maleinimid R	Produktreinheit (%)	Masse [M+H⁺]
N-(4-Methoxyphenyl)-	81	485,56
N-(2-Nitrophenyl)-	80	500,53
N-(4-Fluorphenyl)-	79	473,53
N-(p-Tolyl)-	78	508,61
N-(4-Brom-2-Chlorphenyl)-	77	571,68
N-Anilino-	82	470,55
N-(1-Naphtyl)-	81	505,59
N-(3-Chloro-para-Toluol)-	76	504,00

Bei der Variation der Aminosäuren und Maleinimide liegen die HPLC-Reinheitsunterschiede in einem Bereich, der durch die unterschiedlichen chromophoren Gruppen in den einzelnen Molekülen und den Toleranzen in der verwendeten Meßmethode bestimmt ist.

Einzig bei Verwendung verschiedener Benzaldehydbausteine ist eine Tendenz zu geringeren Reinheiten festzustellen, wenn stark ziehende Substituenten am Phenylring sitzen. Nitro- oder Cyanogruppen verringern die Elektronendichte im aromatischen Ring und setzen damit die Reaktivität der Aldehydfunktion bei der Iminbildung herab.

3.1.5.3 Modifikation des Grundkörpers durch Mitsunobu-Reaktion

Die Diversitätserweiterung durch Modifizierung des Grundgerüsts mittels eines weiteren Bausteines wird untersucht, wobei als Ausgangsverbindung ein Pyrrolidin aus Alanin, 2-Brombenzaldehyd und Maleinimid synthetisiert und als Testverbindung für die Optimierung der Reaktionsbedingungen dient.

Es zeigt sich, dass die literaturbekannten Bedingungen [Mit81] dieser Reaktion kaum modifiziert werden müssen. Dem in THF gequollenen Harz werden 5 eq Triphenylphosphan, 6 eq des entsprechenden Alkohols und 5 eq DEAD zugesetzt und die Reaktion nach 5 h abgebrochen.

Die Verwendung anderer Azaverbindungen anstelle von DEAD bringt keine Verbesserung, jedoch erhöht sich die Reinheit der Produkte um ca. 10 Prozent bei striktem Wasserausschluss durch den Zusatz von Molsieb zu dem zuvor im Vakuum getrockneten Harz und bei Verwendung von absolutem THF. Mittels ESI-Massenspektrometrie und HPLC werden die derivatisierten Grundkörper charakterisiert (Tab. 3-5).

Insgesamt lässt sich mit dieser Modifikationsreaktion unter milden Bedingungen ein weiterer Substituent in das Pyrrolidingrundgerüst einführen. Die dabei erzielten Reinheiten der Rohprodukte liegen zwischen 69 und 81 Prozent.

Tab. 3-5: Erzielte Rohproduktreinheiten (% , 214 nm) und Molmassen bei der Mitsunobu-Reaktion

Alkohol R	Reinheit	Masse [M+H⁺]
2-Chlorbenzylalkohol	74	478,55
3-Nitrobenzylalkohol	81	489,30
Isopropylidenglycin	76	553,85
9-Fluorenylmethanol	75	532,18
Epoxypropanol	74	494,02
N-Methyl-4-hydroxypiperidin	69	535,15
Methanol	73	452,69
4-Isopropylbenzylalkohol	69	516,12
3-Pyridylmethanol	71	529,55
2-Methylpropenol	68	492,87
Norbornylmethanol	79	546,81
1-Indanol	73	554,87
Piperonylmethanol	80	573,45
4-Carbonsäuremethylesterbenzylalkohol	81	587,94

3.1.6 Charakterisierung einer Split-Mix-Pyrrolidin-Kollektion mittels FT-IR-Mikroskopie

Die zunehmende Automatisierung und die damit verbundene erhöhte Synthesekapazität in der Kombinatorischen Chemie an fester Phase drängt zur Entwicklung neuer Analytikmethoden bei trägerfixierten Verbindungen.

Einen Ansatzpunkt dafür bildet die IR-Mikroskopie, die eine hochempfindliche Methode darstellt, welche in der Lage ist, Informationen aus einzelnen Harzbeads zu generieren. Durch den Einsatz dieser Mikroskopieart in Kombination mit einem rechnergesteuerten, schrittmotorbetriebenen Objektträgertisch können so in kurzer Zeit beliebig viele Harzkugeln in Transmission vermessen werden. Die daraus erhaltenen IR-Spektren werden in Korrelation mit dem sichtbaren Bild gebracht.

3.1.6.1 Synthese der Pyrrolidin-Kollektion

Für IR-spektroskopische Untersuchung wird eine Verbindungskollektion aus 24 verschieden substituierten Pyrrolidinen hergestellt. Der in Abschnitt 3.1.5 gezeigte Weg zu Einzelverbindungen kann für die Synthese dieser Split-Mix-Kollektion verwendet werden [Fur88] [Fur91]. Ausgehend von Wang-PS-Harz und zwei verschiedenen Aminosäuren werden durch die Kombination mit vier unterschiedlichen Benzaldehyden acht Imine erzeugt, die anschliessend mit drei verschieden substituierten Maleinimiden den Bedingungen der Cycloaddition unterworfen werden. Vor jedem Reaktionsschritt wird das Harz aliquotiert und danach wieder gemischt (Abb. 3-13).

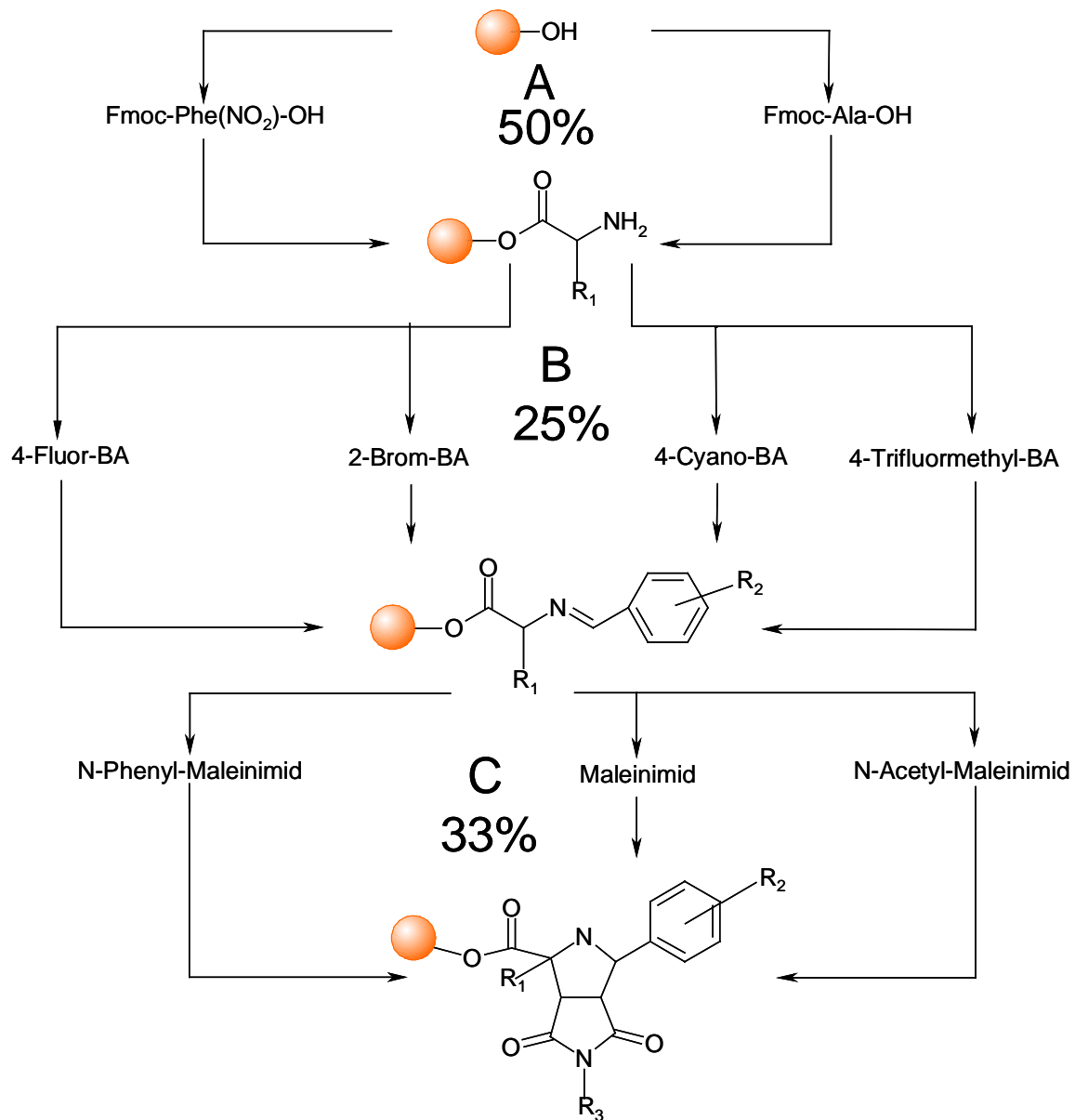


Abb. 3-13: Split-and-Combine-Syntheseschema zur Erzeugung einer 24-Komponenten Pyrrolidin-Bibliothek. A: Das Harz wird aliquotiert, mit zwei Aminosäuren gekuppelt und wieder vermischt. **B:** Nach der Aliquotierung erfolgt die Umsetzung zum Imin mit vier verschiedenen Benzaldehyden und die anschließende Vermischung des Harzes. **C:** Aliquotierung und darauffolgende Cycladdition mit drei verschiedenen substituierten Maleinimiden.

3.1.6.2 Charakterisierung der Verbindungskollektion

Die Kollektion aus 24 Pyrrolidinen wird mittels ESI-MS untersucht. Diese Methode erlaubt nur eine grobe Abschätzung der Bibliotheksqualität, da aufgrund der unterschiedlichen Ionisierungswahrscheinlichkeiten verschieden große Peakhöhen und -flächen im Spektrum zu sehen sind. Es lässt sich also keine Aussage darüber machen, ob die Produkte in der theoretisch geforderten Äquimolarität vorliegen. Dies gilt auch für den Einsatz von HPLC-MS [Haa98], da unterschiedliche UV-Absorptionen der Verbindungen eine Qualitätsaussage verfälschen.

Es wird deshalb mittels der IR-Mikroskopie ein Weg gewählt um diese Problematik zu umgehen. Die von Yan et al. beschriebene IR-Mikroskopie einzelner Harzbeads bietet die Möglichkeit einzelne Harzkugeln zu vermessen [Yan95] [Yan96] [Swa97]. Durch die Kombination dieser Methode mit einem rechnergesteuerten Objektträgertischs ist man in der Lage mehrere hundert Kugeln orts aufgelöst nacheinander zu vermessen [Haa98] [Ban99]. Hierzu wird eine Harzprobe der Pyrrolidinbibliothek auf einem KBr-Fenster aufgebracht und in das Material hineingepresst, so dass die Kugeln dort leicht abgeflacht und fixiert vorliegen. Ausschnitte der präparierten Monolage an Harzkugeln werden anschliessend in 40 μm -Schritten (Aperturgröße: 40 * 40 μm , 10 Scans je Spektrum, Auflösung 2 Wellenzahlen) automatisch abgerastert. Die zusätzlich aufgenommenen Bilder im sichtbaren Bereich werden mit den erstellten „IR-Landkarten“ korreliert. Eine Visualisierung der Spektren bei 1942 cm^{-1} zeigt dabei alle in einem Ausschnitt enthaltenen Polymerkugeln, da es sich dabei um eine Absorption des Trägermaterials handelt. Abb. 3-14 zeigt einen Ausschnitt des sichtbaren Bildes aus Abb. 3-15. Darin sind mehrere Polymerkugeln zu sehen, über die die IR-Absorption des Trägermaterials in Form von Höhenlinien darübergerlegt wurde.

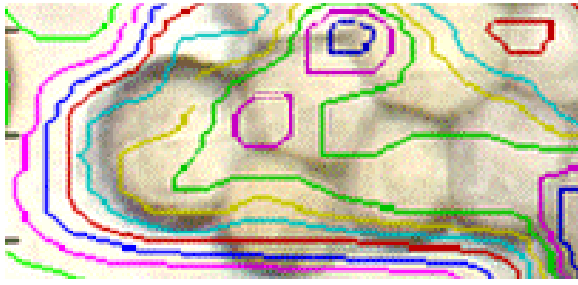


Abb. 3-14: Superposition des lichtmikroskopischen Bildes und der IR-Polymerabsorption bei 1942 cm^{-1} von Harzkugeln der Pyrrolidinbibliothek; Ausschnitt des lichtmikroskopischen Bildes von Abb. 3-15. Zusätzlich ist links noch ein Stück KBr-Fenster erkennbar, um eine verbesserte Darstellung des Höhenlinienverlaufs zu zeigen.

Neben der deutlichen Abgrenzung zum KBr-Fenster links und unten ist auch die Grenze von Kugeln anhand der Höhenlinien erkennbar.

Durch die Wahl unterschiedlicher Absorptionen, die den in der Bibliothek vorhandenen IR-aktiven Gruppen angepasst sind, können so Bibliotheksabschnitte untersucht werden.

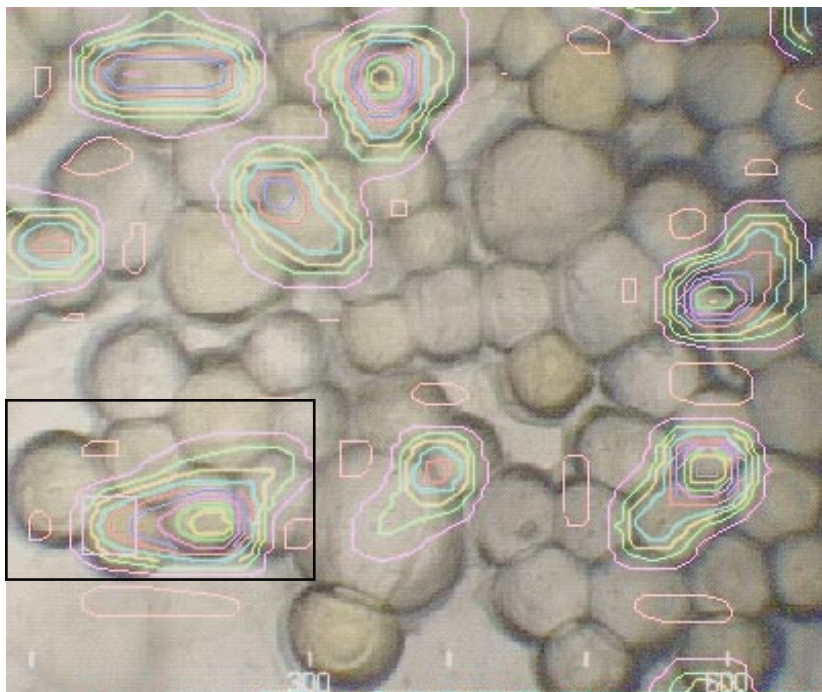


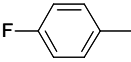
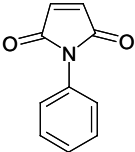
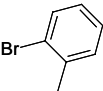
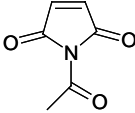
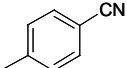
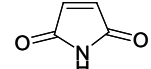
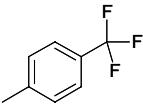
Abb. 3-15: Bildausschnitt einer Superposition des lichtmikroskopischen Bildes und der Cyanoabsorption bei 2225 cm^{-1} . Der schwarze Rahmen zeigt die Lage des sichtbaren Bildausschnitts in Abb. 3-14.

Über die Gesamtzahl an Harzkugeln und der ermittelten Zahl bei einer bestimmten Wellenzahl absorbierender Beads kann eine Qualitätsuntersuchung der Kollektion erfolgen.

Aus Abb. 3-13 läßt sich dabei der Anteil jeder einzelnen funktionellen Gruppe entnehmen. Abb. 3-15 zeigt exemplarisch die Superposition beider Bilder bei der Absorptionswellenlänge der Cyano-Gruppe (2225 cm^{-1}). Deutlich erkennbar sind die Harzkugeln, welche eine Cyanoabsorption zeigen. Die Vermessung von insgesamt 286 Harzkugeln und die Auswertung der IR-Karten bei allen Wellenzahlen der funktionellen Gruppen dient als Datenbasis zur Erstellung von Tab. 3-6.

Ein Problem bei der Analytik harzgebundener Verbindungen, die starke IR-Absorption des polymeren Trägermaterials, zeigt sich bei der Unterscheidung von brom- und fluorsubstituierten Benzaldehyden. Nur die Anzahl der „fluorsubstituierten“ Kugeln kann ermittelt werden, während die Zahl der „bromsubstituierten“ Kugeln mit Hilfe des Ausschlussprinzips ermittelt wird. Die charakteristische Absorption dieses Benzaldehyds fiel mit der des Trägermaterials zusammen.

Tab. 3-6: Statistische Verteilung der Harzkugeln bezüglich ihrer IR-aktiven Substituenten. Die experimentell ermittelten Werte sind in eckiger Klammer als Prozentangaben dargestellt.

funktionelle Gruppe Anzahl [%]; (theor.)	funktionelle Gruppe Anzahl [%]; (theor.)	funktionelle Gruppe Anzahl [%]; (theor.)
Rest R₁	Rest R₂	Rest R₃
-NO₂ [55%]; (50%)	 [24%]; (25%)	 [35%]; (33%)
-CH₃ [45%]; (50%)	 [22%]; (25%)	 [31%]; (33%)
	 [26%]; (25%)	 [33%]; (33%)
	 [28%]; (25%)	

Die experimentellen Werte (Tab. 3-6) liegen im Rahmen der Messgenauigkeit mit der die Kugeln erfasst werden können. Mit diesem Verfahren lassen sich Bibliotheken zerstörungsfrei und orts aufgelöst untersuchen.

Der zweite Nutzen dieser Analytikmethode liegt im Auffinden von Harzkugeln mit definierten Einzelverbindungen. Durch die Superposition verschiedener IR-Karten mit unterschiedlichen IR-Absorptionen, lassen sich Beads finden, die eine definierte Verbindung tragen [Haa98]. Das Herauslösen solcher Beads aus der KBr-Matrix und das Abspalten von einzelnen Kugeln kann eine Möglichkeit zur Miniaturisierung von Synthese und Analytik in der Kombinatorischen Chemie an fester Phase bieten.

3.1.7 Zusammenfassung

Es wird die Herstellung mehrfach substituierter Pyrrolidine am polymeren Träger mittels kombinatorischer Methoden gezeigt. Die Umsetzung harzgebundener Aminosäuren mit Aldehyden führt zu Iminen, die dann in einer Cycloaddition mit Maleinimiden umgesetzt werden. Das dazu ausgearbeitete Syntheseprotokoll erlaubt die Herstellung dieser biologisch aktiven Verbindungsklasse in guter Reinheit und mit parallelen Ansätzen.

Das so synthetisierte Grundgerüst kann mit der unter milden Bedingungen verlaufende Mitsunobu-Reaktion durch Einführung eines weiteren Substituenten derivatisiert werden. Hierzu wird unter milden Bedingungen ein aliphatischer Alkohol mit der harzgebundenen Verbindung umgesetzt. Diese Derivatisierungsreaktion verläuft mit guter Reinheit.

Neben der Synthese von Einzelverbindungen wird der Einsatz des Syntheseprotokolls bei der Herstellung von Kollektionen mittels Split-and-Combine-Verfahren gezeigt und eine kleine Kollektion mit 24 Verbindungen synthetisiert. Es werden Bausteine eingesetzt, welche mittels IR-Spektroskopie gut identifizierbar sind.

Die Charakterisierung erfolgt erstens mittels ESI-MS einer abgespaltenen Probe der Bibliothek. Als zweite Methode wird die trägergebundene Kollektion durch ortsaufgelöste IR-Mikroskopie untersucht. Es wird eine Vielzahl an Harzkugeln vermessen, um damit eine „IR-Landkarte“ zu erstellen. Damit ist es möglich Aussagen über die Qualität der Kollektion zu treffen. Es zeigen sich dabei keine gravierenden Abweichungen in der prozentualen Verteilung der Bibliothekskomponenten. Die prinzipielle Verwendung dieser ortsaufgelösten Methode ist für die schnelle Analyse sehr vieler Harzbeads in kurzer Zeiteinheit eine wichtige und interessante Methode. Von Nachteil ist jedoch, daß immer IR-aktive Gruppen vorhanden sein müssen, womit die Auswahl der Synthesebausteine eingeschränkt ist.

Ohne ein Verfahren zur Fixierung der Harzkugeln ist die Methode kritisch. Fehlt dadurch ein leichtes Abflachen der Kugeln kann durch die sonst zu große Schichtdicke des polymeren Trägermaterials und die daraus resultierende große Absorption keine IR-Information mehr gewonnen werden. Beim Versuch der Verwendung von polymerem Trägermaterial mit kleinerem Durchmesser stößt man an die Grenzen der IR-Auflösung, welche durch die Wellenlänge des IR-Lichts gegeben ist. Zudem erreicht man die Empfindlichkeitsgrenze dieser Spektroskopiemethode.

3.2 Kombinatorische Synthese modifizierter α -Hydroxy- β -aminoaldehyde

3.2.1 Peptidomimetische Enzyminhibitoren

Die Synthese und der Test von Peptidbibliotheken zur Verwendung in der Leitstruktursuche neuer Liganden für Rezeptoren oder Enzyme ist ein vielfach beschriebener Weg Strukturinformationen zu erhalten. Diese Kollektionen sind durch die Festphasenpeptidsynthese einfach zugänglich und ihre Bedeutung ist bei vielen physiologischen Mechanismen bekannt [Jun92]. Jedoch hat die direkte Verwendung von Peptiden als Medikament einige Nachteile [Gia93] [Gan94]. Ansätze in dieser Richtung gehen dazu über peptidomimetische Strukturen zu erzeugen. Die Synthese und Verwendung von Peptidomimetika als Therapeutika hat gegenüber Peptiden Vorteile zu bieten:

- höhere metabolische Stabilität im Magen-Darm-Trakt und im Serum
- bessere Resorption bei oraler Einnahme durch eine geringere Molmasse
- verlangsamte Ausscheidung aus dem Körper
- Nebenwirkungen an verschiedenen Rezeptoren werden durch konformative Einschränkungen in der Struktur minimiert.

Auf der Grundlage des Mechanismus, des aktiven Zentrums und der Röntgenstruktur von Enzymen oder Enzym-Inhibitor-Komplexen können aktive Protease-Hemmer gefunden werden [Mcg98]. Generell wird versucht Peptidstrukturen abzuwandeln und zu modifizieren. Es bieten sich folgende Möglichkeiten an:

- Verwendung unnatürlicher Aminosäuren
- Stabilisierung der Konformation in Templaten mit spezieller Sekundärstruktur
- Präsentation von Seitenketten in einer räumlich definierten Anordnung
- Modifikation des Peptid-Backbones.

Die Veränderung des Peptid-Rückgrates durch Ersatz der Amidbindung oder durch eine nichtspaltbare isostere Gruppe bewirkt eine Verbesserung der Stabilität gegenüber Proteasen und verzögert somit den metabolischen Abbau der Struktur [Bia99]. Die isostere Gruppe ahmt die Geometrie des tetraedrigen Übergangszustandes der Proteolyse nach und kann dadurch eine starke Wechselwirkung mit dem Enzym eingehen [Wes95]. Solche isosteren Strukturen als zentrales Element wurden bei der Suche nach neuen Inhibitoren mit kombinatorischen Ansätzen zur Synthese von Peptidomimetika verwendet [Dol96] [And96]. Aspartyl-Protease-Inhibitoren wurden mit Hydroxyethylamin- oder Diaminoalkohol-Struktur beschrieben [Kic95]. Die Herstellung und Verwendung irreversibler Inhibitoren mit Vinylsulfon-Grundkörper konnte von Olson et al. [Ols98] gezeigt werden. Ebenso besitzen Peptidylphosphonate inhibitorische Eigenschaften gegenüber Metalloproteasen [Bas95].

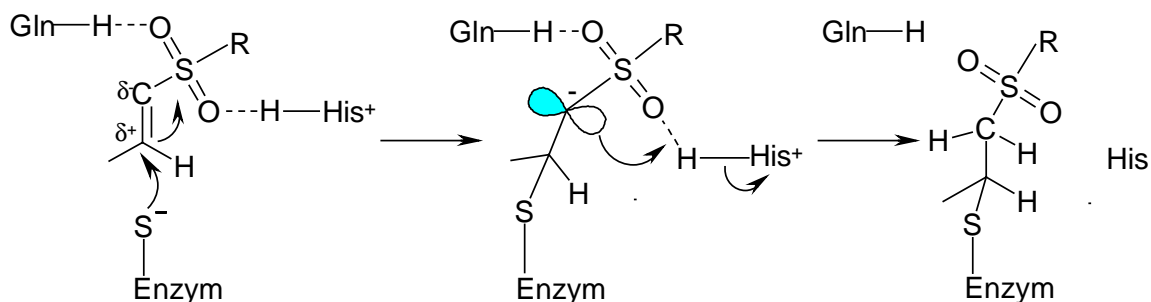


Abb. 3-16: Ablauf der Michael-Addition eines Vinylsulfons an eine Cysteinseitenkette in einem Enzym. Das Substrat wird irreversibel gebunden.

Abb. 3-16 zeigt die Michael-Addition eines Vinylsulfones an eine Cystein-Seitenkette in einem Enzym. Durch die entstehende kovalente chemische Bindung ist das Substrat irreversibel gebunden. Die Addition wird durch eine Wasserstoffbrücke eines Glutaminrestes mit der Sulfongruppe und einer protonierten Histidineinheit aus dem Enzym beschleunigt.

3.2.2 Synthesestrategie zur Herstellung von α -Hydroxy- β -amino-Aldehyden

Die Erzeugung der meisten der oben beschriebenen Bibliotheken erfolgt nach der gleichen Strategie. Entweder werden die Verbindungen zeitaufwendig über mehrere Synthesestufen in Lösung hergestellt oder das isostere Gerüst wird zuerst als Grundbaustein in Lösung erzeugt und anschliessend als Baustein in der Festphasenpeptidchemie verwendet, bzw. an fester Phase immobilisiert und anschließend modifiziert. Der Vorteil dieser zweiten Methode liegt in der einfachen und schnellen Durchführung. Allerdings schränkt das Verbindungsglied zwischen Isooster und Peptid die Möglichkeiten ein. Für eine Variation dieser Stelle muss die Synthese in Lösung des Zentralbausteins mehrfach durchgeführt werden.

