

Neue wasserlösliche Cystein-Protease-Inhibitoren mit Aziridin-2,3-dicarbonsäure-Baustein



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Diplom-Chemiker Philipp Fey

geb. in München

Mainz 2014

Eingereicht beim Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften am:

1. Berichterstatter: _____

2. Berichterstatter: _____

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von März 2010 bis September 2011 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg sowie von Oktober 2011 bis September 2013 am Institut für Pharmazie und Biochemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (D77) angefertigt.

Zusammenfassung

Die Leishmaniose gehört als eine der „vernachlässigten tropischen Erkrankungen“ zu den chronischen, schwächenden und auch stigmatisierenden Krankheiten. Sie wird durch parasitäre Protozoen der Gattung *Leishmania* ausgelöst. Weltweit sind ca. 12 Mio. Menschen infiziert, ca. 70 Tausend erliegen ihr jährlich. Die aktuelle Therapie wird überschattet von Toxizitäts- und Teratogenitätsproblemen der verfügbaren Arzneimittel, deren niedriges Ansprechen bei Koinfektionen und von aufkommenden Resistenzen. Ein immer besseres Verständnis der Krankheitsprozesse sowie Veröffentlichungen von parasitären Protein-Kristall-Strukturen beschleunigen die Forschung in Richtung neuer Medikamente. Bekannt ist, dass Cysteinproteasen wesentliche Virulenzfaktoren für Leishmanien sind, die das Immunsystem des Wirts zum Vorteil des Parasiten manipulieren können. Das macht sie zu potentiellen Therapie-*targets*. Aufgrund der evolutionären Verwandtschaft der Enzyme sind die parasitären Cysteinproteasen strukturell den humanen sehr ähnlich. Die Herausforderung bei der Entwicklung antiparasitärer Wirkstoffe, basierend auf der Hemmung dieser Proteasen, besteht deshalb darin, sehr selektive Inhibitoren zu entwickeln, die die Wirtsproteasen nicht, oder nur in einem vertretbaren Rahmen, inhibieren.

Das Ziel dieser Arbeit war die Weiterentwicklung der Aziridin-2,3-dicarbonsäure-basierten Cysteinproteaseinhibitoren **RV122C** bzw. **CS09** hinsichtlich Selektivität und Aktivität gegenüber der parasitären Cathepsin-L-ähnlichen Cystein-Protease LmCPB2.8 durch Design, incl. Docking, Synthese und Testung. Neben der gezielten Variation nicht essenzieller Gruppen wurde molekulares Docking mittels AutoDock Vina an Cruzain als verwandtes Modellenzym durchgeführt