Nachteilig können sich Funktionalgruppen-Transformationsreaktionen auswirken, die ca. 70 % aller Reaktionsschritte in der organischen Chemie darstellen [Smi94]. Es wird dabei keine neue Diversität in die Struktur eingeführt, sondern diese wird nur modifiziert. Schritte dieser Art verringern die Produktreinheit. Die Verwendung und die Übertragung solcher Reaktionen auf die feste Phase stellt eine synthetische Herausforderung dar. Zudem kann damit das chemische Repertoire des Festphasenchemikers erweitert werden.

Ausgehend von N-terminal gebundenen Aminosäuren sollen über einen Syntheseweg, der eine C₁-Kettenverlängerung beinhaltet, α -Hydroxy- β -Aminoaldehyde hergestellt werden. Diese lassen sich an der festen Phase zu Vinylsulfonen oder Aminoalkoholen umsetzen. Am Ende der Synthese werden dann geschützte peptidomimetische Bausteine vom Trägermaterial abgespalten.

3.2.3 C₁-Kettenverlängerung - Thiazol als maskierte Aldehydfunktion

Eine klassische Methode zur C₁-Kettenverlängerung stellt die Cyanhydrin-Reaktion dar [Smi95]. Hierbei wird eine Z-geschützte Aminosäure in das entsprechende Weinreb-Amid überführt und anschliessend zum Aminoaldehyd reduziert (Abb. 3-17). Es folgt eine Umsetzung mit KCN zum Cyanhydrin und Hydrolyse zum Aminosäurehydroxymethylester, welcher im letzten Schritt mit LiOH zur freien Säure verseift wird. Dieser Hydrolyseschritt verläuft unter drastischen Bedingungen. Diese sind mit der Vorgabe von milden Abspaltungsbedingungen der Endprodukte nicht vereinbar.

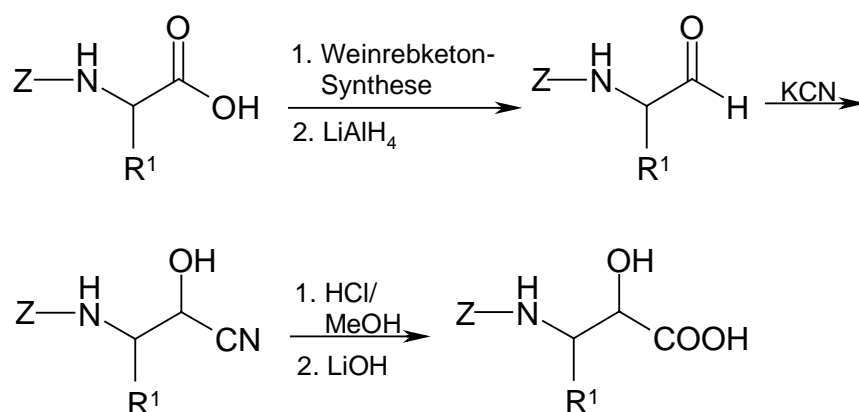


Abb. 3-17: Cyanhydrin-Reaktion zur C₁-Kettenverlängerung von Aminosäuren

Die Wahl der Kettenverlängerungsreaktion fällt deshalb auf die von Dondoni et al. [Don90] [Don93] in flüssiger Phase gezeigten Synthesemethode, bei der ein während der Reaktion eingeführter Thiazolylrest als maskierte Aldehydfunktion dient. Diese Strategie wird erfolgreich zur Synthese von Peptidomimetika mit Hydroxyethylaminstruktur eingesetzt [Par94] [Don95] [Tou93].

Beschrieben ist die Synthese über zwei Wege (Abb. 3-18):

- Boc-Aminoaldehyde werden mit 2-Trimethylsilyl-thiazol umgesetzt
- Boc-Amino-Weinreb-Amide werden zuerst mit Lithiumthiazol und dann mit NaBH₄ behandelt

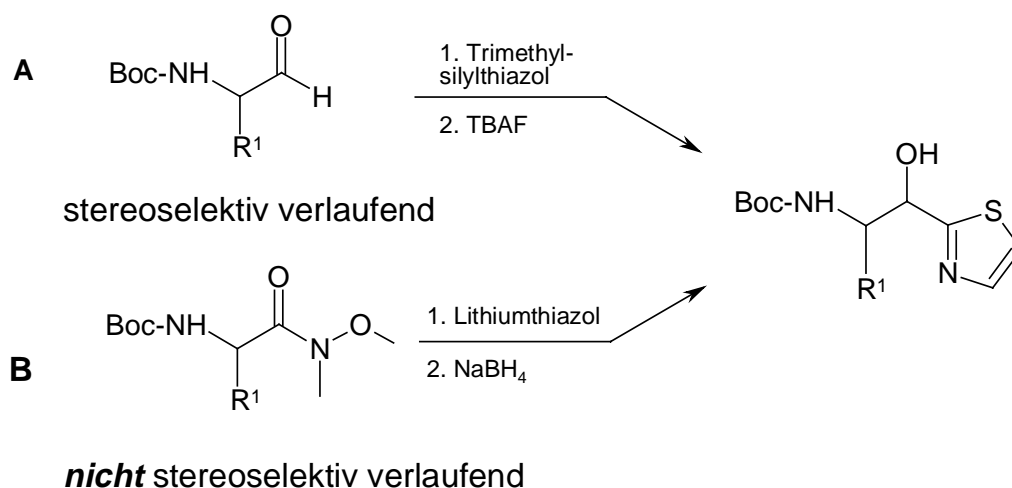


Abb. 3-18: C₁-Kettenverlängerung nach Dondoni. Die obere Methode mit 2-TST verläuft stereoselektiv, die untere Route ergibt ein racemisches Gemisch des Alkohols.

Man erhält jeweils die entsprechenden Amino-Hydroxy-Thiazol-Verbindungen, jedoch handelt es sich nur bei **A** um eine stereoselektiv verlaufende Synthese [Don95a]. Untersuchungen des Mechanismus von Dondoni et al. [Don93a] zeigten, dass am Reaktionsweg **A** mit 2-Trimethylsilylthiazol zwei Aldehydgruppen miteinander interagieren, und deshalb die Synthese stereoselektiv verläuft.

Darin liegt der Grund für die Verwendung des nicht-stereoselektiv verlaufenden Weges **B** für die Synthese an der festen Phase liegt. Selbst bei hoher Beladung liegen reaktive Gruppen im Polymer fast immer isoliert vor. Dadurch kann es nicht zu der hier gewünschten Wechselwirkung zwischen zwei Aldehydfunktionen kommen.

Im nächsten Schritt wird die Hydroxyfunktion mit *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid geschützt (Abb. 3-19), worauf sich die dreistufige Abbaureaktion des Thiazols zum Aldehyd anschließt. Durch Methylierung des Stickstoffs mit Trifluormethansulfonsäuremethylester wird eine N-Methylthiazolinium-Zwischenstufe erzeugt. Dieses Intermediat wird im zweiten Schritt mittels NaBH₄ vollständig zum N-Methylthiazolidin reduziert. Der letzte Schritt

ist die Hydrolyse zur Aldehydfunktion unter Schwermetallkatalyse (HgCl_2 oder CuCl_2/CuO). Diese Sequenz verläuft in Lösung mit einer Gesamtausbeute von 83 %.

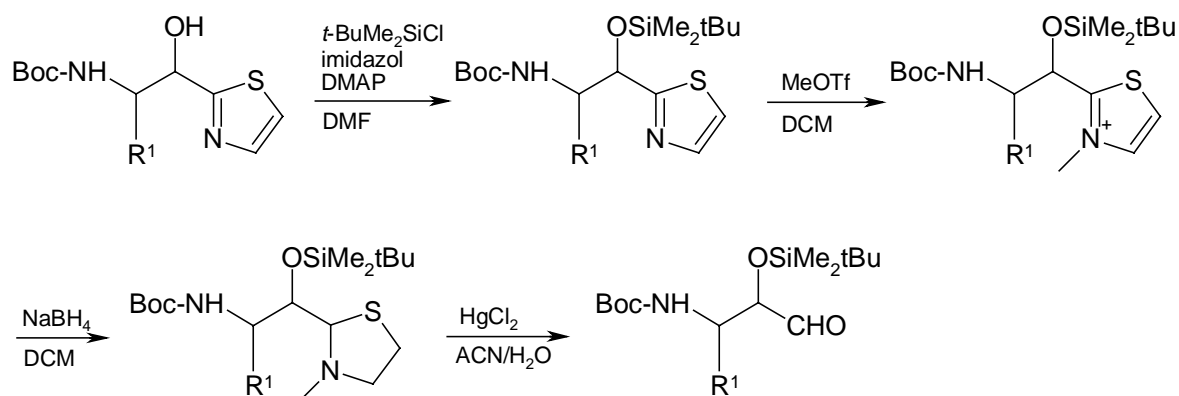


Abb. 3-19: Einführung der Schutzgruppe und Abbaureaktion des Thiazols zur Aldehydfunktion in einer dreistufigen Synthese. a. Schützung der Hydroxyfunktion; b. Methylierung des Thiazolstickstoffs; c. Reduktion zum N-Methyl-Thiazolidin; d. Hydrolyse zur freien Aldehydfunktion.

3.2.4 Wahl des polymeren Trägermaterials

Bei der Übertragung der Synthese auf die feste Phase stellt sich das Problem, daß ein geeignetes Linkermaterial gefunden werden muß, welches zu den geforderten Reaktionsbedingungen kompatibel sein soll. Die Ankergruppe soll eine hohe Stabilität gegenüber Nukleophilen (Thiazollithium, NaBH_4) besitzen, jedoch gleichzeitig eine Abspaltung der geschützten Peptidomimetika vom Träger unter milden Bedingungen zulassen, ohne daß vorhandene Schutzgruppen entfernt werden. Da eine C_1 -Kettenverlängerung ausgehend von Aminosäurebausteinen geplant ist, muß dieser Baustein N-terminal an das Trägermaterial gebunden werden können. Die normalerweise für eine C-terminale Modifikation in Frage kommenden Ankermaterialien zeigen folgende Nachteile:

- *Trityl-Chlorid-PS-Harz*: Es hat eine verbreitete Anwendung bei der Immobilisierung nukleophiler Gruppen und lässt eine Abspaltung bei milden sauren Bedingungen zu. Diese würde hier aber bereits bei der Umsetzung mit Lithium-Thiazol eintreten.
- *Phthaloyl-PS-Harz*: Es hat eine höhere Toleranz gegenüber Säuren, versagt jedoch beim Einsatz von nukleophilen Reagenzien.
- *Z-Chlorid-PS-Harz*: Dieses Linkermaterial würde die Umsetzung mit Lithiumthiazol bei tiefen Temperaturen (-70 °C) zulassen. Eine Abspaltung unter Erhalt von Seitenkettenschutzgruppen ist nicht möglich.

Aus diesen Gründen wird deshalb für die Synthese von α -Hydroxy- β -amino-Aldehyden eine an das Trägermaterial gebundene Boc-Schutzgruppe als Linker verwendet. Die Lösungssynthese zeigt, dass die Boc-Schutzgruppe mit den Reaktionsschritten kompatibel ist und außerdem eine Abspaltung unter milden sauren Bedingungen (TFA/DCM 50:50) erlaubt. Bisher findet diese polymergebundene Schutzgruppe in der Kombinatorischen Chemie keine Anwendung. Auf der Basis von Arbeiten zur Herstellung von Alkyloxycarbonylhydrazid-Harz durch Wang et al. [Wan69] [Wan75] in ähnlicher Richtung wird eine modifizierte Synthese für dieses Boc-Harz erarbeitet. Die Autoren verwenden dieses Trägermaterial zur Synthese von geschützten Peptidhydraziden, welche in die entsprechenden Azide überführt und dann mit weiteren Peptidfragmenten kondensiert werden. Zwischenzeitlich ist eine neuere Arbeit zur Synthese dieser Schutzgruppe an fester Phase auf der Basis von Wang-Harz erschienen [Lég98], welche die Synthese dieses Ankerbausteins und seine Anwendung in der Peptidsynthese beschreibt. Jedoch wird hier durch den vorhandenen Arylether im Ausgangsmaterial das Potential dieser Schutzgruppe nicht ausgeschöpft, da dieser einen elektrophilen Angriff ermöglicht.

3.2.5 Synthese der polymeren Boc-Schutzgruppe

Als Ausgangsmaterial dient PS-Brommethyl-Harz **1** (Beladung ca. 1 mmol/g). Versuche mit PS-Chlormethyl-Harz zeigen eine unvollständige Umsetzung, weshalb bromsubstituiertes Harz zum Einsatz kommt. Dieses wird den Bedingungen einer nukleophilen Substitution mit einer Carbanionenlösung aus Acetessig-*tert.*-butylester in DMF bei 50 °C unterworfen. Die vollständige Umsetzung kann durch den Negativnachweis auf Brom in einer Elementaranalyse gezeigt werden. Die Vorstufe **2** wird durch die Behandlung mit TFA/DCM (50:50) unter Abspaltung von Isobuten und CO₂ in das harzgebundene Methylketon **3** überführt. Die Grignard-Reaktion mit 5 eq. Methylmagnesiumchlorid unter Inertbedingungen reduziert das Keton in den gewünschten tertiären Alkohol **4**. Abschliessend erfolgt eine Aktivierung des polymergebundenen Alkohols. Dazu wird das Harz mit einer Lösung aus 10 eq *p*-Nitrophenyl-chlorformiat und Pyridin als Base in DCM 16 h gerührt und man erhält als Endprodukt dieser Synthese *p*-Nitrophenyl-(*tert.*-butyl)-carbonat-Harz **5** (Abb. 3-20).

Mit dieser vierstufigen Synthesestrategie lassen sich Ansätze von 10 bis 15 g Ausgangsmaterial problemlos durchführen. Die Charakterisierung eines jeden Schrittes erfolgt mittels FT-IR-ATR-Spektroskopie, da in jeder Stufe funktionelle Gruppen eingeführt wurden, welche deutliche und sehr gut beobachtbare Absorptionen im IR-Bereich aufweisen.

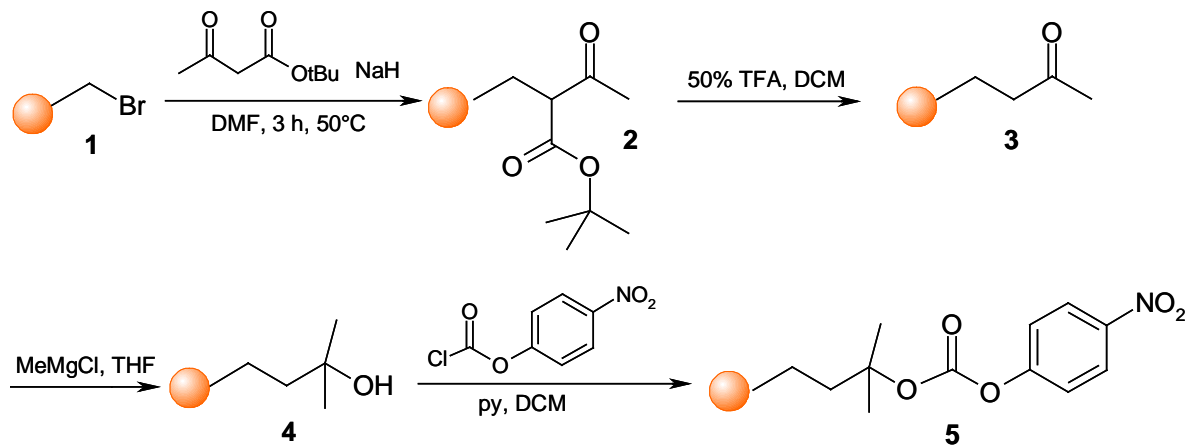


Abb. 3-20: Synthese der Polymer-Boc-Schutzgruppe. a. nukleophile Substitution; b. Ketonspaltung; c. Grignard-Reaktion; d. Aktivierung zum Carbonat.

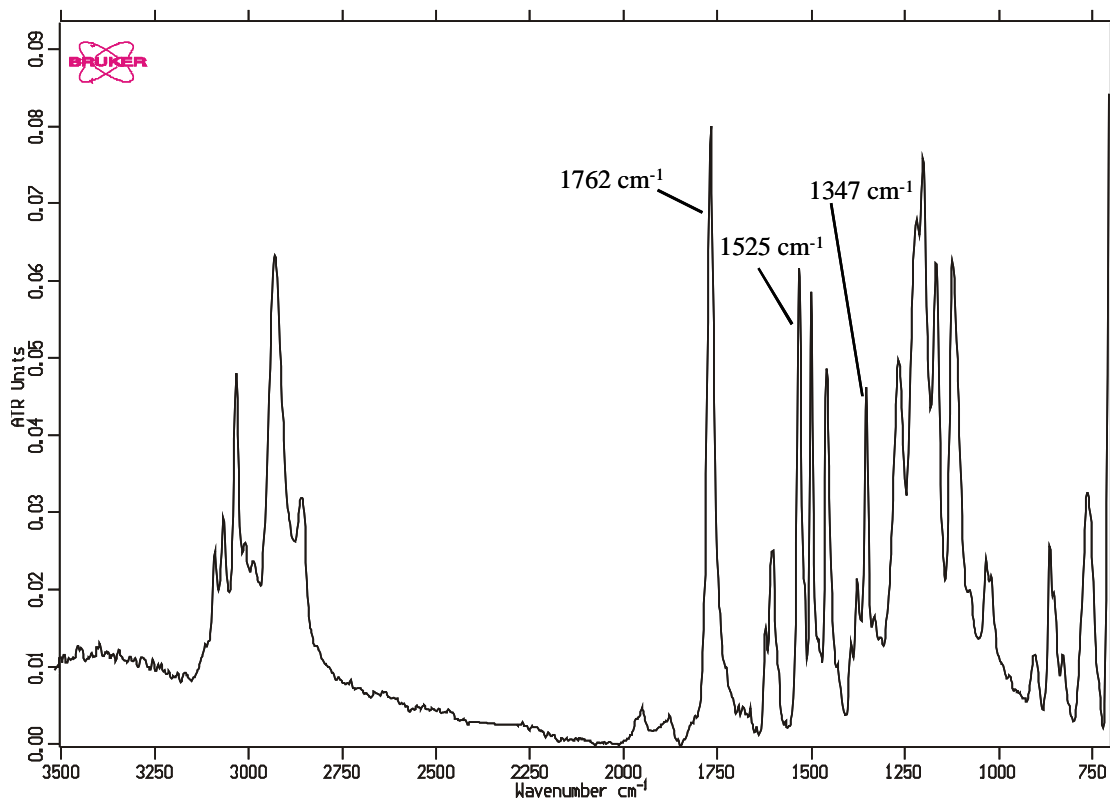


Abb. 3-21: IR-Spektrum der aktivierten polymeren Boc-Schutzgruppe. (Struktur siehe Abb. 3.19) Die Absorptionen der Carbonat- und der Nitrogruppe sind deutlich erkennbar.

Nach dem ersten Schritt können zwei Carbonylabsorptionen bei 1715 und 1730 cm⁻¹ detektiert werden. Durch die Esterspaltung entfällt die letztere und mit der Grignard-Reaktion verschwindet auch die zweite Carbonylabsorption vollständig. Der letzte Schritt, die Aktivierung, zeigt sich durch die Absorptionen

der beiden Nitrobanden bei 1525 und 1347 cm^{-1} und der Carbonylabsorption der Carbonatgruppe bei 1762 cm^{-1} (Abb. 3-21).

Die Untersuchung einer Probeabspaltung vom aktivierten Harz weist eine HPLC-Reinheit von 98 % auf, welche auf *p*-Nitro-Phenol zurückzuführen ist. Das Massenspektrum ergibt die korrekte Masse dieses Phenols.

3.2.6 Belegung des polymeren Trägermaterials mit Aminosäureestern

Die gewünschte Stabilität des Linkers wird unter anderem durch die sterische Abschirmung der *tert.*-Butyl-Gruppe hervorgerufen, was aber gleichzeitig auch eine Hürde bei der Belegung dieses Harzes mit Aminosäureestern ist. Es sind drastischere Bedingungen im Vergleich zu anderen Ankergruppen nötig, um eine vollständige Beladung zu erzielen.

a. Aminosäurefluorenylmethylester

Erste Versuche fanden mit Aminosäurefluorenylmethylestern statt. Diese sind leicht erhältlich und die Entfernung der Carboxy-Schutzgruppe wäre problemlos möglich. Es zeigt sich jedoch, dass in der Reaktionslösung freie ungeschützte Aminosäure ausfällt.

Die Esterspaltung, die durch die freie Aminofunktion hervorgerufen wird, steht in Konkurrenz zur Kupplungsreaktion und verläuft schneller als diese. Eine Temperaturerhöhung beschleunigt gleichmässig beide Reaktionen und weitere Reaktionsschritte zeigen, dass keine einheitliche Beladung des Harzes erhalten wird.

b. intermediär gebildete Aminosäuresilylester

Es wird versucht die in der Literatur beschriebene *in situ* Herstellung von Aminosäuresilylestern zu verwenden [Dre96]. Hierzu wurde eine Lösung der

freien Aminosäure in DMF im Ultraschallbad hergestellt und diese Lösung mit 10 eq N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid versetzt (Abb. 3-22).

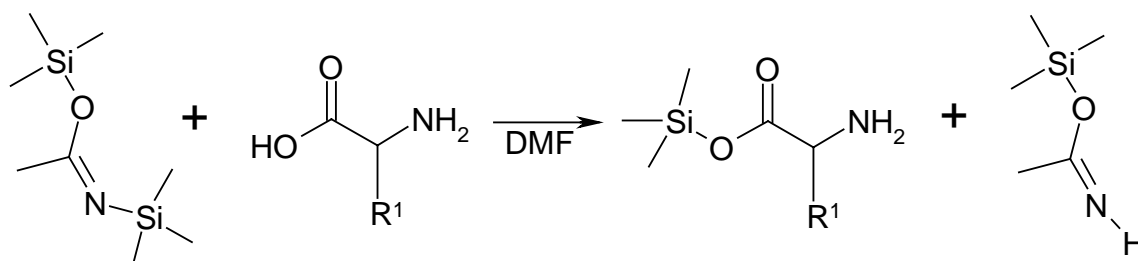


Abb. 3-22: Bildung des Aminosäuresilylesters mittels N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid

Dabei bildet sich der entsprechende Silylester der Aminosäure. Diese Lösung wird zum Harz gegeben, bei 50 °C gerührt und zu verschiedenen Zeitpunkten werden Harzproben mittels IR-Spektroskopie untersucht. Es zeigt sich nach 18 h Reaktionszeit ein Maximum der Carbonylabsorption der immobilisierten Aminosäure.

Jedoch beträgt die Carbonyl-Peakfläche, welche proportional zur Beladung angesehen werden kann, nur ein Viertel im Vergleich zu den später gezeigten Methoden. Probeabsplattungen zeigen, daß mit dem intermediären Silyschutz eine einheitliche, jedoch unvollständige Beladung des Harzes gelingt.

Die bislang geschilderten Methoden führten nicht zu einer homogenen oder vollständigen Beladung des Trägermaterials. Dies lässt sich auf die, für dieses Ankermaterial, zu labilen Carboxy-Schutzgruppen zurückführen, weswegen weitere Versuche mit stabileren Schutzgruppen erfolgen.

c. Aminosäureallylester

Die Verwendung der Allyl-Schutzgruppe ist in der Peptidchemie mehrfach beschrieben [Kat93]. Sie läßt sich mittels Pd(0)-Katalyse spalten und ist gegen saure und basische Bedingungen inert. Diese Aminosäureester sind nur zum Teil

kommerziell erhältlich, weshalb einige Derivate durch eine Veresterung von Boc-Aminosäuren mit Allylalkohol und DIC/DMAP synthetisiert werden (Abb. 3-23). Nach einer Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erhält man das Rohprodukt als Öl. Jedoch ist eine Aufreinigung für die Harzbelegung nicht notwendig, da die bei der Synthese anfallenden Verunreinigungen nicht stören.

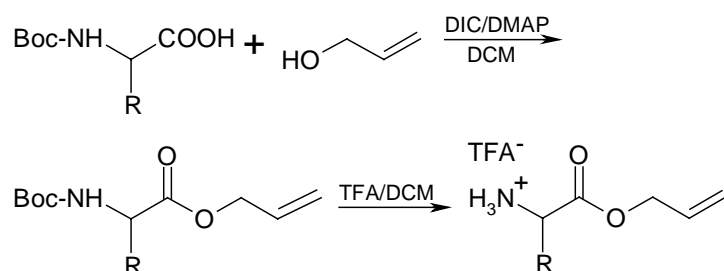


Abb. 3-23: Synthese von Aminosäureallylestern

Das Polymer-Boc-Harz wird mit einer Lösung aus 5 eq Aminosäureallylester, 5 eq DIEA und 0,5 eq HOBT in DMF bei 50 °C 18 h gerührt (Abb. 3-24 A). Es zeigt sich, dass damit der polymere Träger vollständig beladen werden kann, da die Nitro- und die Carbonylbande des Carbonats im IR-Spektrum verschwunden und dafür die Carbonylbande des Aminosäureesters bei 1735 cm⁻¹ zu sehen ist. DC-Kontrollen von Probeabspaltungen zeigen nur den Spot des jeweiligen Aminosäureesters. Die Verseifung des Allylesters wird mit 1,2 eq Pd(PPh₃)₄ unter Inertatmosphäre innerhalb 2 h durchgeführt. Durch DC-Kontrolle kann auch hier die vollständige Umsetzung nachgewiesen werden.

Damit ist gezeigt, dass eine Belegung des Harzes mit Aminosäureallylestern reproduzierbar und vollständig durchführbar ist. Die Nachteile dieser Methode liegen in der begrenzten Anzahl an verfügbaren Allylestern und der Esterspaltung mittels teurer und in Lösung sauerstoffempfindlicher Pd(0)-Katalysatoren. Deshalb besteht die Nachfrage nach einer weiteren Methode zur Harzbelegung, die diese beiden Nachteile umgeht.

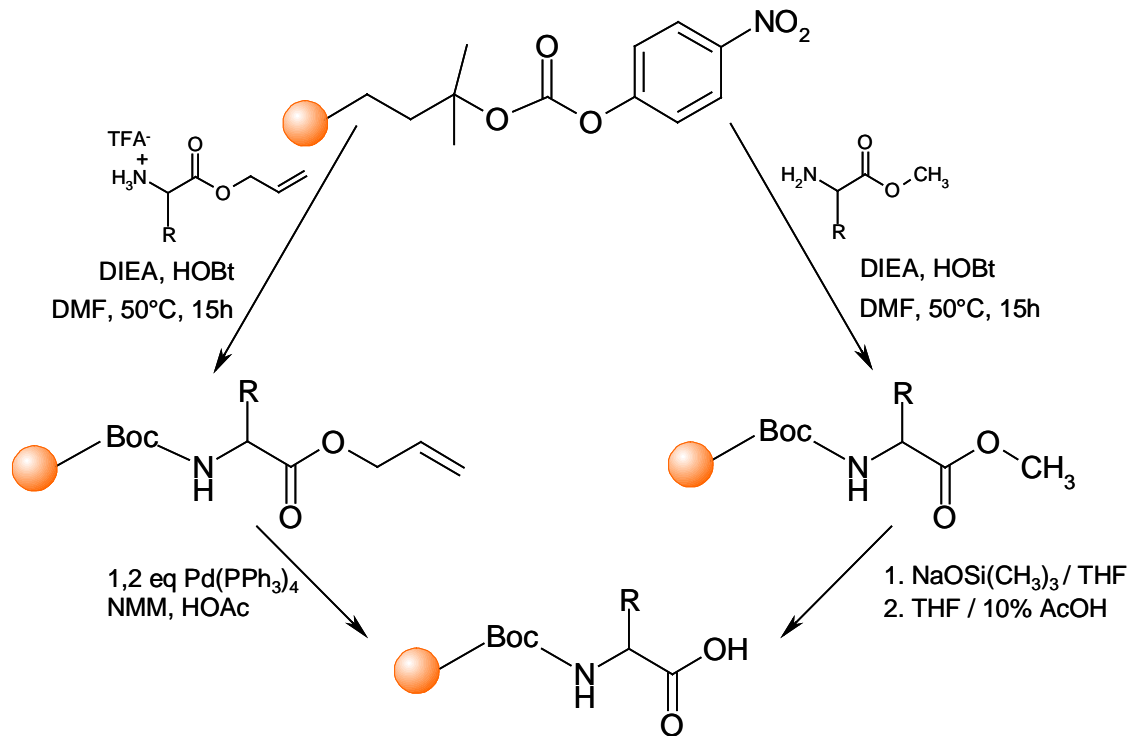


Abb. 3-24: Belegung des Polymer-Boc-Harzes. Linke Seite: Verwendung von Aminosäureallylestern und Spaltung durch Pd(0)-Katalyse; rechte Seite: Verwendung von Aminosäuremethylestern und Spaltung durch Natriumtrimethylsilanolat.

d. Aminosäuremethylester

C-terminal geschützte Aminosäure- oder Dipeptidmethylester sind in einer großen Anzahl kommerziell erhältlich. Zur vollständigen Beladung des Harzes werden die gleichen Bedingungen wie bei den Allylestern verwendet und die Verseifung zur freien Carboxyfunktion mit einer 1 M NaOSi(CH₃)₃-Lösung in THF durchgeführt. Diese Methode ist in die Festphasensynthese von Maryanoff et al. [Zha97] [Hoe97] eingeführt worden. Dort werden Aminosäurester N-terminal am Trägermaterial fixiert, um sie als Bausteine bei der Synthese von Heterocyclen zu verwenden. Zuvor wurde diese Verseifungsmethode in der Flüssigphasenchemie verwendet [Lag84]. Zur Entschützung wird das Harz in dieser Lösung suspendiert und 24 h geschüttelt, wobei eine Umesterung zum Silylester stattfindet. Dieser kann mit einer 10 % HOAc/THF-Lösung innerhalb von 5 h gespalten werden (Abb. 3-24 B). Die Beladungskontrolle mit IR-

Spektroskopie und DC ist positiv, womit noch ein zweiter Weg zur Polymer-Boc-Harz-Belegung gefunden ist, welcher zuverlässig durchzuführen ist und die Verwendung vieler weiterer Bausteine zulässt.

3.2.7 Übertragung der C₁-Kettenverlängerung auf die feste Phase

Nachdem mit der Synthese der polymeren Boc-Schutzgruppe ein geeignetes Trägermaterial vorhanden ist, und zwei praktikable Methoden zur Belegung des Materials zur Verfügung stehen, kann mit der insgesamt siebenstufigen Kettenverlängerungssequenz begonnen werden.

3.2.7.1 Synthese harzgebundener Weinreb-Amide

Zur Verfolgung der Synthesestrategie wird als erster Schritt aus den immobilisierten Aminosäuren das entsprechende Weinreb-Amid hergestellt [Nah81] (Abb. 3-18 B, Abb. 3-25) und hierzu das Harz in einer Lösung aus 10 eq N,O-Dimethylhydroxylamin, 20 eq DIEA und 10 eq PyBop in DCM suspendiert und 16 h geschüttelt. Mit diesen Bedingungen wird eine HPLC-Reinheit von 90-96 %, je nach verwendeter Aminosäure erzielt. Im FT-IR-Spektrum zeigt sich die charakteristische Absorption des Weinreb-Amids bei 1660 cm⁻¹.

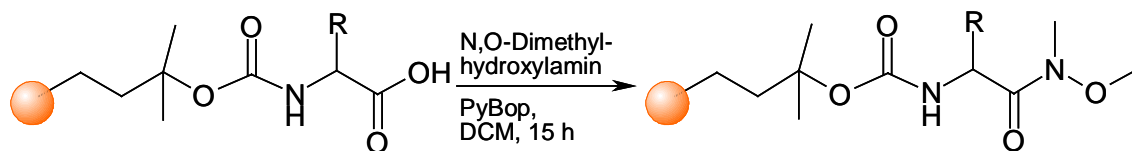


Abb. 3-25: Synthese von Polymer-Boc-Aminosäure-Weinrebamiden aus Polymer-Boc-Aminosäuren.

Tab. 3-7: HPLC-Reinheiten (% , 214 nm) und Molmassen der hergestellten Weinrebamide

Aminosäure R	Produktreinheit	Masse [M+H ⁺]
Leu	91	175,24
Val	92	161,22
Phe	95	209,26
Lys(Z)	96	324,40
Met	90	193,28

3.2.7.2 Umsetzung mit Lithiumthiazol

Mittels einer Standardvorschrift der Organometallchemie [Bra95] kann eine Lösung von Lithiumthiazol in THF durch die Metallierung von Thiazol mit Butyllithium in THF bei $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ hergestellt werden. Von dieser dunkelroten Lösung werden 5 eq zu den Polymer-Boc-Aminosäure-Weinreb-Amiden gegeben und 2 h bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Alle Schritte erfolgen unter Inertbedingungen. Die IR-Spektren der Ketone zeigen durchgehend ein Verschwinden der Weinreb-Amid-Absorption bei 1660 cm^{-1} , während die neue Carbonylbande des Ketons bei 1690 cm^{-1} hinzukommt.

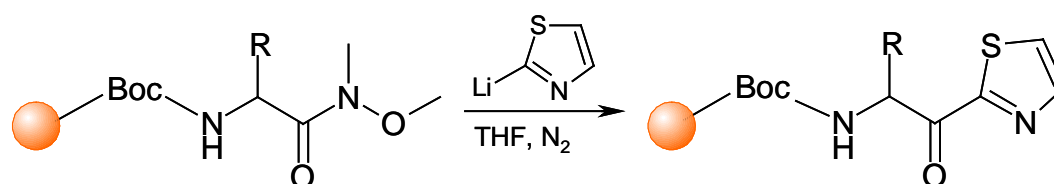


Abb. 3-26: Synthese von Aminothiazolketonen aus Weinreb-Amiden

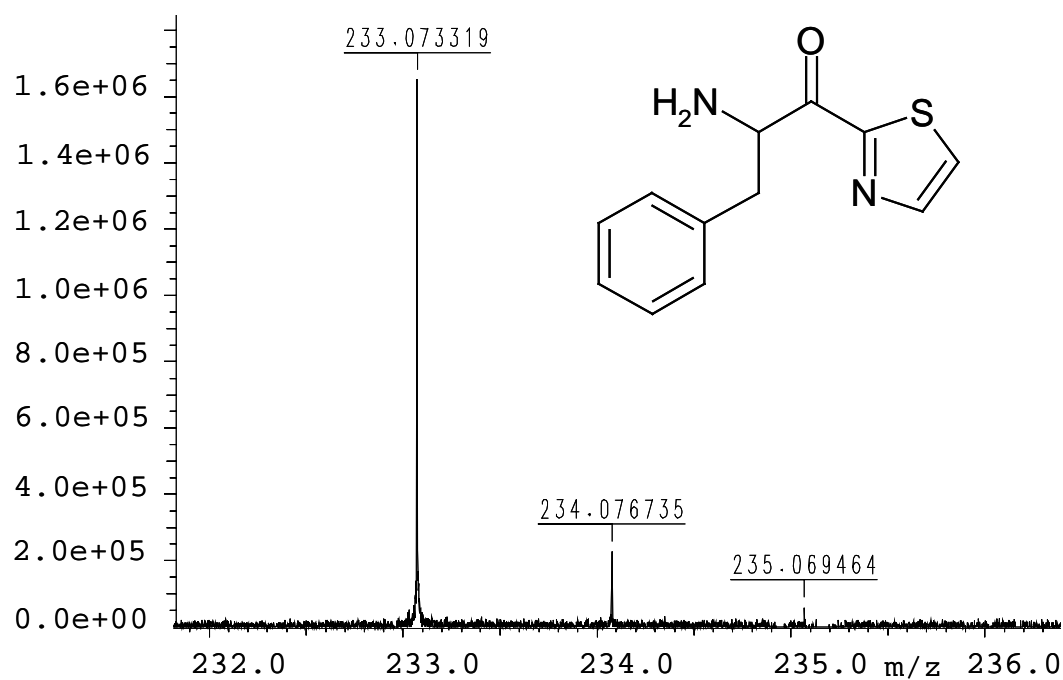


Abb. 3-27: FT-ICR-MS eines Aminothiazolketons ($[M+H]^+$ theor.: 233,073419)

Tab. 3-8: HPLC-Reinheiten (% , 214 nm) und Molmassen der hergestellten Aminothiazolyketone

Aminosäure R	Produktreinheit	Masse $[M+H]^+$
Leu	90	199,29
Val	92	185,26
Phe	94	233,07
Lys(Z)	95	348,44
Met	90	217,33

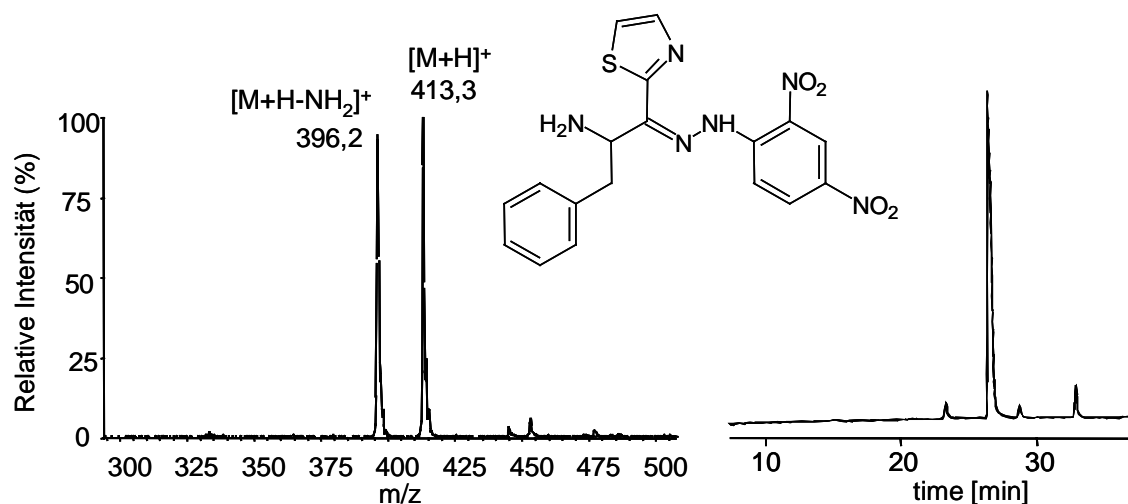


Abb. 3-28: ESI-MS und HPLC eines 2,4-Dinitrophenylhydrazonderivats von 1-Amino-2-phenyl-thiazolyl-ke-ton

Eine Überführung der Produkte in Hydrazone erlaubte deren Charakterisierung (Abb. 3-28). Für diese Derivatisierungsreaktion wird den polymergebundenen Thiazolylketonen für 12 h eine Lösung aus 10 eq Dinitrophenylhydrazin in DMF und 5 % HOAc zugesetzt.

Es zeigt sich die für die Umsetzung mit Lithiumthiazol geforderte Stabilität des Ankermaterials durch die guten und reproduzierbaren Ergebnisse dieser Synthesestufe.

3.2.7.3 Reduktion der polymergebundenen Ketone zu sekundären Alkoholen

Bei der Reduktion des Ketons zum entsprechenden Alkohol an fester Phase können Vorschriften aus der Literatur auf die Festphasensynthese übertragen werden. Es werden 5 eq einer 0,1 M Lösung aus NaBH₄ in THF/MeOH (4:1) zum Harz gegeben, nach 0,5 h die Reaktion abgebrochen und wiederholt, um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten.

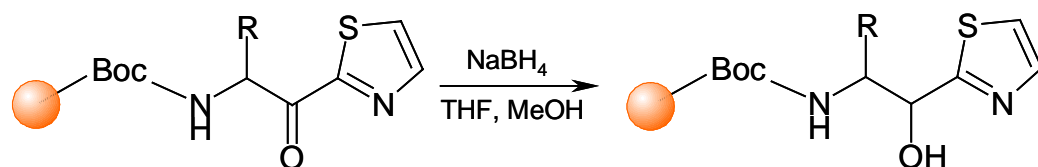


Abb. 3-29: Reduktion von Aminothiazolketonen zu den entsprechenden sekundären Alkoholen

Im IR-Spektrum kann das Verschwinden der Carbonylabsorption des Ketons beobachtet werden. Nach der Abspaltung zeigt die HPLC-Analyse, dass die Umsetzung vollständig verlaufen ist. Diese deutet durch den vorhandenen Produktdoppelpeak an, dass ein Diastereomerenpaar entstanden ist. Eine ¹³C-NMR-Aufnahme von 1-Thiazolyl-valinol sichert diese Erkenntnis, dass diastereomere Alkohole entstanden sind, da das Spektrum den erwarteten doppelten Signalsatz zeigt.

3.2.7.4 Einführung einer Alkoholschutzgruppe

Der Schutz der Hydroxygruppe als Silylether erfolgt durch die Umsetzung des Alkohols mit einer Lösung aus 5 eq *tert.*-Butyl-dimethylsilylchlorid, Imidazol und DMAP in DMF, wodurch man einen Silylether mit relativ hoher Stabilität erhält, der mit der darauffolgenden Abbausequenz kompatibel ist.

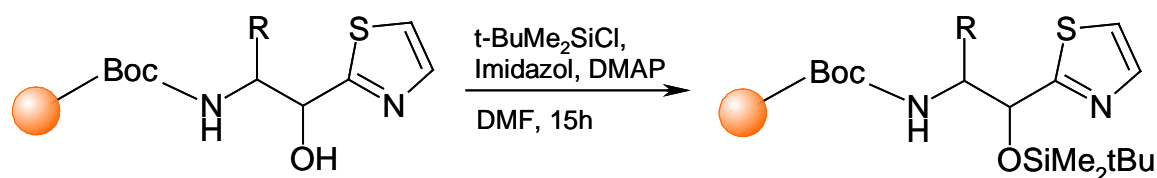


Abb. 3-30: Einführung der TBDMS-Schutzgruppe

Sowohl durch den sterischen Anspruch des sekundären Alkohols, als auch des TBDMS gelingt die vollständige Einführung dieser Schutzgruppe bei einer

Reaktionszeit von 16 h. Entfernt werden kann diese Schutzgruppe durch den Zusatz von Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung in THF innerhalb von 2 h. Die erfolgreiche Schützung des Alkohols kann IR-spektroskopisch verfolgt werden, da eine deutliche Reduktion der OH-Valenzschwingung bei 3350 cm^{-1} und die charakteristische Si-C-Valenzschwingung bei 840 cm^{-1} zu beobachten ist.

3.2.7.5 Abbausequenz zur Freisetzung der Aldehydfunktion

Der letzte Schritt bei der Übertragung der C_1 -Kettenverlängerung nach Dondoni auf die feste Phase stellt die Abbaureaktion des Thiazolrings dar, deren Ziel die Modifizierung des Thiazols zu einem leicht hydrolysierbaren Zwischenprodukt ist.

Die Sequenz beginnt mit einer Alkylierung des Stickstoffs im Thiazol, gefolgt von einer Reduktion des Heterocyclus. Schliesslich wird die Aldehydfunktion durch schwermetallkatalysierte Hydrolyse freigesetzt.

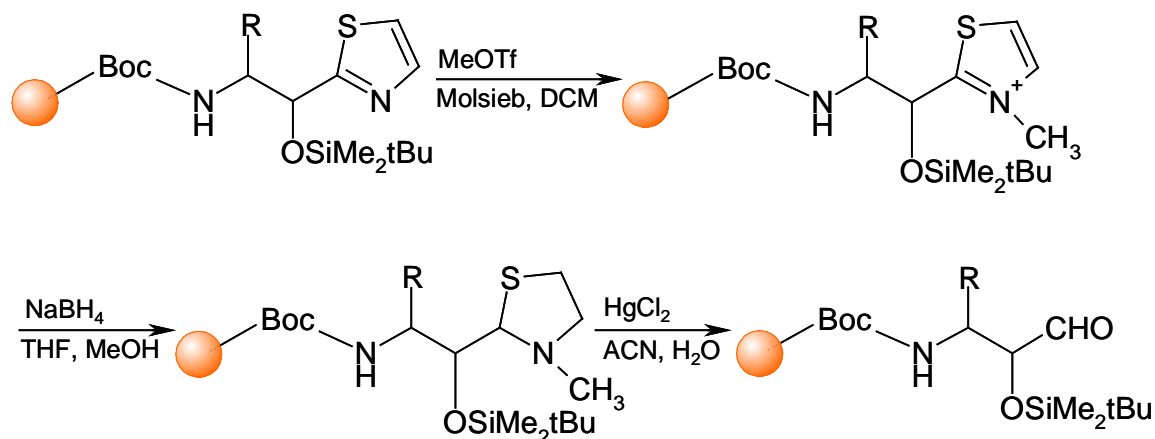


Abb. 3-31: Dreistufige Abbaureaktion nach Dondoni zu Polymer-Boc- α -Hydroxy- β -Amino-Aldehyden.

a. Alkylierung des Thiazol-Stickstoffatoms

Dieser Schritt wird analog zu [Don93] aus der Flüssigphasensynthese übernommen, wobei als Methylierungsreagenz Trifluormethansulfonsäuremethylester verwendet wird.

In der Festphasensynthese wird dazu eine Suspension des Harzes in DCM mit Molekularsieb getrocknet, auf 0 °C gekühlt und dann mit 5 eq Methyltriflat für 2 h umgesetzt.

b. Reduktion von N-Methylthiazol

Die Verwendung von NaBH₄ zur Reduktion an fester Phase ist auch in diesem Fall erfolgreich. Die Reaktion wurde mit 5 eq Reduktionsmittel in THF/MeOH (4:1) für 2 h bei -10 °C durchgeführt.

c. Hydrolyse von N-Methylthiazolidin zur Aldehydfunktion

Die hohe Affinität von Schwefel zu Schwermetallen ermöglicht die Modifikation N-Methylthiazolidinen zur Aldehydfunktion, da damit das thermodynamische Gleichgewicht auf die Seite der freien Carbonylfunktion verschoben werden kann.

Das von Dondoni verwendete Gemisch aus CuCl₂ und CuO in ACN/H₂O (10:1) als Ersatz für Quecksilbersalze, kann für die Festphasensynthese nicht verwendet werden, da die Schwermetallverbindungen nicht löslich sind, so dass insgesamt ein Dreiphasensystem vorliegt, indem eine Hydrolyse nicht stattfinden kann.

Aus diesem Grund wird Quecksilber(II)perchlorat in THF verwendet, das allerdings zu einer Abspaltung vom Trägermaterial führt, was sich durch die fehlende Urethanbande im IR-Spektrum nach der Reaktion zeigt. Als Grund ist die Lewis-Acidität dieser Verbindung zu sehen, die nicht mit der Festphasenchemie kompatibel ist.

Eine Hydrolyse ohne Ablösung vom polymeren Träger läßt sich dagegen mit HgCl_2 durchführen. Zu diesem Zweck wird das Harz mit 3 eq Quecksilber(II)chlorid in einer Mischung aus ACN/ H_2O (4:1) 16 h geschüttelt. Das sich bei der Umsetzung gebildete Quecksilbersulfid führt dabei zu einer bräunlichen Verfärbung des Harzes. Nach dem Waschen des Harzes läßt sich überschüssiges Quecksilber in der Waschlösung durch den Zusatz von Sulfidionen ausfällen.

Es wird damit die Abbausequenz auf die feste Phase übertragen. Die Reaktion kann im IR-Spektrum anhand einer Absorptionsschulter im Carbonylbereich bei 1730 cm^{-1} detektiert werden. Ein Nachweis der Aldehyde durch Abspaltung vom Trägermaterial ist nicht möglich, da sie unter den Abspaltungsbedingungen nicht stabil sind und nicht definierte Gemische bilden. Erst die im folgenden Abschnitt beschriebenen Derivatisierungsreaktionen der Aldehydfunktion an fester Phase mit anschließender Abspaltung ermöglichen den indirekten Nachweis.

3.2.8 Modifizierung harzgebundener α -Hydroxy- β -amino-Aldehyde

Für die Synthese von peptidomimetischen Strukturen aus den hergestellten Aldehyden werden zwei Derivatisierungsreaktionen durchgeführt. Zum einen wird die reduktive Aminierung mittels primärer Amine durchgeführt, welche substituierte 1,3-Amino-2-hydroxypropane liefert, zum anderen die Umsetzung mit Sulfonphosphonaten in einer Horner-Emmons-Reaktion, letztere ergeben dabei substituierte Vinylsulfonderivate (Abb. 3-32).

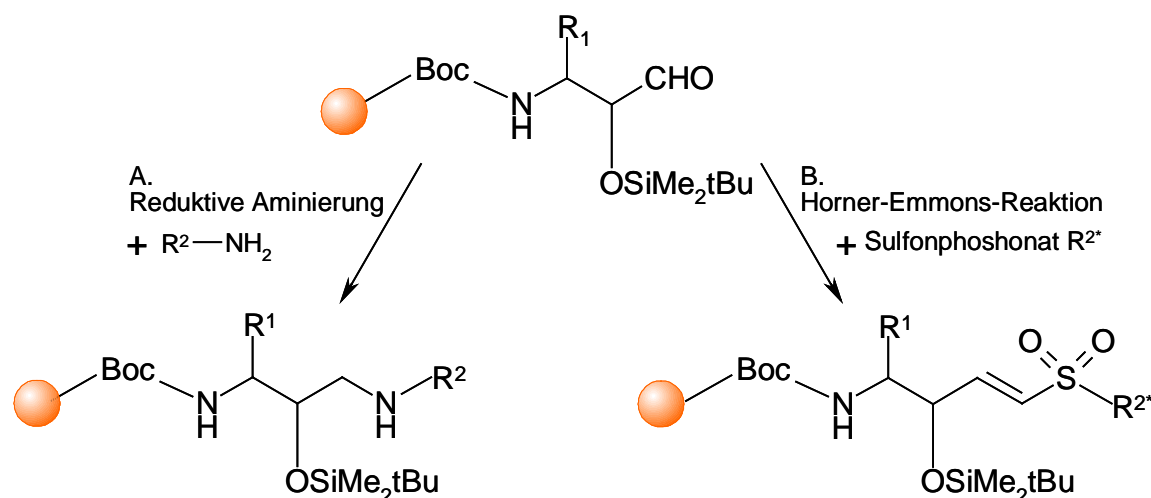


Abb. 3-32: Derivatisierungen an α -Hydroxy- β -Amino-Aldehyden. A. reduktive Aminierung mit primären Aminen; B. Horner-Emmons-Reaktion mit Sulfonphosphonaten.

3.2.8.1 Reduktive Aminierung harzgebundener α -Hydroxy- β -amino-aldehyde

Der harzgebundene Aldehyd wird den Bedingungen der Iminbildung durch den Zusatz von 10 eq Amin in THF/TMOF (1:1) unterworfen. Das erzeugte Intermediat wird anschließend mit einer Lösung von 5 eq NaBH_3CN in Methanol versetzt und geschüttelt. Die Reaktionssequenz wird zur vollständigen Umsetzung wiederholt. Durch die Verwendung von primären Aminen lassen sich so 1,3-Amino-2-Hydroxypropane bilden.

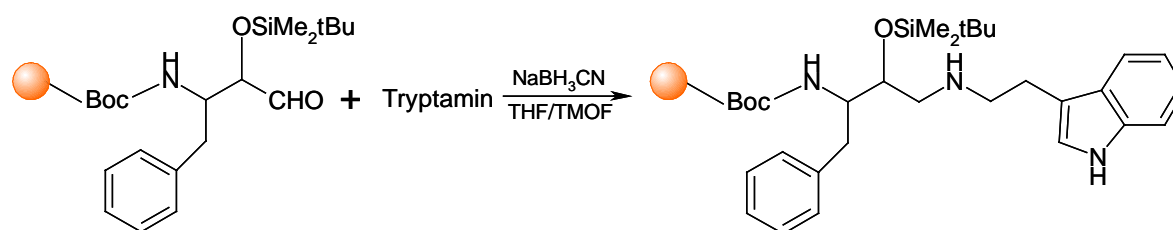


Abb. 3-33: Reduktive Aminierung von Polymer-Boc-3-Amino-2(*tert*-butyl-dimethylsilyl)-2-hydroxy-4-phenylbutanal mit Tryptamin als primäres Amin.

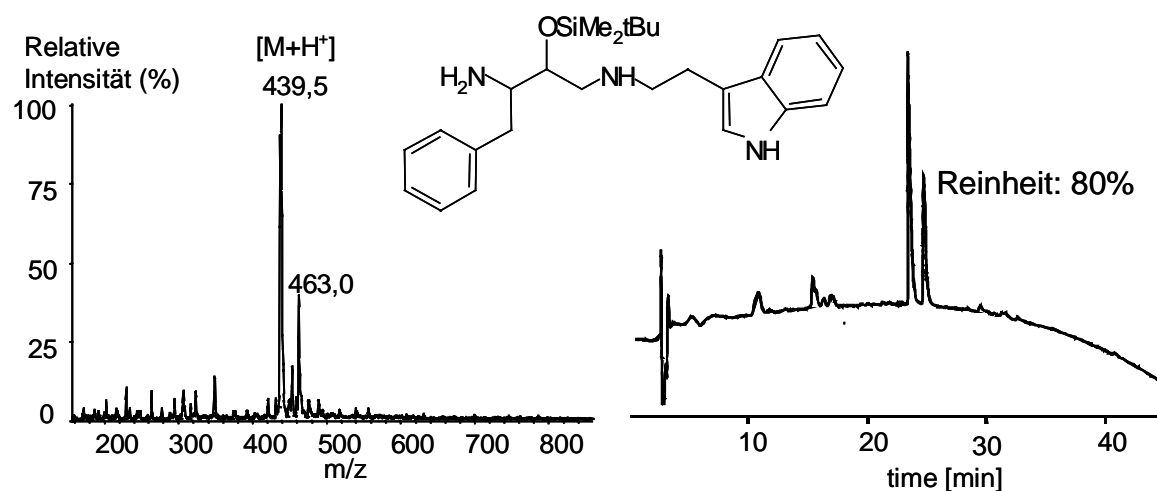


Abb. 3-34: HPLC- und MS-Spektrum von 1-Tryptamin-2-(*tert*-Butyl-dimethylsilyl)-2-hydroxy-4-phenylbutan.

Exemplarisch ist in Abb. 3-34 die Charakterisierung des hergestellten 1,3-Amino-2-hydroxypropanderivats mittels HPLC und MS gezeigt. Der im HPLC-Diagramm sichtbare Doppelpeak ist auf den nicht-stereoselektiven Syntheseweg zurückzuführen (vergl. Abb. 3-18 und Abschnitt 3.2.7.3).

Diese Synthese lässt sich auf eine Reihe weiterer Amine und Aldehyde ausdehnen. Die eingesetzten Bausteine und die Reinheiten der hergestellten Produkte zeigt Tab. 3-9.

Tab. 3-9: HPLC-Reinheiten (%; 214 nm) und Molmassen der silylgeschützten 1,3-Amino-2-hydroxypropanderivate

	Amin R ₂		4-Methylbenzyl-		Piperonyl-		Adamantyl-	
	Aldehyd R ₁	Trypt-	(%)	[M+H] ⁺	(%)	[M+H] ⁺	(%)	[M+H] ⁺
Val	69	390,6	71	351,6	60	381,6	53	395,7
Leu	64	404,7	65	365,7	64	395,7	55	409,7
Ile	65	404,7	69	365,7	70	395,7	59	409,7
Lys(Z)	63	553,8	60	514,8	62	544,8	58	558,9
Phe	80	438,7	70	399,7	71	429,7	64	443,8

Insgesamt können befriedigende Reinheiten zwischen 53 und 80 Prozent je nach eingesetzten Edukten erzielt werden. Eine später versuchte Optimierung der HPLC-Reinheiten durch die Verwendung von Natriumtriacetoxyborhydrid als Reduktionsmittel erbrachte keine Verbesserung. Jedoch zeigt die Verwendung eines anderen polymeren Trägermaterials Wirkung. Dabei handelte es sich um mit 5 % Divinylbenzol quervernetztes Harz der Firma Advanced Chem Tech. Die komplette Synthese wurde mit diesem höher quervernetzten Polystyrol durchgeführt, womit sich die Reinheiten um ca. 10 Prozent verbessern ließen. Der Grund liegt in der nur geringen Veränderung des Quellvolumen des Harzes beim Zusatz von polaren Lösungsmitteln. Dadurch bleiben die in der Harzkugel liegenden reaktiven Zentren besser für die weitere Umsetzung zugänglich. Durch den um ein Vielfaches höher liegenden Preis des Trägermaterials, im Vergleich zum nur mit 2 % Divinylbenzol quervernetzten Harz, wurden damit weitere Synthesen nicht durchgeführt.

3.2.8.2 Herstellung von Sulfonphosphonaten

Die zweite Derivatisierungsreaktion ist die Umsetzung mit Sulfonphosphonaten zu substituierten Vinylsulfonen. Sowohl die Wittig-analoge Reaktion an fester Phase, als auch die dabei entstehende Vinylsulfon-Grundstruktur wurden schon beschrieben [Chen94] [Rot96].

Um verschieden substituierte Vinylsulfone herzustellen und damit der in der Einleitung dieses Kapitels beschriebenen Synthesestrategie gerecht zu werden, werden fünf unterschiedliche Sulfonphosphonate synthetisiert.

Zur Herstellung dieser Bausteine wird auf eine Vorschrift von Blumenkopf et al. [Blu86] zurückgegriffen. Hierbei werden in einer nukleophilen Substitution zuerst aus Natriummercaptanen und Jodmethyldiethylphosphonat die entsprechenden Thioether hergestellt und anschliessend durch Kaliumpyrosulfat zum Sulfon oxidiert (Abb. 3-35). Nach einer Aufreinigung können die Produkte charakterisiert und in der Synthese eingesetzt werden.

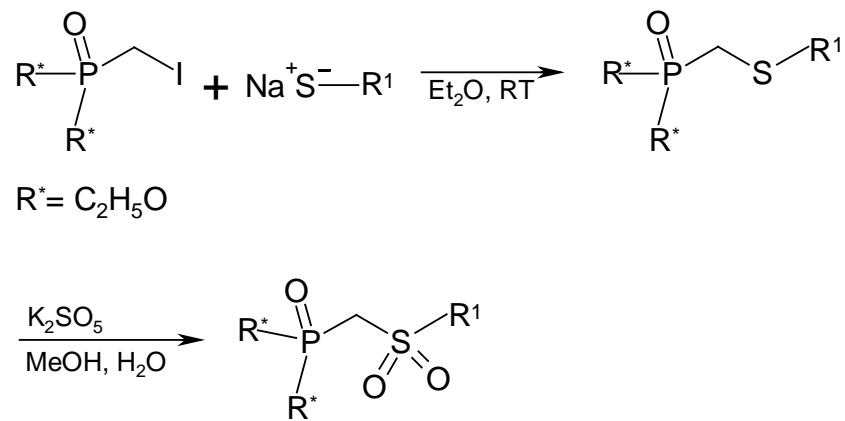


Abb. 3-35: Herstellung von Sulfonphosphonaten aus Natriummercaptanen und Jodmethyldiethylphosphonat.

Alle fünf hergestellten, an der Sulfongruppe unterschiedlich substituierte Phosphonate werden mittels ^{13}C , ^1H , ^{31}P -NMR und MS untersucht. Die Phosphorspektren zeigen durchgängig nur ein Signal. Alle ^1H -Spektren weisen eine Dublettaufspaltung der Methyleinheiten durch eine Kopplung mit dem benachbarten Phosphoratom auf. Exemplarisch ist für ein Sulfonphosphonat die Zuordnung der ^1H -NMR-Daten gezeigt (Abb. 3-36).

	chem. Verschiebung δ (ppm)	Zahl der Protonen
$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{O} = \text{S} = \text{O} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} - \text{P} = \text{O} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} \end{array} $	3,14 Singulett	3
	3,54 Duplett	2
	4,17 Multiplett	4
	1,30 Triplet	6

Abb. 3-36: Zuordnung der ^1H -NMR-Daten und Struktur des Sulfonphosphonates 1.

Tab. 3-10: Hergestellte Sulphonphosphonate

Substituent R ¹	Masse des Derivats (theor. / exp.)	NMR-Kontrolle
1 Methyl	230,3/230,5	✓
2 Ethyl	244,2/244,4	✓
3 Butyl	272,2/272,6	✓
4 Tert.Butyl	272,2/272,5	✓
5 Phenyl	292,2/292,3	✓

3.2.8.3 Horner-Emmons-Reaktion an fester Phase

Die Sulphonphosphonate werden mit den α -Hydroxy- β -aminoaldehyden den Bedingungen der Horner-Emmons-Reaktion zur Herstellung von Vinylsulfonderivaten unterworfen.

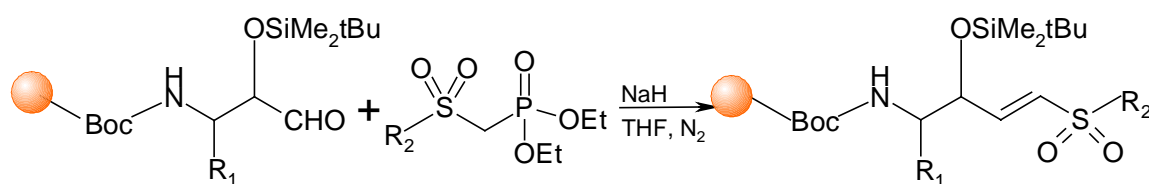


Abb. 3-37: Derivatisierung harzgebundener α -Hydroxy- β -amino-aldehyde mittels Horner-Emmons-Reaktion.

Hierzu wird der polymergebundene α -Hydroxy- β -amino-Aldehyd in einer Lösung aus 5 eq Phosphonat und 5 eq NaH in THF unter Inertbedingungen suspendiert und 15 h geschüttelt. Die Umsetzung zeigt sich im IR-Spektrum durch die dazukommenden Valenzschwingungsabsorptionen der Sulfongruppe

bei 1320 und 1150 cm^{-1} . Beispielhaft ist das FT-ICR-MS eines desilylierten Vinylsulfons in Abb. 3-38 gezeigt. Dazu wird Z-geschütztes Lysin als Aminosäurekomponente mit Sulfonylphosphonat 5 (Tab. 3-1) umgesetzt. Die Reinheit wird mittels HPLC auf 89 % bestimmt.

Tab. 3-11 zeigt die Reinheiten und Molekülmassen weiterer Vinylsulfon-derivate. Die beschriebene Synthesestrategie ermöglicht es eine insgesamt 10-stufige Reaktionsfolge am polymeren Träger durchzuführen. Insgesamt lassen sich mit dieser zweiten Modifikationsmethode Vinylsulfonderivate in guter Reinheit herstellen.

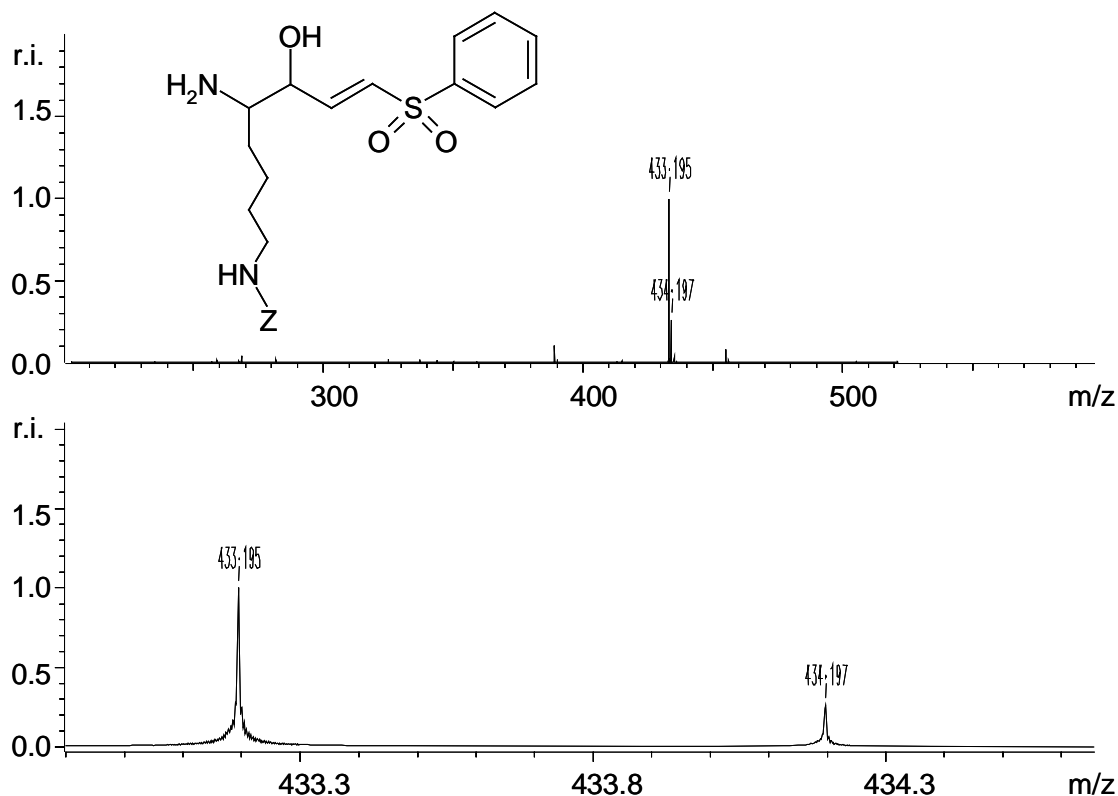


Abb. 3-38: Struktur und FT-ICR-MS des mittels Horner-Emmons-Reaktion derivatisierten 2-(*tert*-Butyl-dimethylsilyl)-2-hydroxy-4-phenyl-butanals. Oben: Struktur und Übersichtsspektrum; unten: erster und zweiter Isotopenpeak der Verbindung. ($[\text{M}+\text{H}]^+$ theor.: 433,194; exper: 433,195)

Tab. 3-11: HPLC-Reinheiten bei 214 nm und Molekülmassen aller aus α -Hydroxy- β -aminoaldehyden hergestellten Vinylsulfonderivate.

Sulfon- phosphonat R ₂	Methyl 1	Ethyl 2	Butyl 3	tert.Butyl 4	Phenyl 5					
Aminosäure R ₁	(%)	[M+H] ⁺ (%)	[M+H] ⁺ (%)	[M+H] ⁺ (%)	[M+H] ⁺ (%)					
Phe	82	370,6	85	284,6	81	412,7	81	412,7	89	432,7
Val	81	322,6	84	336,6	82	364,6	80	364,6	90	384,6
Leu	81	336,6	81	350,6	80	378,7	82	378,7	86	398,7
Ile	82	336,6	80	350,6	79	378,7	79	378,7	90	398,7
Lys(Z)	84	485,7	82	499,8	82	527,8	82	527,8	93	547,8

3.2.9 Zusammenfassung

Es wird die Synthese eines in der Kombinatorischen Chemie bisher nicht angewendeten Ankers beschrieben, der in einer vierstufigen Synthese hergestellt werden kann. Diese polymere Boc-Gruppe erlaubt durch ihre hohe Stabilität gegenüber nukleophilen Reagenzien die Durchführung einer C₁-Kettenverlängerung an fester Phase.

Zur Belegung mit Aminosäureestern stehen zwei Methoden zur Auswahl:

Die Verwendung von Allylestern, welche für die Entschützung Pd(0)-Katalyse erfordern, oder der Gebrauch von Methylestern, die durch Natriumsilanolatlösung verseift werden.

Das mit Aminosäuren belegte Trägermaterial wird für die C₁-Kettenverlängerung nach Dondoni verwendet. Dazu wird Thiazol als maskierte Aldehydfunktion eingeführt und in einer dreistufigen Sequenz abgebaut. Die siebenstufige Synthese führt zu harzgebundenen silylierten α -Hydroxy- β -amino-Aldehyden. Diese Zwischensufe wird dann mittels reduktiver Aminierung oder Horner-Emmons-Reaktion zu Diaminen bzw. Vinylsulfonen modifiziert.

Für die Aminierung können sehr viele primäre Amine eingesetzt werden. Bei der Horner-Emmons-Reaktion werden zuerst mehrere Sulfonylphosphonate in Lösung erzeugt. Man gelangt so zu neuen Strukturen, welche als potentielle Enzymhemmer getestet werden können.

Damit ist das Ziel, eine vielstufige Festphasensynthese eines Inhibitors und einfache Derivatisierungssynthesen durchführen zu können, erreicht. Insgesamt weisen alle hergestellten Produkte eine befriedigende bis gute Reinheit auf.

3.3 Kombinatorische Synthese von Tripeptidanaloga

3.3.1 Wirkung und Verwendung von Peptidyl-vinylsulfonen als irreversible Enzyminhibitoren

C-Terminal veränderte Tripeptide wurden bereits vielfach als Peptidomimetika bei der Inhibition von proteolytischen Enzymen eingesetzt. In der Natur kommen solche Verbindungen beispielsweise als Peptidylaldehyde wie Antipain und Leupeptin vor. Beide besitzen am Nachbarkohlenstoff zur Aldehydfunktion eine Argininseitenkette und unterscheiden sich in Art und Länge des peptidischen Rests [Ume72][Ume82]. Sie sind in der Lage wichtige Enzyme wie Trypsin, Cathepsin oder Plasmin zu inhibieren. Ihre Wirkung beruht auf der Imitation des tetraedrischen Übergangszustand in der Enzymreaktion durch die eine starke Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum des Enzyms entsteht.

Eine Klasse davon, die in der Lage ist Cystein-Proteasen zu inhibieren, sind neben Peptidyl-fluorketonen oder Peptidyl-(acyloxy)methyl-ketonen die Peptidyl-vinylsulfone [Pal95]. Bei dieser Gruppe handelt es sich um relativ neue, irreversible und spezifische Cystein-Protease-Inhibitoren, deren Wirkung auf der Vinylsulfongruppe beruht, die in einer Michael-Addition mit der Cystein-Seitenkette des aktiven Zentrums unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagiert. Die Nukleophilie und Toxizität der Vinylsulfone ist im Vergleich zu analogen Vinylketonen oder Estern geringer, ihre Selektivität aber höher [Brö96] [Ott97]. Im Tiermodell wurde ihre Wirksamkeit bewiesen [Ols99] [Eng98]. Es konnte damit eine deutliche Minimierung der Krankheitserreger oder eine Heilung erzielt werden.

Neben der Verwendung im Test als Inhibitor sind auch Arbeiten zur Kristallstruktur von Proteasen und Inhibitoren publiziert. Die Arbeit von McGrath et al. [McG98] beschreibt die Kristallstruktur von humanem Cathepsin S in der Wechselwirkung mit dem Vinylsulfon 4-Morpholincarboxyl-Phe-hPhe-vinylsulfon-phenyl (APC2848). Hierbei handelt es sich um einen irreversiblen

Inhibitor, welcher nach dem oben beschriebenen Mechanismus mit der Cys25-Seitenkette in der Bindungstasche der Protease reagiert.

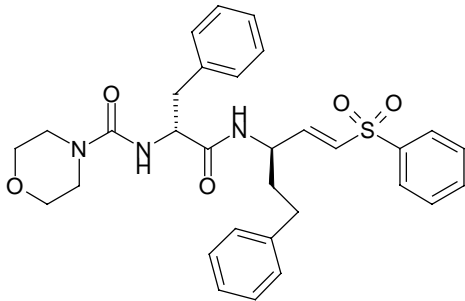


Abb. 3-39: Struktur des irreversiblen Cathepsin S Inhibitors APC 2848.

Der Inhibitor ist in dieser Papain-ähnlichen Cystein-Protease selektiv für diese Bindungsstelle, da er nicht mit gewöhnlichen Cystein-Seitenketten oder mit Serin-Proteasen in Wechselwirkung tritt, weil dieser Enzymteil eine erhöhte Nukleophilie im Vergleich zu anderen Cystein-Seitenketten besitzt.

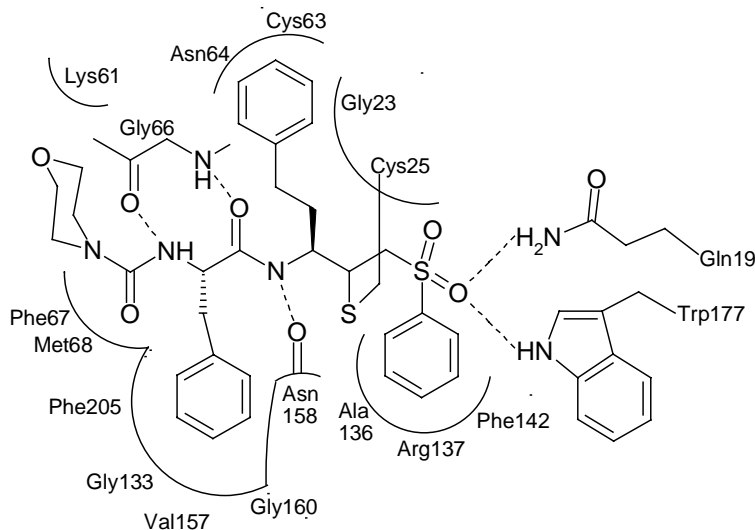


Abb. 3-40: Schematische Darstellung aus der Röntgen-Kristallstruktur des Inhibitors APC 2848 in der Bindungstasche von Cathepsin S liegend.

Abb. 3-40 zeigt den Inhibitor in der Bindungstasche des Enzyms basierend auf einer Kristallstruktur dieses Komplexes. Neben der Bindung von Cys25 zum Inhibitor treten noch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen verschiedenen

Molekülteilen und der Enzymbindungstasche auf. Besonders interessant sind dabei die Wechselwirkungen der Sulfongruppe mit Gln19 und Trp177 [Brö96].

3.3.2 Synthesemöglichkeiten zur Herstellung C-terminal modifizierter Peptide

In der Lösungssynthese werden modifizierte Peptide so synthetisiert, dass Boc-geschützte Aminosäuren über vier Stufen zu Amino-vinylsulfonen umgesetzt werden. Diese Bausteine können anschließend bei der Reaktion mit unterschiedlichen Peptidfragmenten verwendet werden, die durch Standardpeptidsynthese zugänglich gemacht werden [Brö96].

Für die Übertragung dieser Methode auf die feste Phase soll die in Abschnitt 3.2.5 eingeführte polymergebundene Boc-Schutzgruppe eine Rolle bei der Herstellung dieser Tripeptidanaloga spielen. Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine hohe Kompatibilität der Ankergruppe mit den Synthesebedingungen in Lösung bei Verwendung von Boc-Schutzgruppen, weshalb zuerst Tripeptide invers an fester Phase aufgebaut werden sollen. Abb. 3-41 zeigt den Weg unter Verwendung einer polymergebundenen Aminosäure als Ausgangsmaterial. Die Herstellung der entsprechenden Aldehyde nach Weinreb folgt als nächster Schritt. Hierzu wird zum Weinreb-Amid modifiziert, durch Lithiumaluminiumhydrid zum Aldehyd reduziert und dann erfolgt die Horner-Emmons-Reaktion mit Sulfonphosphonaten zur Einführung der Vinylsulfongruppe. Nach der Abspaltung vom Trägermaterial kann dann noch eine N-terminale Modifikation durch Acylierung durchgeführt werden.

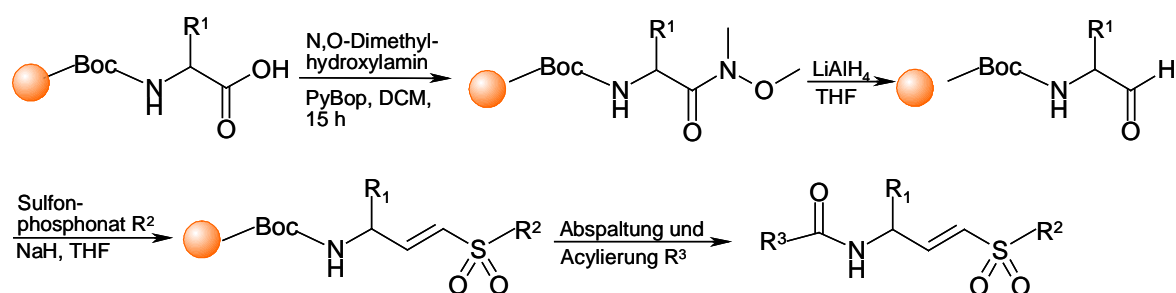


Abb. 3-41: Beispiel einer Synthese von Vinylsulfonen. Statt einer Aminosäure kann auch ein Peptidfragment als Ausgangsmaterial dienen.

Mit dieser Synthesestrategie können Aminosäurevinylsulfone erzeugt werden. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse über die Reaktionsbedingungen werden anschliessend für die in Kapitel 3.3.4 erzeugten harzgebundenen Tripeptide verwendet.

3.3.3 Herstellung harzgebundener Aminoaldehyde

Der erste Schritt, die Weinreb-Amid-Bildung ist bereits aus Kapitel 3.2.7.1 bekannt. Die folgende Reduktion zur Aldehydfunktion muß erst den Bedingungen der Festphasenchemie angepasst werden. Literaturbekannt sind Reduktionen in Lösung von Weinreb-Amiden zu Aldehyden unter der Verwendung von Diisopropylaluminiumhydrid [Ben93] oder Lithiumaluminiumhydrid [Nah81] [Nuz89]. Beide Reduktionsmittel werden dabei als 1 molare Lösung in THF bei 0 °C zum Boc-geschützten Aminosäure-Weinrebamid gegeben, wobei man je nach verwendeter Aminosäure Ausbeuten zwischen 70 und 90 Prozent erhält. Ähnliche Bedingungen sollen auch für die Festphasensynthese übernommen werden.

Unter Inertbedingungen wird das Harz mit jeweils 5 eq eines Reduktionsmittels in THF suspendiert und 2 h geschüttelt. Eine IR-Kontrolle der beiden Ansätze zeigt, dass bei der Verwendung von DIPAL eine Abspaltung vom Trägermaterial

auftritt, da die Urethanabsorption der Ankergruppe im IR-Spektrum vollständig fehlt. Die mit Lithiumaluminiumhydrid behandelte Harzprobe zeigt dagegen keine Veränderung ihres IR-Spektrums in diesem Bereich, jedoch kann ein Verschwinden der Weinreb-Amid-Absorption bei 1660 cm^{-1} beobachtet werden. Wie bei der in Kapitel 3.2.7.5 beschriebenen Kettenverlängerung nach Dondoni kann auch hier die C=O-Valenzschwingung der Aldehydfunktion nicht detektiert werden, da die neu entstehende Carbonylabsorption mit der Bande der Ankergruppe zusammenfällt und damit nicht sichtbar ist.

Um einen schnellen Nachweis des Aldehyds zu ermöglichen, wird dieser mittels eines Dinitrophenylhydrazonderivats nachgewiesen. Dazu wird mit 10 eq Dinitrophenylhydrazin in DMF unter HOAc-Katalyse umgesetzt. Nach der Abspaltung kann das entsprechende Hydrazonderivat mittels HPLC und ESI-MS nachgewiesen werden. Abb. 3-43 zeigt beides exemplarisch und Tab. 3-12 gibt die Reinheiten weiterer Hydrazonderivate wieder. Insgesamt lassen sich mit dieser Methode Aminoaldehyde in sehr guter Reinheit herstellen, wobei im Vergleich zu anderen Methoden dieser Weg schneller und zuverlässiger ist und eine Überreduktion zum Alkohol nicht auftritt.

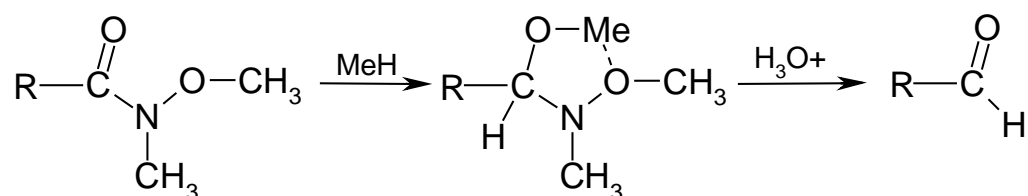


Abb. 3-42: Bildung eines Metallchelatkompleses bei der Reduktion zu Aldehyden

Von Nahm et al. [Nah81] wird dies damit erklärt, dass sich beim Reduktionsschritt ein fünfgliedriger Metallchelatkomplex bildet (Abb. 3-42).

Die erklärt die bei der Reaktion in Lösung, und auch bei der Festphasenreaktion entstehende Gelbfärbung während des Syntheseschrittes, welche bei Reaktionsabbruch sofort verschwindet.

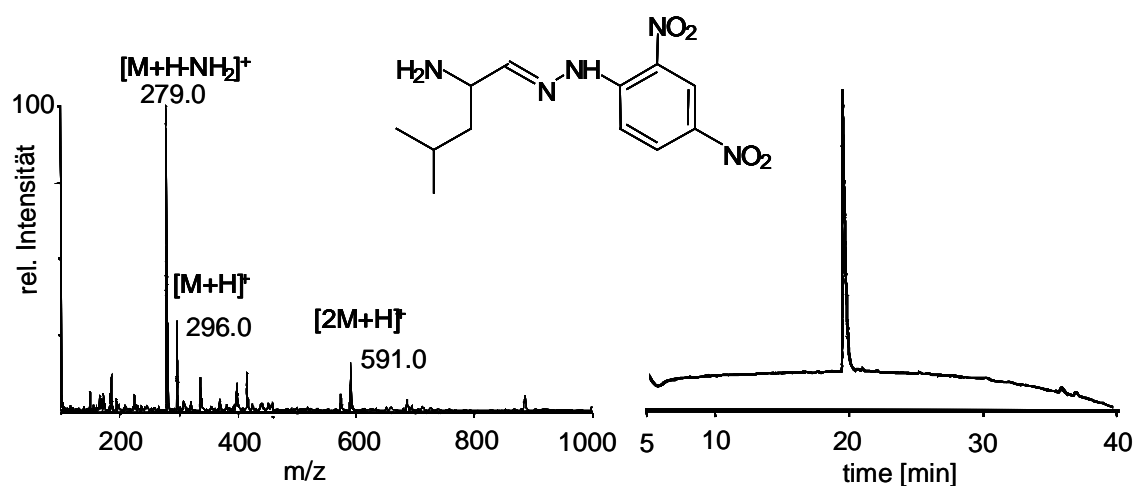


Abb. 3-43: HPLC und ESI-MS des Dinitrophenylhydrazonderivats von Leucinal.

Tab. 3-12: HPLC-Reinheiten (% , 214 nm) und Molekülmassen der aus Aminoaldehyden hergestellten Dinitrophenyl-hydrazonderivate

Aminosäure	Val	Leu	Phe	Lys(Z)	Ile	Met
HPLC-Reinheit (%)	99	98	97	96	97	95
Masse (exp. [M+H ⁺])	282,3	296,3	330,3	445,5	296,3	314,3

3.3.3.1 Derivatisierung harzgebundener Aminoaldehyde

Die in Abschnitt 3.3.3 hergestellten Aldehyde werden durch Horner-Emmons-Reaktion, reduktive Aminierung und Pictet-Spengler-Reaktion in weitere Verbindungen überführt.

a. Horner-Emmons-Reaktion

Die in Kapitel 3.2.8.2 gezeigte Derivatisierung kann ebenfalls eingesetzt werden. Das Harz wird mit einer Lösung aus 10 eq Phosphonat, NaH in THF suspendiert und 16 h geschüttelt und anschliessend erfolgt nach der Abspaltung die Charakterisierung der Produkte mittels HPLC und ESI-MS.

Es werden alle erwarteten Molekülmassen detektiert und gute Reinheiten der Aminovinylsulfone festgestellt (Tab. 3-13).

Tab. 3-13: HPLC-Reinheiten (% , 214 nm) und Molmassen der hergestellten Aminovinylsulfone. (verwendete Phosphonate siehe Tab. 3-10)

Phosphonat	1		2		3		4		5	
Aminosäure	[%]	[M+H] ⁺	[%]	[M+H] ⁺	[%]	[M+H] ⁺	[%]	[M+H] ⁺	[%]	[M+H] ⁺
Phe	72	226,3	72	240,3	75	268,4	74	268,4	83	288,4
Val	70	178,3	71	192,3	74	220,4	73	220,4	81	240,4

b. reduktive Aminierung

Diese Derivatisierung von Aldehyden an fester Phase kann unter den gleichen Reaktionsbedingungen (vergl. Kapitel 3.2.8.1) durchgeführt werden.

Tab. 3-14: HPLC-Reinheiten (% , 214 nm) und Molmassen der mittels reduktiver Aminierung hergestellten Aminoaldehydderivate

Amin	Thiazol-2-ethylamin		4-Ethylamin-Methoxybenzol		n-Butylamin	
Aminosäure:	[%]	[M+H] ⁺	[%]	[M+H] ⁺	[%]	[M+H] ⁺
Phe	69	262,4	67	285,4	63	207,3
Val	66	214,4	65	237,4	61	159,3
Met	64	246,4	66	269,4	63	191,4

Nach der Abspaltung werden die Produktreinheiten und ihre Molekülmassen bestimmt, wobei insgesamt alle Produkte befriedigende Reinheiten zeigen (Tab. 3-14).

c. Pictet-Spengler-Reaktion

Abschließend kann ausgehend von den harzgebundenen Aminoaldehyden die Cyclisierungsreaktion zu Tetrahydro(β)-carbolinen durchgeführt werden. Diese Synthese wurde bereits gezeigt von Redemann [Red97] an fester Phase gezeigt, der allerdings einen aufwendigeren Zugang zu den harzgebundenen Aldehydbausteinen beschreibt.

Diese interessante alkaloidähnliche Verbindungsklasse findet sich in einigen biologisch aktiven Verbindungen, wie Eudistomidin, wieder.

Zur Synthese wird der harzgebundene Aldehyd mit einer Lösung aus 10 eq Tryptamin in THF/TMOF (50:50) suspendiert und 16 h geschüttelt. Diese Iminbildung wird wiederholt, das Harz dann gewaschen und anschliessend die Pictet-Spengler-Cyclisierung durch den Zusatz einer HOAc/THF-Lösung (5:95) durchgeführt. Innerhalb von 6 h bilden sich damit die gewünschten Tetrahydro(β)-carboline.

Im letzten Schritt erfolgt eine Acylierung mittels Säurechloriden. Hierzu wird eine Lösung aus 2 eq Säurechlorid, 3 eq DIEA in DCM zum Harz gegeben. Somit kann die Diversität dieser Verbindungskollektion nochmals gesteigert werden, ohne eine zweite Acylierung am Indolstickstoffatom als unerwünschte Nebenreaktion zu beobachten (Abb. 3-44). Es wird eine Einzelverbindungskollektion aus 4 Aminosäuren, 4 Tryptaminen und Thiophen-2-säurechlorid hergestellt und charakterisiert. Das ESI-MS zeigt jeweils die korrekten Massen der Carbolinderivate. Die erzielten HPLC-Reinheiten sind in Tab. 3-15 dargestellt. Zusätzlich zeigt Abb. 3-45 das FT-ICR-MS eines Tetrahydro(β)-carbolins.

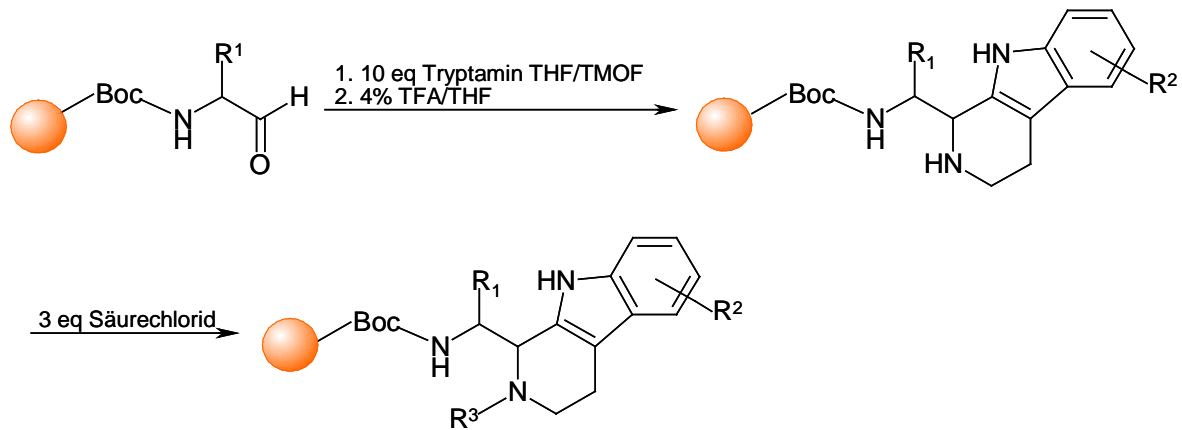


Abb. 3-44: Synthese von Tetrahydro(β)-carbolinen durch die Umsetzung harzgebundener Aminoaldehyde mit Tryptaminen in einer Pictet-Spengler-Cyclisierung. Anschliessend erfolgt eine Acylierung des sekundären Stickstoffatoms im neugebildeten Sechsring.

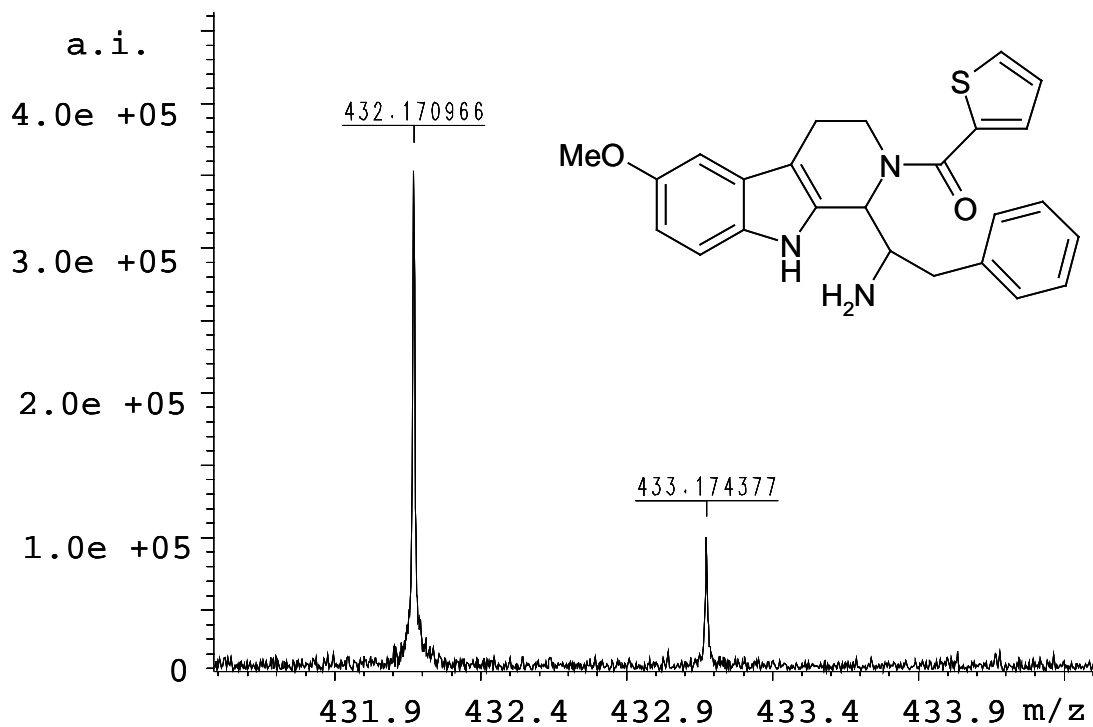


Abb. 3-45: FT-ICR-MS und Struktur eines Tetrahydro(β)-carbolins. ($[M+H]^+$ theor.: 432,170955; exper.: 432,170966)

Tab. 3-15: HPLC-Reinheiten (% , 214 nm) und Molmassen der hergestellten Tetrahydro(β)-Carboline

Tryptamin R²	5-Methyl-		5-Methoxy-		5-Hydroxy		Tryptamin	
Aminosäure R¹:	[%]	[M+H] ⁺	[%]	[M+H] ⁺	[%]	[M+H] ⁺	[%]	[M+H] ⁺
Val	73	462,5	76	378,5	70	364,5	79	348,5
Met	75	400,6	77	416,6	71	402,6	78	386,6
Phe	74	416,6	76	432,6	72	418,6	77	402,6
Lys(Z)	73	525,7	71	540,7	71	527,7	78	511,7

Insgesamt wurden in diesem Abschnitt Möglichkeiten zur Derivatisierung harzgebundener Aminoaldehyde mit befriedigenden bis guten Reinheiten gezeigt.

3.3.4 Synthese von Tripeptiden an fester Phase

Um zu den in der Einleitung dieses Kapitel angesprochenen Strukturen von Peptidomimetika zu gelangen, ist es notwendig harzgebundene Tripeptide aufzubauen, an welchen die C-terminale Modifikation zu Vinyl-Sulfonen erfolgen soll. Da es sich um eine inverse Peptidsynthese handelt, muß versucht werden, die dabei auftretenden Probleme zu minimieren. Normalerweise wird in der Peptidchemie diese Syntheserichtung nicht angewendet, weil durch die längere Aktivierungsdauer der Carboxy-Gruppe die Gefahr der Racemisierung am α -Kohlenstoffatom sehr hoch ist. Der Urethan-Ankerbaustein der polymergebundenen Boc-gruppe unterdrückt diese Racemisierung für die erste Aminosäure. Deshalb werden für den Peptidaufbau käufliche Dipeptidmethylester eingesetzt.

Bei der inversen Festphasenpeptidsynthese muß die Carboxy-Gruppe der harzgebundenen Aminosäure aktiviert werden, während in der nicht-inversen

Festphasenpeptidsynthese ein Überschuß von 5-10 eq aktivierte, N-geschützte Aminosäure mit dem N-Terminus der trägergebundenen Peptidkette zur Reaktion gebracht werden können.

Eine unvollständige Aktivierung in der inversen Synthese wirkt sich sofort auf die Produktreinheit aus.

Es werden für den Aktivierungsschritt drei Kupplungsreagentien untersucht: DIC/HOBt, TBTU und Pentafluorphenoltrifluoracetat. Mit Standardsyntheseprotokollen werden Testkupplungen durchgeführt und anhand der erhaltenen Produktreinheiten die geeignetste Methode ausgewählt. Es zeigt sich, dass DIC/HOBt- und TBTU-Aktivierung zu deutlich schlechteren Reinheiten führen als die Pfp-Aktivierung.

Für diese Methode wird mit Aminosäure belegtes PS-Boc-Harz in einer Lösung aus 15 eq Pentafluorphenoltrifluoracetat, 30 eq Pyridin in DMF suspendiert und geschüttelt, nach 2 h die Reaktion abgebrochen und das Harz für 7 h mit 10 eq Dipeptidmethylester, DIEA und DMF versetzt (Abb. 3-47).

FT-IR-Messungen während der Pfp-Aktivierung zeigen, dass das Maximum der Carbonylabsorption des Aktivesters, die Intensität der Bande bei 1790 cm^{-1} , bei einer Reaktionszeit von sechs Stunden erreicht war.

Die Charakterisierung durch Dünnschichtchromatographie zeigt bei keinem dieser Produkte eine Epimerisierung. Das FT-ICR-MS von Leu-Leu-Leu-OMe ergibt nur die gewünschte Produktmasse (Abb. 3-46 a).

Der nächste Schritt, die Esterverseifung, wird analog zu Kapitel 3.2.6 mit Natriumtrimethylsilanolat durchgeführt. Auch hier ergeben sich keine Nebenprodukte. Abb. 3-46 b zeigt das FT-ICR-MS von Leu-Leu-Leu.

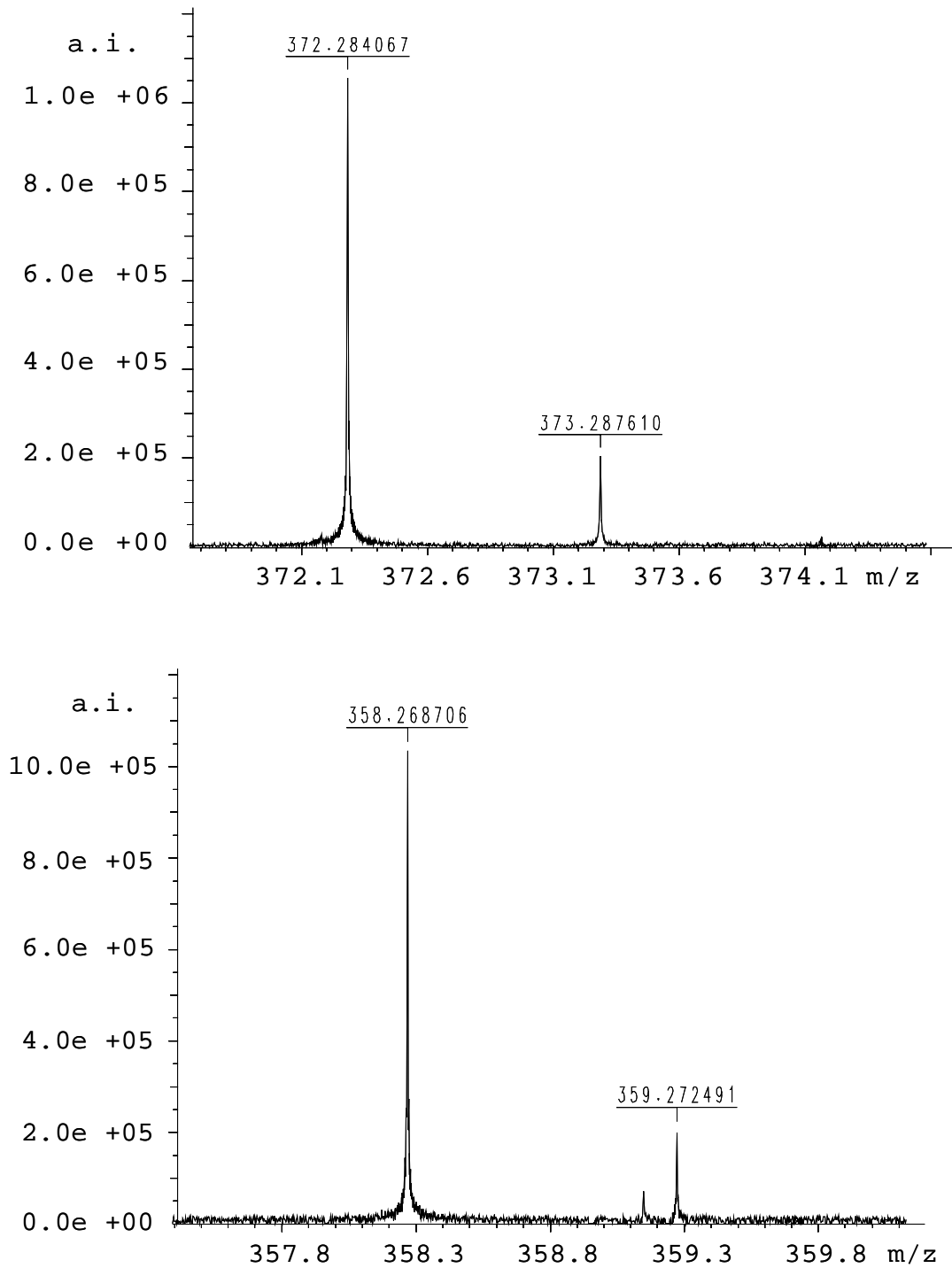


Abb. 3-46: FT-ICR-MS von Leu-Leu-Leu-OMe ($[M+H]^+$ theor.: 372,284101; exper.: 372,284067) (oben) und Leu-Leu-Leu ($[M+H]^+$ theor.: 358,268680; exper.: 358,268706) (unten)

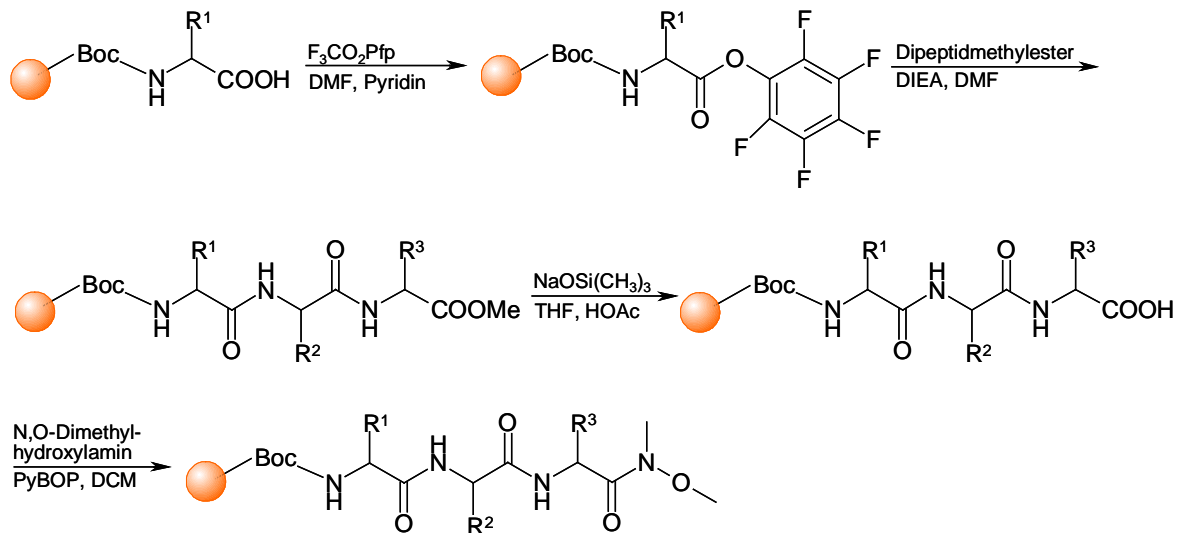


Abb. 3-47: Synthese von Tripeptid-Weinrebamiden, ausgehend von Boc-polymergebundenen Aminosäuren.

Dagegen verursacht der Syntheseschritt zu polymergebundenen Tripeptid-Weinrebamiden eine Racemisierung der letzten Aminosäure. Neben der am Ende verwendeten Aktivierung mit PyBOP/HOBt ergibt auch Versuche mit Pfp-Estern, DIC/HOBt oder HATU keinen vollständigen Erhalt der Konfiguration der letzten Aminosäure und es werden stets 40–50 % Racemisierung beobachtet. Zurückführen lässt sich dies darauf, dass N,O-Dimethylhydroxylamin als schwach nukleophiles Amin langsamer als eine normale Aminosäure reagiert. Die aktivierte Spezies der letzten Aminosäure besitzt eine längere Lebensdauer und hat dadurch eine größere Chance zur Racemisierung.

Analog zu Kapitel 3.3.3 folgt die Reaktion der harzgebundenen Tripeptid-Weinreb-Amide durch Lithiumaluminiumhydrid zu Aldehyden. 5 Äquivalente einer 1 molaren $LiAlH_4$ -Lösung in THF reduzieren bei 0 °C innerhalb von zwei Stunden das Amid. Es kann keine direkte Charakterisierung des Tripeptidaldehyds erfolgen und erst Derivatisierungsreaktionen zeigen den Erfolg der Reaktionssequenz.

3.3.5 Synthese von Tripeptidvinylsulfonen

Durch die oben gezeigte Horner-Emmons-Reaktion können die hergestellten Tripeptidylaldehyde zu einem stabilen abspaltbaren Tripeptidvinylsulfon modifiziert werden. Hierzu wurde das Harz mit einer Lösung aus 5 eq Sulfonphosphonat und NaH in THF suspendiert und 16 h geschüttelt (Abb. 3-48).

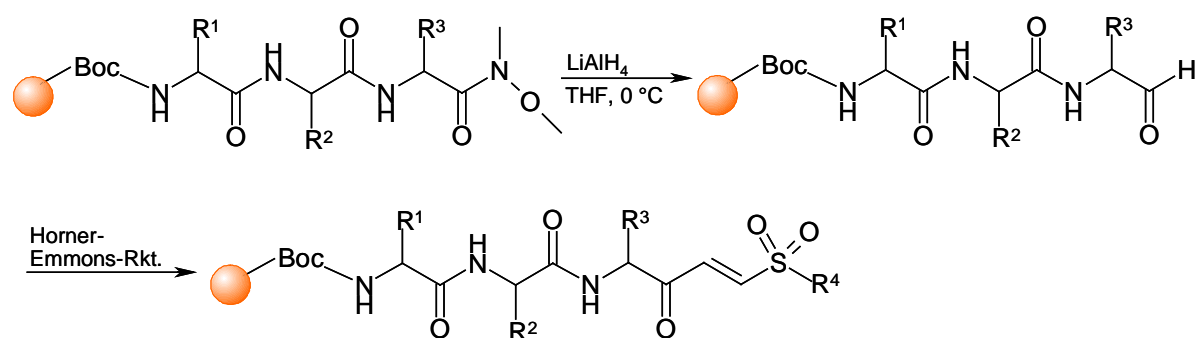


Abb. 3-48: Synthese von Tripeptidvinylsulfonen ausgehend von polymergebundenen Tripeptid-Weinreb-Amiden.

Nach der Abspaltung vom Harz können die Produkte durch eine Charakterisierung mit HPLC und MS in guten Reinheiten nachgewiesen werden. Das Rohprodukt weist eine Reinheit von 85 Prozent auf. Die Reinheiten weiterer hergestellter Tripeptidvinylsulfone zeigt Tab. 3-16. Werden bei der Synthese Dipeptide mit Glycin als Baustein eingesetzt, so zeigt sich in keinem Fall die richtige Molekülmasse, sondern es bildet sich ein nicht näher untersuchtes Produktgemisch. Ähnliche Beobachtungen können auch bei der Synthese von einfachen Aminoaldehyden gemacht werden.

Die Inkompatibilität dieser Aminosäure mit der Reaktionssequenz muss beim Reduktionsschritt liegen.

Tab. 3-16: HPLC-Reinheiten in Prozent und Molmassen von synthetisierten Tripeptidvinylsulfonen. Es wurde immer der gleiche Sulfonphosphonatbaustein mit R=CH₃ verwendet (vergl. Abb. 3-35)

Peptidsequenz	Leu-Phe-Ala	Leu-Ala-Val	Leu-Phe-Phe	Leu-Val-Leu
Reinheit	75	71	81	70
Masse [M + H ⁺]	409,5	362,5	486,6	404,5

Peptidsequenz	Val-Phe-Ala	Val-Ala-Val	Val-Phe-Phe	Val-Val-Leu
Reinheit	76	73	80	71
Masse [M + H ⁺]	396,5	348,4	472,6	390,5

Peptidsequenz	Phe-Phe-Ala	Phe-Ala-Val	Phe-Phe-Phe	Phe-Val-Leu
Reinheit	76	73	82	71
Masse [M + H ⁺]	444,5	396,5	520,6	438,6

3.3.6 Beispiel der N-Acylierung von Tripeptidvinylsulfonen

Die abgespaltenen Vinylsulfonderivate können durch eine Acylierung des N-Terminus in Lösung modifiziert werden. Exemplarisch ist dies hier dargestellt:

Das entsprechende Hydrochlorid wird aus dem als Trifluoracetat anfallenden Peptid-Vinylsulfon hergestellt (Abb. 3-49). Das in Wasser/ACN (1:1) gelöste Produkt wird mit 0,2 M HCl-Lösung versetzt und bei 40 °C am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Dieser Schritt muß, um eine vollständige Umsetzung zu gewähren, noch zweimal wiederholt werden. Zur Kupplung einer Carbonsäure an den N-Terminus des Tripeptid-Vinylsulfons stehen zwei Methoden zur Wahl:

- I. Die Verwendung von EDC, welches ein wasserlösliches Harnstoffderivat bildet, oder
- II. der Einsatz von harzgebundenem DIC.

Bei diesem Polymerreagenz entfallen die normalerweise bei der Lösungssynthese notwendigen Aufarbeitungsschritte.

Verwendet wird die elegantere Methode mittels polymergebundener Kondensationsreagenz.

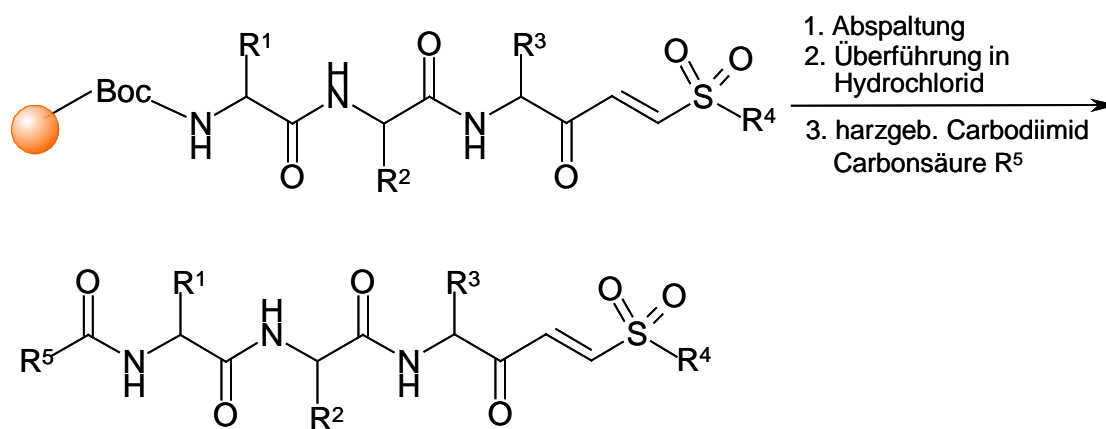


Abb. 3-49: N-Terminale Acylierung von Tripeptidylvinylsulfonen durch Carbonsäuren über harzgebundenen Carbodiimid.

Analog zu bekannten Synthesen von Amiden wird das Vinylsulfon mit der entsprechenden Carbonsäure und dem Harz suspendiert und 16 h geschüttelt [Shu97] [Des93]. Entgegen der Vorschrift von Desai et al. [Des93] kam kein selbst hergestelltes polymergebundenen EDC zum Einsatz, sondern mittlerweile käufliches harzgebundenen DIC. Durch eine Optimierung der eingesetzten Äquivalente an Carbonsäure und Harzmenge kann eine Verbesserung der Produktreinheit um 20 % erreicht werden. Abb. 3-50 zeigt das FT-ICR-MS von Phenylac-Leu-Leu-Leu-VS-CH₃. Es wird durch die Acylierung von Leu-Leu-Leu-VS-CH₃ mit 4-Nitro-5-hydroxy-6-iod-phenylelessigsäure hergestellt.

Anhand der ermittelten Molmasse konnte mit der Massenspektrometer-Software die korrekte Summenformel ermittelt werden. Als Ausgangsparameter wird die

theoretische monoisotopische Masse des einfach positiv geladenen Ions von 723,1915940 amu verwendet und eine Abweichung von diesem Wert um 0,001 erlaubt.

Tab. 3-17: Massenanalyse für die Masse 723,1915940

	¹⁶ O	¹⁴ N	¹ H	¹²⁷ I	³² S	¹² C	DBE	Fehler *10 ⁻⁴	Masse
1	10	3	37	0	2	35	19	1,068	723,1914872
2	7	5	45	0	5	28	9	1,097	723,1917037
3	5	10	31	0	2	34	24,5	1,120	723,1914820
4	7	0	52	1	3	28	2,5	1,581	723,1914359
5	2	7	46	1	3	27	8	1,633	723,1914307
6	0	0	49	2	0	35	10,5	2,208	723,1918148
7	8	4	44	1	1	28	8,5	3,109	723,1919049
8	10	6	48	1	2	20	-0,5	3,410	723,1912530
9	5	5	38	1	0	34	18	3,798	723,1912142
10	1	0	43	0	5	42	21,5	3,981	723,1911959
11	2	2	53	2	1	27	1	4,311	723,1911629
12	0	5	42	1	2	35	17	4,886	723,1920826

Dieser Toleranzbereich entspricht dem zehnfachen Fehler, der durch die interne Kalibrierung des Gerätes entsteht. Als Ergebnis erhält man 12 Vorschläge, welche im Massenbereich 723,1915940 amu +/- 0,001 amu liegen (Tab. 3-17). Unter der Annahme, dass alle 6 Elemente in der Verbindung vorhanden sind, verbleiben nur noch vier Vorschläge, unter welchen sich die Summenformel der hergestellten Verbindung befindet.

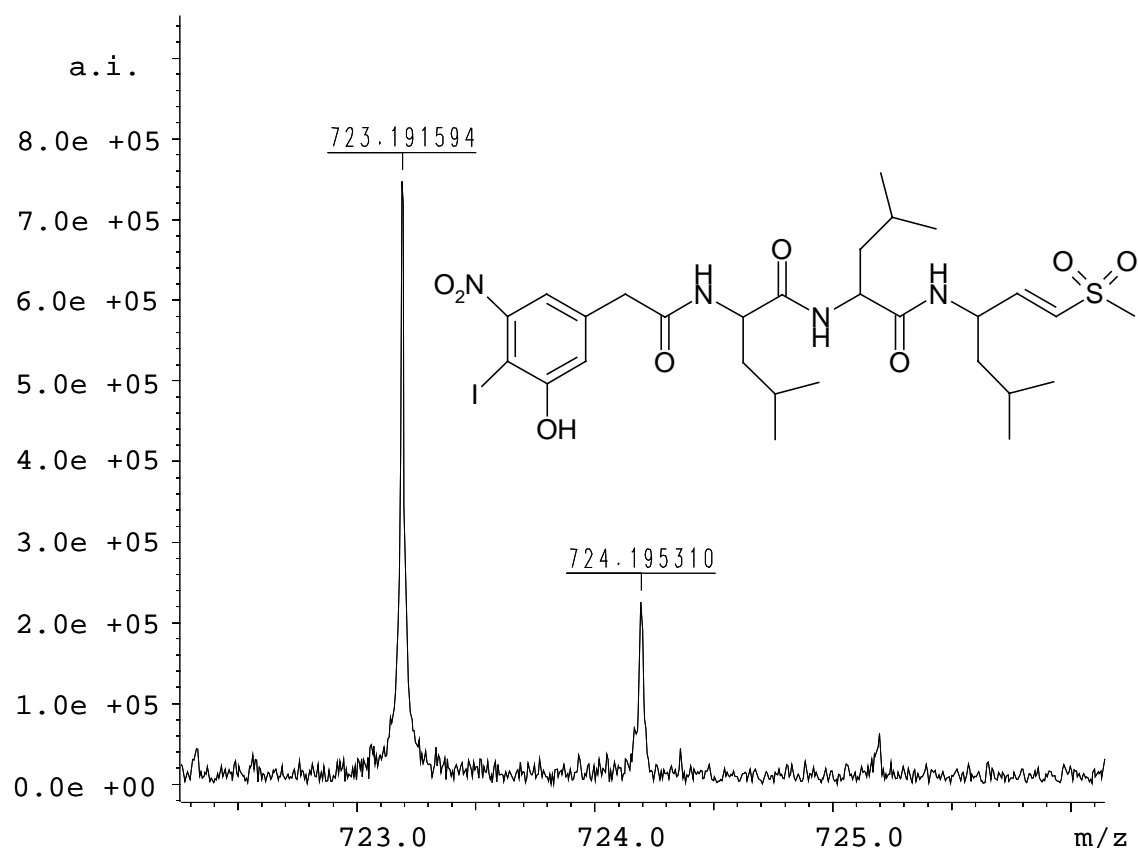


Abb. 3-50: FT-ICR-MS eines acylierten Tripeptidvinylsulfons; Abweichung von der theoretischen Masse: 0,43 ppm; $[M+H]^+$ theor.: 723,191904).

3.3.7 Zusammenfassung

Im ersten Abschnitt wird die Synthese von Aminoaldehyden an fester Phase gezeigt. Durch die Verwendung der polymergebundenen Boc-Schutzgruppe lässt sich die Reduktion von Weinreb-Amiden zu Aldehyden auf die feste Phase übertragen. Damit ist ein schnellerer Zugang zu dieser Verbindungsklasse möglich, die sich an fester Phase durch reduktive Aminierung, Horner Emmons- oder Pictet-Spengler-Reaktion modifizieren lassen. Damit können α -Aminoaldehyde in stabile abspaltbare Verbindungen überführt werden, welche befriedigende bis gute Produktreinheiten aufweisen.

Der zweite Teil beschäftigt sich mit der inversen Synthese von Tripeptid-Aldehyden an fester Phase. Durch die Kupplung von Dipeptidmethylestern auf polymergebundene Aminosäureaktivester werden Tripeptideinheiten erzeugt.

Die Verwendung von Pentafluorphenoltrifluoracetat zeigt die besten Kupplungsergebnisse. Die folgende Kupplung mit N,O-Dimethylhydroxylamin zum Weinreb-Amid verläuft mit guter Ausbeute, jedoch unter Racemisierung der C-terminalen Aminosäure. Abschließend wird die Reduktion dieser Zwischenstufe zum Tripeptidalddehyd durchgeführt.

Der letzte Abschnitt zeigt die Derivatisierung dieser polymergebundenen Tripeptidalddehyde durch ein Sulfonylchlorid zu Tripeptidvinylsulfonen, die in guten Reinheiten erhalten werden. Abschließend wird beispielhaft die Acylierung des N-Terminus gezeigt, wozu Carbonsäure und harzgebundenes Carbodiimid verwendet wird, um ohne weitere Aufarbeitungsschritte eine gute Produktreinheit zu erhalten.

Es gelingt somit ein Syntheseprotokoll für die Festphasensynthese von modifizierten Tripeptiden zu erstellen, wobei nur die Racemisierung einer Aminosäure von Nachteil ist.

3.4 Single-Bead-Analytik durch FT-ICR-MS von Split-and-Combine-Bibliotheken

Die Notwendigkeit für eine Einzelbead-Analytik liegt bei der Synthese und Charakterisierung von größeren Bibliotheken, für deren Herstellung zwei Ansätze möglich sind.

a. Die Synthese von Einzelverbindungen, welche einen hohen Material- und Zeitaufwand erfordert, jedoch die Zuordnung von Screening-Ergebnissen erleichtert.

b. Die Herstellung von Split-and-Combine-Bibliotheken. Hier ist der materielle Aufwand geringer, jedoch ist die Zuordnung von Testergebnissen teilweise schwierig.

Zur Lösung dieses Problems werden Taggingmethoden aller Art vorgeschlagen [Swa97] [Blo98]. Bei der in Kapitel 3.1.6 beschriebenen, orts aufgelösten IR-Mikroskopie werden IR-aktive Gruppen zur Verbindungsmarkierung verwendet. Ein Nachteil, fast aller Methoden, die ein Tag benutzen ist die Einschränkung in der Synthese, oder eine Limitierung der Bibliotheksgröße ist durch mangelnde Auswahl an IR-aktiven Edukten vorgegeben.

Um trotzdem die Vorteile beider Methoden, ohne die Schaffung neuer Problemen zu kombinieren, wurde eine exakte Bestimmung der Molekülmassen der Verbindungen durchgeführt. Nach der Synthese in der Split-and-Combine-Technik werden Harzbeads in separate Gefäße vereinzelt, das Produkt abgespalten und mit FT-ICR-MS kann die exakte Masse ermittelt und eine Zuordnung zwischen Rackposition und Struktur erfolgen.

3.4.1 FT-ICR-MS

Die Fourier-Transform-Ionen-Zyklotron-Resonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) ist eine Neuentwicklung auf dem Gebiet der Massenspektrometrie, durch die Kombination des schon länger bekannten Prinzips des Ionen-Zyklotrons [Som50][McI70] und der Fourier-Transformation zur Datenaquisition [Com75].

Die Ionenanalyse findet in einer Meßzelle statt, die sich in einem starken Magnetfeld befindet. Das benötigte Ultrahochvakuum (10^{-10} mbar) wird durch ein mehrstufiges Pumpsystem erreicht. Das Analysatorprinzip beruht auf der Messung der Zyklotronfrequenz, die zur Ionenmasse umgekehrt proportional ist. Zunächst sind die Ionen durch das „Trapping“ in der Zelle statistisch verteilt. Durch das Einstrahlen hochfrequenter Wechselfelder wird eine Fokussierung der Ionen zu sog. Ionenpaketen unter Aufweitung des Bahnradius erreicht.

Diese Ionenpakete induzieren in den Detektorplatten Bildströme. Die Frequenz der induzierten Wechselspannung steht im Verhältnis zur Molekülmasse der angeregten Ionen. Die Umrechnung des erhaltenen Interferogramms erfolgt durch Fourier-Transformation der Frequenz- in die m/z -Domäne.

Ingesamt lässt sich durch diese Methode eine Auflösungsverbesserung um ein Vielfaches erreichen. Gleichzeitig sinkt die benötigte Probenmenge um den Faktor 10.

Die Verwendung zusätzlicher Software erlaubt aus diesen hochaufgelösten Massenspektren auch die zuverlässige Erstellung der Summenformel einer Verbindung.

3.4.2 Untersuchung einer Split-and-Combine Pyrrolidin-Bibliothek

Ähnlich zu der hergestellten Bibliothek für die IR-Mikroskopie wird eine Kollektion bestehend aus 18 Einzelverbindungen synthetisiert. Als Basismaterial kommt monodisperses PS-Wang-Harz zum Einsatz (Durchmesser ca. 160 μm , Beladung je Bead ca. 2 nmol), um damit eine deutliche Variation der erhaltenen Verbindungsmengen zu unterbinden.

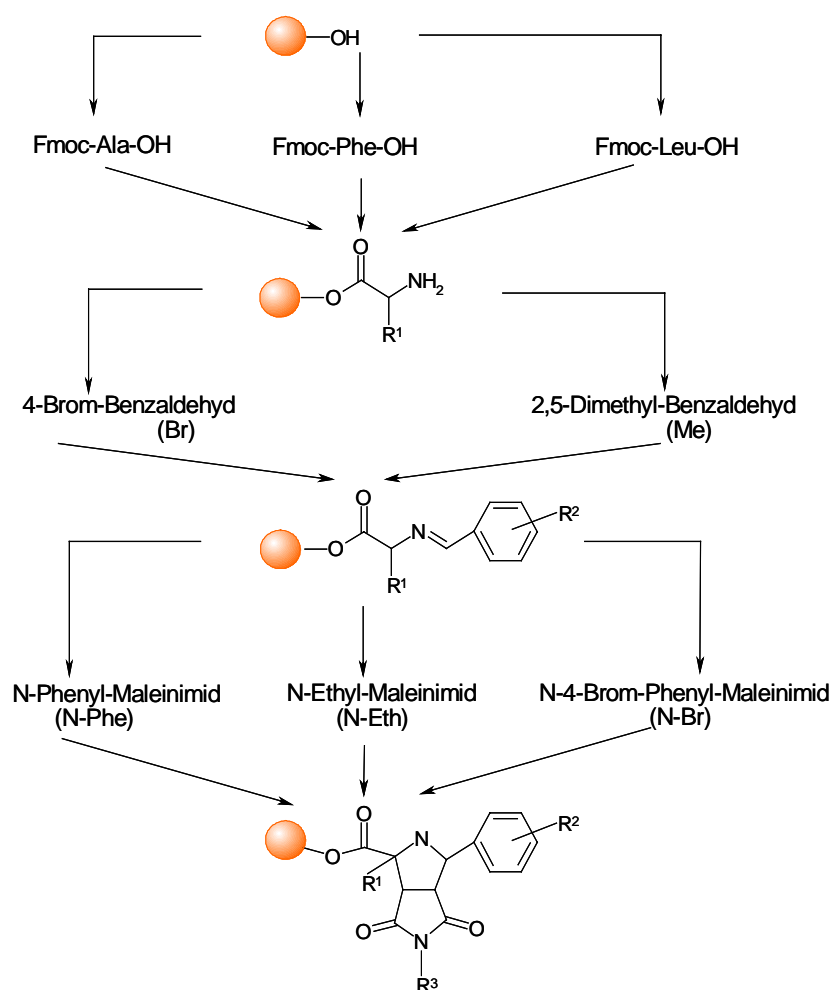


Abb. 3-51: Split and Combine-Syntheschema der auf monodispersem Wang-Harz hergestellten Pyrrolidin-Kollektion aus 18 Verbindungen.

Drei Harzportionen werden mit verschiedenen Fmoc-Aminosäuren belegt, nach der Entschützung erfolgt die Iminbildung mit 2 verschieden substituierten Benzaldehyden und abschließend die Cycloaddition zu den Endprodukten durch

den Zusatz von drei unterschiedlichen Maleinimiden, wodurch sich 18 verschieden substituierte Pyrrolidine ergeben (Abb. 3-51).

Einzelne Harzkugeln aus dieser Bibliothek werden mit Hilfe eines Mikromanipulators in HPLC-Vials überführt. Darin wird die Abspaltung durch den Zusatz von je 20 μl TFA/DCM (50:50) durchgeführt. Nach Entfernen dieses Lösungsmittelgemischs im Vakuum und der Zugabe von 50 μl ACN/Wasser (50:50) können die Proben analysiert werden. Ein an das FT-ICR-MS angeschlossener HPLC-Autosampler dient dabei als automatischer Probengeber, welcher 5 μl der Stammlösung dem Massenspektrometer zuführt.

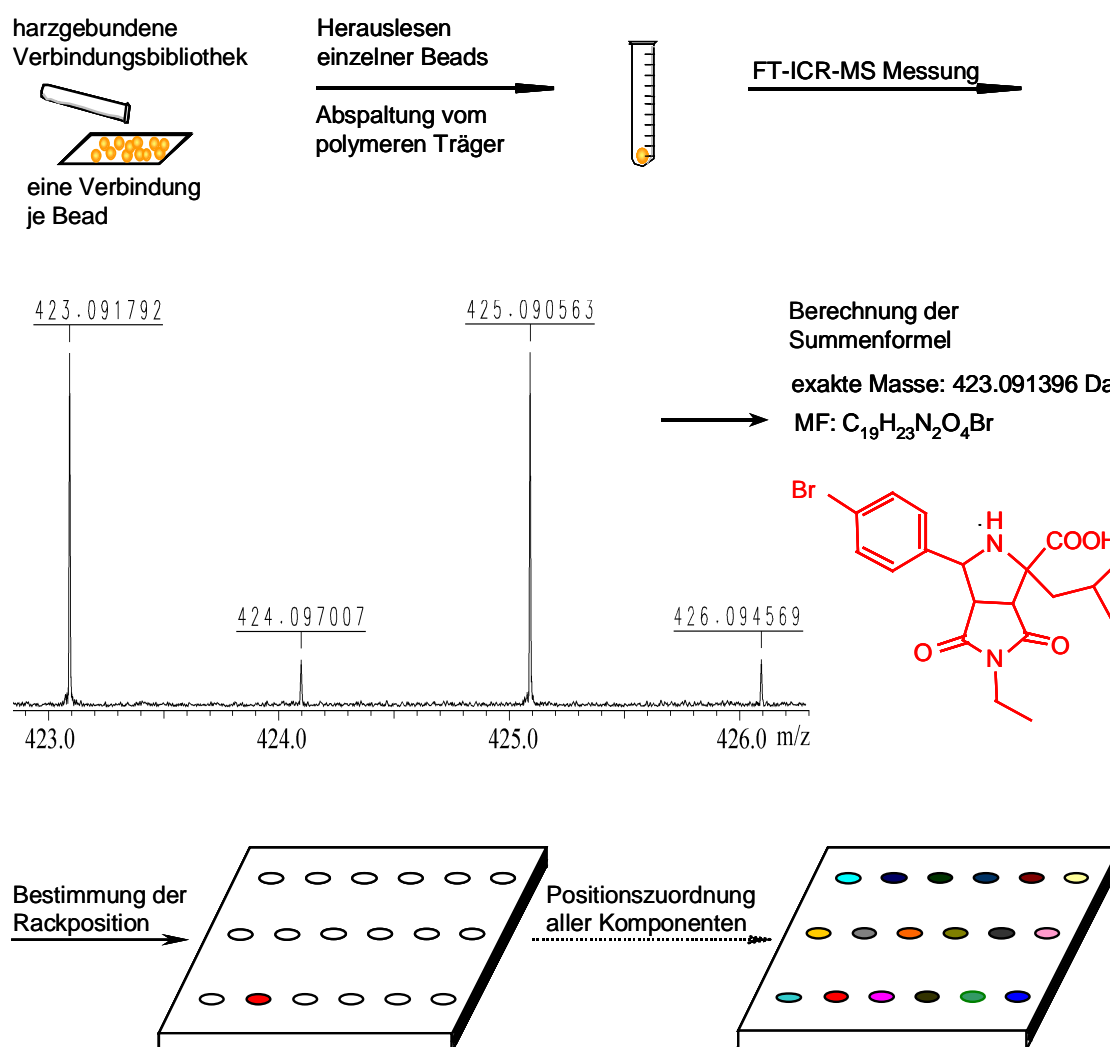


Abb. 3-52: Ablaufschema der Single-Bead-Analytik mit dem FT-ICR-MS.

Damit können innerhalb von 2 Minuten die Proben nacheinander hochaufgelöst vermessen und die Daten prozessiert werden.

Abb. 3-52 zeigt das Ablaufdiagramm dieses Prozesses im Einzelnen für eine Einzelverbindung der Bibliothek. Für jede Verbindung aus der exakten Masse daraus die Summenformel bestimmt werden.

Tab. 3-18: Auswertung der Pyrrolidinbibliothek. Die fünfte Zeile zeigt das Ergebnis des FT-ICR-MS von Abb. 3-52. (Produktabkürzungen siehe Abb. 3-51)

Produkt	Massen Analyse				Summenformel
	kalkul. Masse [M+H] ⁺	gefunden. Masse [M+H] ⁺	Δ Masse absolut	δ ppm	[M+H] ⁺
Leu_Me_N-Phe	421,212784	421,211585	0,000599	1,42	C25H29N2O4
Leu_Me_N-Eth	373,212184	373,211083	0,001101	2,95	C21H29N2O4
Leu_Me_N-Br	499,122696	499,120148	0,002548	5,10	C25H28N2O4Br
Leu_Br_Phe	471,091396	471,090037	0,001359	2,88	C23H24N2O4Br
Leu_Br_N-Eth	423,091396	423,090495	0,000901	2,13	C19H24N2O4Br
Leu_Br_N-Br	549,001909	549,001123	0,000786	1,43	C23H23N2O4Br2
Ala_Me_N-Phe	379,165234	379,165062	0,000172	0,45	C22H23N2O4
Ala_Me_N-Eth	331,165234	331,165649	0,000415	1,25	C18H23N2O4
Ala_Me_N-Br	457,075746	457,074431	0,001315	2,88	C22H22N2O4Br
Ala_Br_N-Phe	429,044446	429,045121	0,000675	1,57	C20H18N2O4Br
Ala_Br_N-Eth	381,044446	381,045845	0,001399	3,67	C16H18N2O4Br
Ala_Br_N-Br	506,954959	506,955279	0,000320	0,63	C20H17N2O4Br2
Phe_Me_N-Phe	455,196534	455,194066	0,002468	5,42	C28H27N2O4
Phe_Me_N-Eth	407,196534	407,195172	0,001362	3,34	C24H27N2O4
Phe_Me_N-Br	533,107046	533,104302	0,002744	5,15	C28H26N2O4Br
Phe_Br_N-Phe	505,075746	505,074929	0,000817	1,62	C26H22N2O4Br
Phe_Br_N-Eth	457,075746	457,074499	0,001247	2,73	C22H22N2O4Br
Phe_Br_N-Br	582,986295	582,987896	0,001601	2,75	C26H21N2O4Br2

Tab. 3-18 zeigt das Analyseergebnis für alle 18 Pyrrolidine. Alle Komponenten der Bibliothek können aufgrund ihrer Masse identifiziert, einer Struktur zugeordnet und ihre Rackposition bestimmt werden. Die Abweichung zwischen kalkulierter und gefundener Molekülmasse beträgt im schlechtesten Fall 5,1 ppm, was jedoch immer noch für die Bestimmung der Summenformel ausreicht. Die

noch übrigen 90 Prozent an abgespaltener Verbindung genügt, um im Screening eingesetzt zu werden. Bei positiven Rückmeldungen kann dann wie bei herkömmlichen Tests von Einzelverbindungen direkt auf die Struktur zurückgeschlossen werden.

3.4.3 Zusammenfassung

Dieses Kapitel zeigt die Möglichkeit zur Analytik von Verbindungskollektion über ES-FT-ICR-MS. Die Synthese der Verbindungsbibliothek geschieht über die Split and Combine-Methode und deren Charakterisierung anhand von FT-ICR-Messungen einzelner Harzbeads.

Die Erprobung erfolgt am Beispiel einer Pyrrolidinbibliothek, da sich diese Verbindungsklasse schon in Abschnitt 3.1.6 bewährt hatte. Die Grenze der demonstrierten IR-Methode liegt in der Anzahl unterscheidbarer IR-aktiver Gruppen der Edukte, was die Kollektionsgröße und Diversität verkleinert. Die Probenpräparation ist umfangreich und zeitaufwendig. Bei der Bestimmung der Molekülmasse können alle verfügbaren Edukte für Synthesen eingesetzt werden und die Probenbehandlung kann bei entsprechender Ausrüstung automatisiert erfolgen. Durch die hohe Auflösung des Spektrometers kann über die genaue Masse auch die Summenformel ermittelt werden. Mit diesen Informationen ist eine Zuordnung der Struktur zum Standort im Probenrack möglich. Die verbleibende Probenmenge ist für ein mögliches nachfolgendes Screening ausreichend. Diese Methode stellt eine gute Verknüpfung zwischen Split-and-Combine-Synthese und Einzelverbindungs Screening dar, mit der bei der zusätzlichen Verwendung paralleler Vereinzlungstechniken ein hoher Probendurchsatz ermöglicht wird.

4 Experimenteller Teil

4.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Die Lösungsmittel werden von Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze) in p.a. Qualität bezogen. Die wasserfreien Lösungsmittel ACN, DCM, Dioxan, DMF, DMSO, NMP, THF, Toluol wurden von Fluka (Neu-Ulm) bezogen. Für die HPLC wird Acetonitril und Methanol der Reinheit LiChrosolv Gradient Grade und Trifluoressigsäure der Reinheit Uvasol von Merck (Darmstadt) eingesetzt und entionisiertes Wasser über eine Kartuschenfiltrationsanlage von Millipore (Eschborn) aufgereinigt.

Alle Chemikalien und Reagenzien werden von Aldrich (Steinheim), Bachem (Bubendorf/CH), Fluka (Neu-Ulm), ICN (Eschwege), Lancaster (Mühlheim/Main), Maybridge (Trevillet/UK), Merck (Darmstadt), Novabiochem (Bad Soden) und Senn Chemikals (Dielsdorf/CH) bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Hydroxymethyl PS Harz und alle monodispersen Harze werden von der Firma Rapp Polymere (Tübingen) und Wang Harz von der Firma Novabiochem (Bad Soden) bezogen.

4.2 Analytik

4.2.1 Dünnschichtchromatographie

Verwendet werden fluoreszenzbeschichtete Kieselgelplatten, Kieselgel 60 F₂₅₄, 5 * 10 cm der Firma Merck (Darmstadt). Als Laufmittel dient ein Gemisch aus 20 ml CHCl₃/MeOH (9:1), welches mit 0,5 ml Ammoniakwasser (25%) versetzt wird.

4.2.2 FT-IR-Spektroskopie

Zur Verfolgung der Festphasenreaktionen werden FT-IR-Spektren der Harze mit einem Bruker Vector 22 Spektrometer aufgenommen. Das IR-Gerät ist mit Harrick's SplitPea® ATR-Einheit ausgerüstet, so daß die Probe direkt auf einen Si-Kristall gepreßt und vermessen werden kann. Die Auswertung erfolgt über die Opus-Software 3.01. Es werden 16-32 Scans aufsummiert und bei der Spektrenprozessierung eine automatische ATR-Korrektur durchgeführt.

Das FT-IR-Mapping wird mit einem Biorad FTS 135 als IR-Quelle und einem UMA-500 IR-Mikroskop durchgeführt. Hierzu werden Harzkugeln der Verbindungsbibliothek auf ein KBr-Fenster aufgepreßt und mithilfe eines motorgetriebenen x-y-Verstellschiebetisches abgerastert. Die Schrittweite beträgt 40 µm, pro Rasterpunkt werden 10 Scans bei einer Auflösung von 2 Wellenzahlen aufsummiert.

4.2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Sämtliche analytischen HPLC-Trennungen werden an einer System-Gold-Anlage (Beckman, Scan Ramon, USA) durchgeführt. Die Anlage setzt sich aus einem Autosampler 507, einer programmierbaren Pumpeneinheit 126 und einem Photodiodenarraydetektor 126 zusammen. Die Anlage ist mit einer analytischen Säule Nucleosil 300 C18 (5 µm Korngröße, 250 x 2 mm, Fa. Grom, Herrenberg) ausgestattet, die mit einer Flußrate von 300 µl/min betrieben wurde. Als mobile Phase wird ein Gradient von H₂O mit 0,1 % TFA (v/v) (Laufmittel A) und ACN mit 0,1 % TFA (v/v) (Laufmittel B) mit 10 % B auf 100 % B innerhalb 45 min gefahren. Die Reinheit der Produkte wird anhand der Peakflächen berechnet, welche bei einer Wellenlänge von 214 nm ermittelt wurden. Aufgrund unterschiedlicher Extinktionskoeffizienten sind keine absoluten Gehaltsangaben möglich.

Semipräparative HPLC-Trennungen werden an einem Waters (Eschborn) System, bestehend aus Multisolvant Delivery System 600 E, 712 Wisp Autosampler und Diodenarray Detektor, durchgeführt. Als Trennsäule dient eine Nucleosil C 18 Säule (5 µm Korngröße, 250 x 8 mm, Grom, Herrenberg), welche bei einer Flußrate von 3,5 ml/min betrieben wird. Die Gradienten werden dem jeweiligen Trennproblem angepasst.

4.2.4 Massenspektrometrie

Die druckluftunterstützte Elektrospray-Massenspektrometrie wird an einem API III TAGA 6000E Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit Ionspray-Ionisationsquelle (Sciex, Thornhill, Ontario, Canada) durchgeführt. Die zu untersuchenden Verbindungen werden in *tert.*-Butylalkohol/Wasser (4:1) gelöst. Für Autosamplermessungen erfolgt die Probenzufuhr über eine Infusionspumpe (Havard Apparatus, Southnatic, Massachusetts, USA) bei einem isokratischen Fluß (100 µl/min) eines Wasser/ACN-Gemisches (1:1) (0,1 % Ameisensäure). In Zeitabständen von 2 min werden über einen automatischen Probeninjektor (Model 231, Dilutor 401, Gilson, Villiers le Bel) jeweils 5 µl der Probe in den Laufmittelstrom injiziert. Das Potential der Spraynadel wurde auf 4,8 kV eingestellt und Orifice-Spannungen zwischen +70 und -70 V verwendet.

4.2.5 ESI-FT-ICR-Massenspektrometrie

Für ESI-FT-ICR-MS-Messungen wird ein APEX™ II Spektrometer der Firma Bruker Daltonic (Bremen) verwendet. Die Probenzufuhr erfolgt über eine HPLC-

Anlage HP 1100 der Firma Hewlett-Packard (Waldstetten). Dabei werden 5 μl einer Probe der Konzentration $c = 1 \mu\text{g/ml}$ injiziert und als mobile Phase ein Wasser/ACN-Gemisch (50/50) (0,1 % Ameisensäure) verwendet. Die Meßzeit beträgt jeweils 30 s bei 16 aufsummierten Scans.

4.2.6 NMR-Spektroskopie

Eindimensionale ^1H - ^{31}P - und ^{13}C -NMR-Spektren sind an einem Bruker AC 250 MHz Spektrometer aufgenommen.

4.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von Pyrrolidinen

4.3.1 Synthese von Einzelverbindungen

Wang-PS-Harz (Beladung 1,1 mmol/g; 100 mg; 0,11 mmol) wird in DMF suspendiert. Einer Lösung von Fmoc-AA-OH/HOBt in DMF (0,5 M; 1 ml; 10 eq) wird DIC (1,1 mmol; 10 eq) zugegeben, die gesamte Mischung zum Harz addiert und 5 h bei RT geschüttelt. Anschliessend wird das Harz intensiv mit DMF (10 x) gewaschen. Zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe wird eine Lösung von Piperidin in DMF (1:1) hinzugefügt und 30 min bei RT geschüttelt. Nach Waschen des Harzes mit DMF, THF, DCM, MeOH und Et₂O erfolgt die Umsetzung mit einer Lösung der Benzaldehyde (10 eq) in THF:TMOF (1:1; 2 ml) für 16 h bei RT. Dieser Schritt wird nach Waschen des Harzes mit TMOF (3 x) wiederholt. Danach wird das Harz mit THF und DCM mehrmals gewaschen. Für die Cycloaddition wird eine Lösung aus Maleinimid (12 eq) in Toluol (1 ml) zum Harz gegeben und 24 h bei 110 °C geschüttelt. Das Harz wird anschliessend intensiv mit Toluol, DMF, THF, DCM und Et₂O gewaschen (je 5 x). Die Abspaltung vom Harz erfolgt mit TFA/DCM (1:1; 1 ml) innerhalb 2 h bei RT. Das Filtrat wird im Vakuum zur

Trockne eingeengt, aus *tert.*-Butylalkohol/Wasser gefriergetrocknet und mit ES-MS und HPLC analysiert.

4.3.2 Synthese der Pyrrolidinbibliotheken

Wang-PS-Harz (Beladung 1,1 mmol/g; 500 mg; 0,55 mmol) wird in drei gleiche Portionen aufgeteilt und in DMF suspendiert. Anschliessend werden Lösungen von verschiedenen Fmoc-Aminosäuren, HOBT und DIC (5,5 mmol; 10eq) in DMF (0,5 M; 2 ml; 10 eq) zu den einzelnen Harzportionen zugegeben und 5 h bei RT geschüttelt. Anschliessend werden die Harzportionen intensiv mit DMF (10 x) gewaschen und vereinigt. Zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe wird eine Lösung von Piperidin in DMF (1:1) hinzugefügt und 0,5h bei RT geschüttelt. Nach Waschen des Harzes mit DMF, THF DCM, MeOH und Et₂O wird das Harz bis zu einem konstanten Gewicht im Vakuum getrocknet.

Es erfolgt dann die Aufteilung des Harzes in zwei gleich grosse Portionen. Die nachfolgende Iminbildung erfolgt mit Lösungen der Benzaldehyde (10 eq) in THF/TMOF (1:1; 3 ml) für 16 h bei RT. Dieser Schritt wird nach Waschen der Harzportionen mit TMOF (3 x) wiederholt. Danach werden die Harzportionen mit THF und DCM mehrmals gewaschen, vereinigt, bis zu einem konstanten Gewicht im Vakuum getrocknet und in drei gleich grosse Portionen aufgeteilt. Für die Cycloaddition werden Lösung aus Maleinimiden (12 eq) in Toluol (1,5 ml) zu den Harzportionen gegeben und 24 h bei 110 °C geschüttelt. Die Harzportionen werden anschliessend intensiv mit Toluol, DMF, THF, DCM und Et₂O gewaschen (je 5 x). Die Harzportionen werden vereinigt, mit DMF, THF, DCM und Et₂O gewaschen (je 5 x) und im Vakuum getrocknet.

Bei der Synthese von Bibliotheken mit abweichender Anzahl an Bausteinen je Synthesestufe wird die Vorschrift bei der Aufteilung der Harzportionen entsprechend verändert.

4.4 Arbeitsvorschrift zur Herstellung der Polymer-Boc-Schutzgruppe

a. Umsetzung von *tert.*-Butylacetessigester mit Brommethyl-PS Harz

Zu einer Suspension aus NaH (0,8 g; 33 mmol) in DMF wird unter Inertatmosphäre eine Lösung von *tert.*-Butylacetessigester (5,44 ml; 33 mmol) in wasserfreiem DMF (9 ml) zugetropft, so dass die Temperatur nicht über 50 °C steigt. Die Carbanionenbildung zeigt sich durch H₂-Entwicklung. Nach der Zugabe wird die Lösung noch 0,5 h bei RT weitergerührt. Unter Schutzgas ist diese Lösung bei 4 °C zwei Wochen lagerbar.

Zu Brommethyl-PS-Harz (Beladung 1 mmol/g; 2 g; 2 mmol), das unter Stickstoffatmosphäre in DMF (10 ml) suspendiert ist, werden 6 ml der Carbanionenlösung (9,9 mmol, 4,95 eq) zugegeben. Die Harzsuspension wird 4 h auf 50 °C erhitzt und anschliessend mit DMF, MeOH, DMF/HOAc (95:5), DCM und Et₂O gewaschen.

IR-Daten: $\nu = 3026, 2974, 2927, 1737, 1715, 1602, 1493, 1452, 1368, 1142, 758, 698$ cm⁻¹.

Elementaranalyse: 0 % Brom

b. Decarboxylierung zum Polymer-Methylketon-PS-Harz

Das oben hergestellte Harz wird in TFA/DCM (50:50) 1 h bei RT geschüttelt und anschliessend mit DCM, DCM/DIEA (97:3), DCM und Et₂O gewaschen (je 5 x).

IR-Daten: $\nu=3026, 2974, 2927, 1715, 1602, 1493, 1452, 1368, 1154, 758, 698$ cm⁻¹.

c. Umsetzung mit Methylmagnesiumchlorid

Polymer-Methylketon-PS-Harz (Beladung 1 mmol; 1 g; 1 mmol) wird unter Inertatmosphäre in THF (10 ml) suspendiert. Unter Eisbadkühlung wird eine Methylmagnesiumchlorid-Lösung (1,7 ml; $c = 2,94 \text{ mol/l}$; 5 eq) addiert, 1 h bei RT gerührt und abschliessend wird das Harz mit THF, MeOH, THF/HOAc (97:3), THF, DCM und Et₂O gewaschen.

IR-Daten: $\nu = 3026, 2974, 2927, 1602, 1493, 1452, 1372, 1119, 1029, 758, 698 \text{ cm}^{-1}$.

d. Aktivierung zum p-Nitrophenyl-Carbonat-PS-Harz

Tert.-Alkanol-PS-Harz (Beladung 1 mmol/g; 1 g; 1 mmol), das in wasserfreiem DCM unter Stickstoffatmosphäre suspendiert ist, wird bei 0 °C mit wasserfreiem Pyridin (260 μl) versetzt. Zu dieser Suspension wird eine Lösung von Chlorameisensäure-*p*-Nitrophenylester (2g; 10 mmol; 10 eq) in DCM (15 ml) gegeben. Es fällt in dieser Lösung sofort Pyridin-Hydrochlorid aus. Nach 0,5 h wird die Kühlung entfernt und die Suspension für weitere 16 h langsam gerührt. Danach wird das *p*-Nitrophenyl-Carbonat-Harz intensiv mit DMF gewaschen (15 x), um Pyridin-Hydrochlorid aus dem Trägermaterial zu entfernen. Abschliessend wird das Harz mit DCM und Et₂O gewaschen.

IR-Daten: $\nu = 3059, 3026, 2927, 2853, 1762, 1602, 1526, 1493, 1452, 1347, 1262, 1197, 1161, 1115, 1029, 858, 758, 698 \text{ cm}^{-1}$.

4.5 Arbeitsvorschrift zur Beladung der Polymer-Boc-Schutzgruppe

4.5.1 Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von Aminosäureallyl-estern

Boc-Aminosäure (1 g; 1 eq) wird mit Allylalkohol (1,1 eq) und DMAP (0,2 eq) in wasserfreiem DCM gelöst. Unter Eisbadkühlung wird DCC (1,1 eq) zugegeben, wobei sofort ein Niederschlag von Dicyclohexylharnstoff zu erkennen ist. Nach

16 h wird die Lösung im Eisbad abgekühlt und filtriert, das Filtrat zur Trockene eingeeengt und das zurückbleibende Öl in Et₂O aufgenommen und gewaschen. (3 x gesätt. NaHCO₃-Lsg., 2 x H₂O, 3 x 5 % KHSO₄-Lsg., 3 x gesätt. NaCl-Lsg., je ca. 50 ml) Nach Trocknen über Na₂SO₄ und Einengen am Vakuum bleibt ein gelbes Öl zurück, welches mit TFA/DCM (50:50) versetzt und 0,5 h gerührt wird. Die Lösung wird zur Trockene eingeeengt, mit Toluol versetzt und nochmals eingeeengt. Die Produkte fallen als, mit Dicyclohexylharnstoff, verunreinigte TFA-Salze an, welche ohne weitere Aufreinigung verwendet werden.

FD-MS-Daten: Ile-OAll: 171 [M⁺], 224 [Dicyclohexylharnstoff]

Val-OAll: 157 [M⁺], 224 [Dicyclohexylharnstoff]

Phe-OAll: 205 [M⁺], 224 [Dicyclohexylharnstoff]

Ala-OAll: 129 [M⁺], 224 [Dicyclohexylharnstoff]

Lys(Z)-OAll: 320 [M⁺], 224 [Dicyclohexylharnstoff]

4.5.2 Allgemeine Vorschrift zur Belegung des Polymer-Boc-Harzes mit Aminosäureestern

Zu *p*-Nitrophenyl-Boc-Harz (Beladung 1 mmol/g; 100 mg; 0,1 mmol) wird mit einer Lösung von Aminosäureallylester-Trifluoracetat oder Aminosäuremethylester-Hydrochlorid (10 eq) und 15,5 mg HOBt (1 eq, 0,1 mmol), 1 mmol DIEA (10 eq) in DMF (2 ml) gegeben. Die Harzsuspension wird 16 h bei 60 °C langsam gerührt, wobei sich die Lösung durch freiwerdendes *p*-Nitrophenol langsam gelb-grün verfärbt. Anschliessend wird das Harz mit DMF, DCM und Et₂O gewaschen.

IR-Daten: (Polymer-Boc-Phe-OAll) $\nu = 3437, 3082, 3059, 3026, 2922, 2851, 1744, 1718, 1601, 1493, 1452, 1368, 1193, 758, 698 \text{ cm}^{-1}$.

4.5.3 Allgemeine Vorschrift zur Abspaltung von der Polymer-Boc-Schutzgruppe

Polymer-Boc-Harz wird in TFA/DCM (50:50) suspendiert. Nach 0,5 h wird die Abspatlösung aufgefangen und das Harz mit wenig Methanol nachgewaschen. Die vereinigten Lösungen werden zur Trockene eingeeengt und in *tert.*-Butylalkohol/Wasser gefriergetrocknet.

4.5.4 Allgemeine Vorschrift zur Abspaltung der Allylschutzgruppe

Zu Polymer-Boc-Aminosäureallylesterharz (Beladung 0,9 mmol/g; 100 mg; 0,09 mmol) wird in einem Schlenkrohr Pd(PPh₃)₄ (125 mg; 0,108 mmol; 1,2 eq) zugegeben. Das Schlenkrohr wird unter Stickstoffatmosphäre gesetzt, 8 ml einer CHCl₃/HOAc/NMM-Lösung (37:2:1) hinzugefügt und das Gefäß nochmals kurz evakuiert und mit Stickstoff geflutet. Die Suspension wird 2 h geschüttelt und anschliessend mit DCM, DCM/DIEA (97:3), DCM und Et₂O gewaschen (je 7 x).

4.5.5 Allgemeine Vorschrift zur Abspaltung der Methylschutzgruppe

Polymer-Boc-Aminosäuremethylesterharz (Beladung 0,9 mmol/g; 100 mg; 0,09 mmol) wird zweimal mit Natriumtrimethylsilanolatlösung (2 ml; c = 1 mol/l) gewaschen und anschliessend in der selben Lösungsmittelmenge suspendiert und 16 h bei RT geschüttelt. Das Harz wird mit MeOH (5 x) gewaschen, eine Lösung aus THF/HOAc (90:10; 2 ml) zugegeben, weitere 5 h geschüttelt und abschliessend mit THF, DCM, MeOH Et₂O gewaschen (je 7 x).

4.6 Synthese von α -Hydroxy- β -aminoaldehyden

4.6.1 Darstellung von Polymer-Boc-Aminosäure-N-methoxy-N-methylamiden (Weinreb-Amide)

Polymer-Boc-Aminosäure-Harz (Beladung 0,9 mmol/g; 100 mg; 0,09 mmol) wird in DCM (2 ml) suspendiert, eine Lösung aus DIEA (80 μ l; 5 eq), PyBOP (250 mg; 5 eq) in DCM (1 ml) zugegeben und zur Aktivierung 0,25 h geschüttelt. N,O-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid (90 mg; 10 eq) wird durch Neutralisation mit DIEA (160 μ l; 10 eq) in DCM (1 ml) in Lösung gebracht, zur Harzsuspension hinzugefügt und 16 h bei RT geschüttelt. Anschliessend wird das Harz mit DCM, DMF, DCM, MeOH und Et₂O gewaschen und 48 h im Vakuum bei 40 °C getrocknet.

IR-Daten (Polymer-Boc-Phe-N-methoxy-N-methylamid): $\nu = 3418, 3083, 3026, 2922, 2851, 1715, 1665, 1601, 1493, 1452, 1384, 1367, 1242, 1198, 1123, 1029, 758, 698$ cm⁻¹.

4.6.2 Weinreb-Keton-Darstellung mit Thiazolyl-Lithium

In einem Schlenkrohr wird unter Inertbedingungen eine Butyllithium-Lösung (c = 1,6 M in THF; 1 mmol; 0,62 ml) in 2 ml THF vorgelegt. Zu dieser Lösung wird bei -30 °C Thiazol (71 μ l; 1 mmol) gegeben. Die tiefdunkelrote Lösung wird 5 min gerührt, dann zu einer Harzsuspension aus Polymer-Boc-Aminosäure-N-methoxy-N-methylamid-Harz (100 mg) in THF (2 ml) gegeben und 2 h bei -30 °C langsam gerührt. Anschliessend wird das Harz mit THF, THF/HOAc (95:5), THF, DMF, DCM, MeOH, Et₂O (je 5 x) gewaschen.

Polymer-Boc-Phe-Thiazol-Keton:

IR-Daten: $\nu = 3429, 3083, 3026, 2922, 2852, 1717, 1691, 1601, 1493, 1493, 1452, 1384, 1236, 1118, 1029, 758, 698 \text{ cm}^{-1}$.

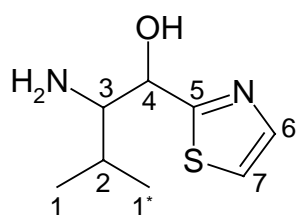
HPLC: (Dinitrophenylhydrazonderivat) 91 % Reinheit; ES-MS: 413 [M + H⁺]

4.6.3 Darstellung von Polymer-Boc-1-Thiazolyl-aminoalkoholen mittels Reduktion

Zu Polymer-Boc-2-amino-thiazolyl-ke-ton-Harz (100 mg), das in THF (2 ml) vorgequollen wird, gibt man eine Suspension aus NaBH₄ (15 mg; 0,4 mmol; 5 eq) als 0,5 M Lösung in THF/MeOH (80:20). (offenes Reaktionsgefäß). Nach 0,5 h wird das Harz einmal mit THF gewaschen, die Reaktion wiederholt und anschliessend mit THF, THF/HOAc (95:5), THF, DMF, DCM und Et₂O gewaschen.

IR-Daten: (Polymer-Boc-1-thiazolyl-phenylalaninol-Harz) $\nu = 3429, 3083, 3026, 2922, 2852, 1717, 1601, 1493, 1452, 1384, 1251, 1118, 1029, 758, 698 \text{ cm}^{-1}$.

¹³C-Daten: (1-Thiazolyl-valinol)



Signalzuordnung:

C-Atom	δ (ppm)	4	69,3 69,9
1, 1*	19,2, 19,6, 20,2	5	173,1 174,3
2	28,6 29,4	6	121,4 122,2
3	62,6 63,1	7	144,0 144,2

4.6.4 Einführung der TBDMS-Schutzgruppe bei Polymer-Boc-1-Thiazolyl-aminoalkoholen

Polymer-Boc-1-Thiazolyl-aminoalkohol-Harz (100 mg) wird in DMF (2 ml) vorgequollen und mit einer Lösung aus TBDMS-Cl (113 mg; 0,75 mmol; 5 eq),

Imidazol (61 mg) und DMAP (19 mg) in DMF (1 ml) versetzt. Nach 15 h Schütteln bei RT wird das Harz mit DMF, MeOH, DMF, DCM und Et₂O gewaschen (je 5 x). IR-Daten: (Polymer-Boc-1-(TBDMS)-1-thiazolyl-phenylalaninol-Harz) $\nu = 3435, 3083, 3026, 2922, 2852, 1715, 1601, 1493, 1452, 1367, 1251, 1118, 1029, 837, 758, 698 \text{ cm}^{-1}$.

4.6.5 Dondoni-Abbaureaktion von Polymer-Boc-1-(TBDMS)-1-thiazolyl-aminosäure-Harz zu Polymer-Boc- β -Amino- α -hydroxy-aminosäurealdehyd-Harz

Polymer-Boc-1-(TBDMS)-1-thiazolyl-aminoalkohol-Harz (100 mg) wird unter Inertatmosphäre in DCM (2 ml) über Molsieb suspendiert und 10 min im Eisbad gekühlt. Anschliessend wird Methyltriflat (45 μl ; 5 eq) zugegeben, 2 h geschüttelt und das Harz dann mit DCM und Et₂O gewaschen (je 5x) und danach im Vakuum getrocknet. Die Vorstufe wird in THF (2 ml) suspendiert und bei $-10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ wird eine Suspension aus NaBH₄ (15 mg; 0,4 mmol) in THF/MeOH (80:20) zugegeben. Nach 1,5 h wird das Harz einmal mit THF gewaschen, die Reaktion für 0,5 h wiederholt und abschliessend mit THF, THF/HOAc (95:5), THF, DMF, DCM und Et₂O gewaschen (je 5 x). Nach Trocknen im Vakuum wird eine Lösung aus HgCl₂ (38 mg, 0,14 mmol) in 2 ml ACN/H₂O (80:20) zum Harz gegeben. Die Suspension wird 16 h bei RT geschüttelt und anschliessend mit ACN/H₂O (80:20), THF, DCM und Et₂O gewaschen.

IR-Daten: (Polymer-Boc- β -Amino- α -hydroxy-phenylalaninaldehyd) $\nu = 3435, 3083, 3026, 2922, 2852, 1735 \text{ (Schulter)}, 1715, 1601, 1493, 1452, 1367, 1251, 1118, 1029, 837, 758, 698 \text{ cm}^{-1}$.

4.7 Derivatisierung von α -Hydroxy- β -aminoaldehyden

4.7.1 Darstellung von Polymer-Boc- β -Amino- α -hydroxy-amino-vinyl-sulfonen durch Wittig-Horner-Reaktion

Polymer-Boc- β -Amino- α -hydroxy-aminosäurealdehyd-Harz (100 mg) wird unter Inertatmosphäre und Zugabe von Molsieb in THF (2 ml) suspendiert. Zu dieser Mischung wird nach 10 min eine Lösung eines Sulfonyl-diethylphosphonates (0,3 mmol; 5 eq) in 1 ml THF gegeben und anschliessend eine NaH-Suspension (c = 1 M; 0,3 mmol; 5 eq) addiert. Nach 16 h wird das Harz mit THF, THF/HOAc (95:5), THF, DMF, DCM und Et₂O gewaschen.

Polymer-Boc- β -Amino- α -hydroxy-phenylalanin-vinylsulfon:

IR-Daten: ν = 3401, 3083, 3026, 2924, 2852, 1713, 1584, 1601, 1493, 1452, 1368, 1321, 1242, 1200, 1147, 1086, 1029, 758, 698 cm⁻¹.

4.7.2 Darstellung von Polymer-Boc- β -Amino- α -hydroxy-ethylaminen durch reduktive Aminierung

Polymer-Boc- β -Amino- α -hydroxy-aminosäurealdehyd-Harz (100 mg) wird in TMOF (1 ml) suspendiert und mit einer Lösung aus primärem Amin (10 eq) in THF/TMOF (50:50; 1 ml) versetzt. Nach 16 h wird zum Harz eine Lösung aus NaCNBH₄ in MeOH zugegeben, 2 h geschüttelt und dann mit TMOF gewaschen. Die Reaktion wird wiederholt und das Harz dann mit THF, DCM, MeOH und Et₂O (je 5x) gewaschen.

4.7.3 Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe

Polymer-Boc- β -Amino- α -(TBDMS)-hydroxy-aminosäure-Harz (100 mg) wird in TBAF-Lösung (c = 1M in THF; 2 ml) suspendiert und 2 h bei RT geschüttelt. Abschliessend wird das Harz mit THF, DCM, MeOH und Et₂O (je 5 x) gewaschen.

4.8 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Polymer-Boc-Aminoaldehyden

Polymer-Boc-Aminosäure-N-methoxy-N-methyl-hydroxamat-Harz (Beladung 1 mmol/g; 100 mg; 0,1 mmol) wird bei 0 °C unter Inertatmosphäre in wasserfreiem THF (2 ml) mit einer LiAlH₄-Lösung (1 M in THF; 0,5 mmol; 5 eq) versetzt. Nach 1 h wird das Harz mit THF; THF/HOAC (95:5), THF, DMF, DCM, MeOH und Et₂O (je 5 x) gewaschen.

Polymer-Boc-Phe-al:

IR-Daten: ν = 3416, 3083, 3026, 2922, 2851, 1715, 1601, 1582, 1493, 1452, 1384, 1177, 1029, 758, 698 cm⁻¹.

HPLC: (Dinitrophenylhydrazon-Derivat) 90% Reinheit

ES-MS: 343 [M + H⁺]

4.8.1 Darstellung von 1,2,3,4-Tetrahydrocarbolinen aus Polymer-Boc-Aminoaldehyden

Iminbildung:

Polymer-Boc-Aminoaldehydharz (Beladung 0,8 mmol/g; 100 mg; 0,08 mmol) wird mit einer Lösung aus Tryptamin oder einem substituierten Derivat (8 eq) in

THF/TMOF (50:50; 1,5 ml) 16 h bei RT geschüttelt, einmal mit TMOF gewaschen und die Reaktion wiederholt. Das Harz wird anschliessend mit THF und DCM gewaschen.

Pictet-Spengler-Cyclisierung:

Das so hergestellte Tryptimin wird in einer Lösung aus THF/TFA (97/3) suspendiert und 4 h bei RT geschüttelt und anschliessend mit DCM, DCM/DIEA (97/3), DCM und Et₂O gewaschen (je 5 x).

Acylierung:

Polymer-Boc-Tetrahydrocarbolin-Harz (Beladung 0,8 mmol/g; 100 mg; 0,08 mmol) wird in DCM (1 ml) suspendiert und mit einer Lösung aus DIEA (2,3 eq; 10 µl) und Carbonsäurechlorid (1,2 eq) in DCM (1 ml) versetzt. Nach 1 h wird das Harz mit DMF, DCM, MeOH und Et₂O gewaschen.

1-(1-Amino-2-methylpropyl)-2-(2-thiophenylcarbonyl)-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolin:

HPLC-Reinheit: 75 %; ES-MS: 355 [M + H⁺]

4.8.2 Darstellung von sekundären Aminen ausgehend von Polymer-Boc-aminoaldehyd-Harz

Polymer-Boc-aminoaldehyd-Harz (Beladung 0,8 mmol/g; 100 mg; 0,08 mmol) wird in TMOF (1 ml) suspendiert und mit einer Lösung aus primärem Amin (10 eq) in THF/TMOF (50:50; 1 ml) versetzt. Nach 16 h wird zum Harz eine Lösung aus NaCNBH₄ in MeOH zugegeben, 2 h geschüttelt und dann mit TMOF gewaschen. Die Reaktion wird wiederholt und das Harz dann mit THF, DCM, MeOH und Et₂O (je 5x) gewaschen.

4.9 Darstellung N,C-modifizierter Tripeptide

4.9.1 Aktivierung der Carboxylfunktion mittels Pentafluorphenoltrifluoracetat

Polymer-Boc-Aminosäure-Harz (Beladung 1 mmol/g; 100 mg; 0,1 mmol) wird in DMF (1 ml) suspendiert, mit Pyridin (20 eq; 128 μ l) und Pentafluorphenoltrifluoracetat (10 eq; 125 μ l) versetzt und anschliessend 6 h bei RT geschüttelt. Das Harz wird mit DMF, DCM und Et₂O (je 2 x mit abs. Lösungsmittel) gewaschen und am Vakuum getrocknet.

IR-Daten $\nu = 3450, 3026, 2922, 1796, 1734, 1601, 1522, 1493, 1493, 1452, 1234, 1055, 1028, 758, 698 \text{ cm}^{-1}$.

4.9.2 Darstellung von Polymer-Boc-Tripeptiden

Das in 4.9.1 hergestellte Harz (Beladung 1 mmol/g; 100 mg; 0,1 mmol) wird mit einer Mischung aus Dipeptidmethylesterhydrochlorid (10 eq), DIEA (20 eq) und DMF (1 ml) versetzt und 6 h bei RT geschüttelt. Das Harz wird mit DMF, THF, MeOH, DCM und Et₂O (je 5 x) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Anschliessend wird der harzgebundene Tripeptidmethylester analog zu Vorschrift 4.5.5 verseift, gewaschen und im Vakuum getrocknet.

4.9.3 Darstellung von Polymer-Boc-Tripeptid-Weinreb-Amiden

Analog zu Vorschrift 4.6.1 wird Polymer-Boc-Tripeptid-Harz mit N,O-Dimethylhydroxylaminhydrochlorid zum entsprechenden Weinreb-Amid umgesetzt.

4.9.4 Darstellung von Polymer-Boc-Tripeptid-Aldehyden

Analog zu Vorschrift 4.8 wird Polymer-Boc-Tripeptid-N-methoxy-N-methylhydroxamat-Harz unter Inertatmosphäre mit LiAlH_4 reduziert, anschliessend gewaschen und getrocknet.

4.9.5 Darstellung von Polymer-Boc-Tripeptid-Vinylsulfonen

Analog zu Vorschrift 4.7.1 wird Polymer-Boc-Tripeptid-Aldehyd-Harz in einer Wittig-Horner-Reaktion mit Sulfonyl-diethylphosphonaten umgesetzt anschliessend gewaschen und im Vakuum getrocknet.

4.9.6 Darstellung von N-acylierten Tripeptid-Vinylsulfonen

Nach der Abspaltung der Tripeptid-Vinylsulfone vom polymeren Träger werden diese in ACN/ H_2O (50:50) aufgenommen und mit 0,2 M HCl (5 eq) versetzt. Dieses Lösungsmittelgemisch wird am Rotationsverdampfer bei max. 40 °C im Vakuum entfernt. Anschliessend wird dieser Schritt noch zweimal wiederholt, um eine vollständige Überführung des Tripeptid-Trifluoracetats in das entsprechende Hydrochlorid zu gewährleisten.

Acylierung mit Carbonsäuren

Polymer-Carbodiimid-Harz (3 eq) wird mit einer Lösung aus Tripeptid-Vinylsulfon (0,7 eq), Carbonsäure (1 eq) THF versetzt und 16 h bei RT geschüttelt. Anschliessend wird das Filtrat aufgefangen, das Harz mit THF und MeOH nachgewaschen, die Lösungen vereinigt und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

4.9.7 Synthese von Sulfonyl-diethylphosphonaten

Eine Lösung aus Iodmethylphosphonsäurediethylester (10 g; 36 mmol; 1,16eq) in Diethylether (20 ml) wird zu einer Suspension aus Natriummethylthiolat (2,74 g; 31 mmol; 1 eq) in Diethylether (30 ml) bei RT zugegeben und 5 h gerührt. Es wird dann Zitronensäurepufferlösung (60 ml; ph 4) zugegeben und mittels eines Scheidetrichters extrahiert. Die Wasserphase wird noch dreimal mit Diethylether (40 ml) extrahiert. Die vereinigten Etherphasen werden dann über $MgSO_4$ 1 h getrocknet und das Lösungsmittel anschliessend im Vakuum entfernt und das ölige Rohprodukt (Ausbeute: 4,9 g; 79 % d. Th.) erhalten, welches ohne weitere Aufreinigung verwendet wird.

Das Öl wird in MeOH (100ml) gelöst und bei 0 °C wird eine Lösung aus $KHSO_5$ (22,08 g; 3 eq) in Wasser (100 ml) zugegeben. Nach 16 h Rühren bei RT wird das Methanol im Vakuum entfernt. Der sich bildende Niederschlag wird durch Zugabe von H_2O wieder aufgelöst und die Wasserphase wird anschliessend mit DCM (100 ml) viermal extrahiert. Die organische Phase wird dann je dreimal mit H_2O und gesätt. NaCl-Lösung (je 150 ml) gewaschen. Nach Trocknen über $NaSO_4$ für 1 h und Abfiltrieren wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält das Produkt als farbloses Pulver, welches nicht weiter aufgereinigt werden muss. (Gesamtausbeute: 4,2g; 59 % d. Th.) Ebenso werden alle weitere Sulfonyl-diethylphosphonate hergestellt.

Methylsulfonyldiethylphosphonat:

MS-Daten: FD-MS 230,9 [M⁺]

NMR-Daten (CDCl₃): ³¹P: 13,01 (s); ¹H: δ 4,17 (P-CH₂- 4 H; m), 3,54 (P-CH₂-SO₂; 2 H; d), 3,14 (SO₂-CH₃; 3 H; s), 1,30 (CH₂-CH₃; 6 H; t)

5 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AA	Aminosäure
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	Dichlormethan
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIEA	N-Ethyldiisopropylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DVB	Divinylbenzol
eq.	Äquivalent
ES-MS	Elektrospray-MS
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
FT-ATR-IR	Fourier-Transform-Attenuated-Total-Reflection-IR
FT-ICR-MS	Fourier-Transform-Ionen-Cyclotron-Resonanz-MS
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IR	Infrarot-Spektroskopie
MALDI-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-MS
MAS	Magic Angle Spinning
MS	Massenspektrometrie
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PEG	Polyethylenglykol
PS	Polystyrol
SPOS	Solid Phase Organic Synthesis (Organische Chemie an fester Phase)

SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis (Festphasensynthese von Peptiden)
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Total Ion Count
TMG	1,1,3,3-Tetramethylguanidin
TMOF	Trimethylorthoformiat
UV	Ultraviolett

6 Literaturverzeichnis

[And96] P. S. Andersen, Vortrag, *24th European Peptide Symposium*, 8-13. 9. **1996**, Edinburgh.

[And99] C. J. Andres, D. J. Denhart, M. S. Deshpande, K. W. Gillman, *Comb. Chem. High Throughput Screening*, **1999**, 2, 191-210.

[Aus99]

a. V. Austel, Vortrag "Kombinatorische Chemie in Lösung" GDCh-Kurs Kombinatorische Chemie, **1997**, Tübingen.

b. V. Austel in G. Jung (Ed.), *Combinatorial Chemistry: Synthesis, Analysis, Screening*, 77-119, Verlag Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.

[Ban99] in G. Jung, (Ed.): *Combinatorial Chemistry: Synthesis, Analysis, Screening*, 479-498, Verlag Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.

[Bas95] M. Bastos, N. J. Maeji und R. H. Abeles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1995**, 92, 6738-6742.

[Ben93] Y. L. Bennati, K. B. Sharpless, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 2083-2086.

[Bia99] A. Bianco in G. Jung, (Ed.): *Combinatorial Chemistry: Synthesis, Analysis, Screening*, 257-287, Verlag Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.

[Blo98] K. F. Blom, A. P. Combs, A. L. Rockwell, K. R. Oldenburg, J. H. Zhang, T. Chen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1998**, 12, 1192-1198.

[Blo99] S. E. Blondelle, E. Crooks, J. M. Ostresh, R. A. Houghten, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1999**, 43 106-114.

[Blu86] C. Blumenkopf, *Synthetic Communications*, **1986**, 16, 139-147.

[Bra95] G. Brauer, *Handbuch der Präparativen Anorganischen Chemie*, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, **1995**.

[Bre92] S. Brenner, R. A. Lerner *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, *89*, 5381-5383.

[Brö96] D. Brömme, J. Klaus, K. Okamoto, D. Rasnick und J. Palmer, *Biochem.*, **1996**, *315*, 85-89.

[Bro96] G. Broggin, G. Zecchi, *Synthesis*, **1996**, 1280-1291.

[Bun92] B. A. Bunin, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 10997-11001.

[Bur94] K. Burgess, A. I. Liaw, N. Wang *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 2985-2987.

[Bur96] K. Burgess, H.-J. Lim, A. M. Porte, G. A. Sulikowski, *Angew. Chem.*, **1996**, *108*, 192-195. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1996**, *35*, 220-222.

[Cha97] T.Y. Chan, R. Chen, M.J. Sofia, B.C. Smith, D. Glennon, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 2821-2825.

[Che94] C. Chen, L. A. Ahlberg Randall, R. B. Miller, A. D. Jones, M. J. Kurth, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 2661-2662.

[Com75] M.B. Comisarow, A.G. Marshall, *Chem. Phys. Lett.* **1975**, *62*, 489-490.

[Dax99] S. L. Dax, J. J. McNally, M. A. Youngman, *Curr. Med. Chem.*, **1999**, *6*, 255-270.

[Des93] M. C. Desai, L. M. Stephens Stramiello, *Tetrahedron. Lett.*, **1993**, *34*, 7685-7688.

[Dol96] R. E. Dolle, *Mol. Div.*, **1996**, *2*, 223-236.

[Don 95] A. Dondoni, D. Perrone und M. T. Semola, *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 7927-7933.

[Don90] A. Dondoni, G. Fantin, M. Fognalolo und P. Pedrini, *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 1439-1446.

[Don93] A. Dondoni, A. Marra und D. Perrone, *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 275-277.

[Don93a] A. Dondoni, A. W. Douglas und I. Shinkai, *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 3196-3200.

[Don95a] A. Dondoni, D. Perrone und P. Merino, *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 8074-8080.

[Dre96] B. A. Dressman, L. A. Spangle, S. W. Kaldor, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 937-939.

[Eng98] J. C. Engel, P. S. Doyle, I. Hsieh, J. H. McKerrow, *J. of Exper. Med.*, **1998**, *188*, 725-734.

[Erb94] E. Erb, K. D. Janda, S. Brenner *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 11422-11426.

[Fle88] I. Fleming, *Grenzorbitale und Reaktionen organischer Verbindungen*, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, **1988**, 172-190.

[Frü96] J. S. Früchtel, G. Jung, *Angew. Chem.*, **1996**, *108*, 19-36. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1996**, *35*, 17-42.

[Fur88] A. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibo, *Abstr. 14th Int. Congr. Biochem., Prague, Czechoslovakia*, **1988**, *5*, 47-49.

[Fur91] A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **1991**, 37, 487-499.

[Gan94] J. Gante, *Angew. Chem.*, **1994**, 106, 1780-1802. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1994**, 33, 1542-1565.

[Gey86] H. M. Geysen, S. J. Rodda, T. J. A. Mason, *Mol. Immunol.*, **1986**, 23, 709-713.

[Gia93] A. Giannis und T. Kolter, *Angew. Chem.*, **1993**, 105, 1303-1326. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1993**, 32, 1255-1276.

[Gos96] F. Gosselin, M. DiRenzo, T.H. Ellis, W.D. Lubell, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 7980-7985.

[Gre75] R. Gree, R. Carrie, *Bull. Soc. chim. France*, **1975**, 1319-1325.

[Gri78] R. Grigg, J. Kemp, G. Sheldrick, J. Trotter, *J. Comm. Soc. Chem. Comm.*, **1978**, 109, 1235-1245.

[Gri80] R. Grigg, J. Kemp, *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 2461-2469.

[Gri88] R. Grigg, W.P. Armstrong, *Tetrahedron*, **1988**, 1523-1540.

[Haa97] W. J. Haap, T. Redemann, J. S. Früchtel, G. Jung, *GIT Special "Prof. Bayer"*, **1997**, 94-97.

[Haa98] W. J. Haap, T. B. Walk, G. Jung, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 3311-3314.

[Her97] P.H.H Hermkens, H.C.J. Ottenheijm, D.C. Rees, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 5643-5665.

-
- [Hoc99] J. E. Hochlowski, D. N. Whittern, T. J. Sowin, *J. Comb. Chem*, **1999**, *1*, 291-293.
- [Hoe97] W. J. Hoeckstra, M. N. Greco, S. C. Yabut, B. L. Hulshizer, B. E. Maryanoff, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 2629-2632.
- [Hof65] R. Hoffmann, R.B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, *87*, 4388-4399.
- [Hof99] C. Hoffmann, A. Wolf, F. Schuth, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 2800-2803.
- [Hub99] W. Huber, A. Bubendorf, A. Grieder, D. Obrecht, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *393*, 213-221.
- [Huf99] M. A. Huffman, P. J. Reider, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 831-834.
- [Jia99] E. Y. Jiang, *Appl. Spectrosc.*, **1999**, *53*, 583-587.
- [Jun92] G. Jung und A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.*, **1992**, *104*, 375-382.
Angew. Chem. Int. Ed., **1992**, *31*, 367-383.
- [Jun96] G. Jung, (Ed.): *Combinatorial Peptide and Non-Peptide Libraries*, Verlag Chemie, Weinheim, **1996**.
- [Jun99] G. Jung, (Ed.): *Combinatorial Chemistry: Synthesis, Analysis, Screening* Verlag Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [Kat93] S.A. Kates, N.A. Sole, C.R. Johnson, D. Hudson, G. Barany, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 1549-1555.
- [Kei96] P. A. Keifer, L. Baltusis, D. M. Rice, A. Tymiak, J. N. Shoolery, *J. Magn. Reson.*, **1996**, *119*, 65-69.

[Ker93] J. M. Kerr, S. C. Banville, R. N. Zuckermann *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 5412-5419.

[Kic95] E. K. Kick und J. A. Ellman, *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 1427-1430.

[Kir99] D. L. Kirkpatrick, S. Watson, S. Ulhaq, *Comb. Chem. and High Throughput Screen.*, **1999**, *2*, 211-221.

[Lag94] E. D. Laganis, B. L. Chenard, *Tetrahedron Lett.*, **1984**, *25*, 5831-5834.

[Lég98] R. Léger, R. Yen, M. W. She, V. J. Lee, S. J. Hecker, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 514-519.

[Lez72] C. C. Leznoff, Y. M. Wong, *Can J. Chem.*, **1972**, *50*, 2892-2897.

[Llo99] A. W. Lloyd, *Drug Discovery Today*, **1999**, *4*, 532-534.

[Loo95] G. Look, M.M. Murphy, D.A. Campbell, M.A. Gallop, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 2937-2945.

[Mac97] D. Maclean, J. R. Schullek, M. M. Murphy, Z. J. Ni, E. M. Gordon, M. A. Gallop, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1997**, *94*, 2805-2810.

[Mat97] H. Matter, *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 1219-1228.

[Mcg98] M. E. McGrath, J. T. Palmer, D. Bromme, J. R. Somoza, *Protein Sci.*, **1998**, *7* 1294-1302.

[McI70] R.T. McIver Jr., *Rev. Sci. Inst.*, **1970**, *42*, 555-556.

[Mer63] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149-2153.

[Mit81] O. Mitsunobu, *Synthesis*, **1981**, 1-35.

[Mor95] E. J. Moran, S. Sarhar, J. F. Cargill, M. M. Shahbaz, A. Lio, A. M. M. Mjalli, R. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 10787-10790.

[Mur95] M. M. Murphy, J. R. Schullek, E. M. Gordon, M. A. Gallop, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 7029-7030.

[Nah81] S. Nahm, S. M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.*, **1981**, *22*, 3815-3818.

[Nic95] K. C. Nicolaou, X.-Y. Xiao, Z. Parandoosh, A. Senyei, M. P. Nova, *Angew. Chem.*, **1995**, *105*, 2476-2480. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, *34*, 2289-2291.

[Nor68] R.O.C. Norman, *Principles of Organic Chemistry*, **1968**, Methuen, New York, 489-491.

[Nuz89] J. M. Nuzillard, A. Boumendjel, G. Massiot, *Tetrahedron. Lett.*, **1989**, *29*, 3779-3780.

[Ols98] J. E. Olson, G. K. Lee, A. Semenov, P. J. Rosenthal, *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, *7* 633-638.

[Ott97] H-H. Otto und T. Schirmeister, *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 133-171.

[Pal95] J. Palmer, D. Rasnick, J. Klaus, und D. Brömme, *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 3193-3196.

[Par94] K. E. B. Parkes, D. J. Bushnell, P. H. Crackett, S. J. Dunsdon, A. C. Freeman, M. P. Gunn, R. A. Hopkins, R. W. Lambert, J. A. Martin, J. H. Merrett, S. Redshaw, W. C. Spurden und G. J. Thomas, *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 3656-3664.

[Pat59] H. Patai, H. Weiß, *J. Chem. Soc.*, **1959**, 1035-1045.

[Pes99] P. P. Pescarmona, J. C. van der Waal, I. E. Maxwell, T. Maschmeyer, *Catal. Lett.*, **1999**, *63* 1-11.

[Pin92] C. Pinilla, J. R. Appel, P. Blanc, R. A. Houghten *Biotechniques*, **1992**, *13*, 901-905.

[Pur96] M. Pursch, G. Schlotterbeck, L.-H. Tseng, K. Albert, W. Rapp, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1996**, *35*, 2867-2869.

[Rah98] S. S. Rahman, D. J. Busby, D. C. Lee, *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 6196-6199.

[Rot96] D. P. Rotella, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 12246-12247.

[Sad95] J. Sadowski, M. Wagener, J. Gasteiger, *Angew. Chem.*, **1995**, *107*, 2892-2897. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1995**, *34*, 2536-2541.

[Sar96] S. K. Sarkar, R. Garigipati, J. I. Adams, P. A. Keifer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 2305-2309.

[Sha99] M. J. Shapiro, J. S. Gounarides, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **1999**, *35* 153-200.

[Shu97] S. J. Shuttleworth, S. M. Allin, P. K. Sharma, *Synthesis*, **1997**, 1217-1239.

[Smi94] M. B. Smith, *Organic Synthesis*, McGraw-Hill, New York, **1994**.

[Smi95] M. B. Smith, *Methods of Non- α -Amino Acid Synthesis*, Marcel Dekker, New York, **1995**.

[Som50] H. Sommer, H.A. Thomas, *Phys. Rev.*, **1950**, *78*, 806-811.

[Sud72] H. Suda, T. Aoyagi, M. Hamada, T. Takeuchi und H. Umezawa, *J. Antibiot.*, **1972**, *25*, 263-270.

[Swa97] V. Swali, M. Bradley, *Anal. Comm.*, **1997**, *34* H15-H18.

[Tou93] D. Tourwé, J. Piron, P. Defreynd und G. Van Binst, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 5499-5502.

[Ugi99] I. Ugi in G. Jung, (Ed.): *Combinatorial Chemistry: Synthesis, Analysis, Screening*, Verlag Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.

[Ume82] H. Umezawa, *Ann. Rev. Microbiol.*, **1982**, *36*, 75-99.

[Wag99] A. M. A. van Wageningen, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 9347-9351.

[Wal99] T. Walk in G. Jung, (Ed.): *Combinatorial Chemistry: Synthesis, Analysis, Screening*, 561-579, Verlag Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.

[War97] R. Warras, Dissertation, Universität Tübingen, **1997**.

[Wes95] M. L. West und D. P. Fairlie, *TIPS*, **1995**, *16*, 67-74.

[Wie96] K.-H. Wiesmüller, B. Fleckenstein, S. Feiertag in G. Jung, (Ed.): *Combinatorial Peptide and Non-Peptide Libraries*, Verlag Chemie, Weinheim, **1996**.

[Won73] Y. M. Wong, C. C. Leznoff, *Can. J. Chem.*, **1973**, *51*, 2452-2458.

[Yan00] B. Yan, N. Nguyen, L. Liu, G. Holland, B. Raju, *J. Comb. Chem.*, **2000**, *2*, 66-74.

[Yan95] B. Yan, G. Kumaravel, H. Anjaria, A. Wu, R. C. Petter, C. F. Jewell jr., J. R. Wareing, *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 5736-5741.

[Yan96]. B. Yan, J. B. Fell, G. Kumaravel, *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 7467-7471.

[Yan99] B. Yan, H. U. Gremlich, S. Moss, G. M. Coppola, Q. Sun, L. Liu, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1* 46-54.

[Zha97] Han-Cheng Zhang, B. E. Maryanoff, *J. Org. Chem.*, **1997**, *6*, 1804-1809.

Meine akademischen Lehrer waren:

K.Albert, E. Bayer, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel, G. Häfelinger, H.-P. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, H.-P. Mayer, U. Nagel, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, H. Pommer, B. Rieger, A. Rieker, V. Schurig, E. Schweda, F. F. Seelig, H.-U. Siehl, B. Speiser, H. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, H.-D. Wiemhöfer, K.-P. Zeller, C. Ziegler.

Lebenslauf

Holger Bandel

Geburtsdatum 23.3.1969 in Esslingen/Neckar

Schulbildung

1975 - 1979: Grundschule Esslingen-Lerchenäcker
1979 - 1985: Theodor-Heuß-Gymnasium Esslingen
1985 - 1988: Technisches Gymnasium Esslingen/Zell

1988 - 1990: Zivildienst Krankenhaus Esslingen

Hochschulstudium

Wintersemester 1990 Chemiestudium an der Universität Konstanz
Sommersemester 1991 Studienortwechsel nach Tübingen
Sommersemester 1993 Abschluss des Chemieordiploms
Wintersemester 1994 Auslandssemester an der Universität
Lyon/Frankreich

Wintersemester 1996 mündliche Diplomprüfungen
Sommersemester 1997 Diplomarbeit: Kombinatorische Chemie an fester
Phase, Synthese und Derivatisierung von
Pyrrolidinen

November 1997 – Juli 2000 Durchführung der Doktorarbeit
„Kombinatorische Festphasensynthese von
Peptidomimetika“

Oktober 1998 – Juli 2000 Promotionsstipendiat im DFG-Graduiertenkolleg
“Chemie in Interphasen“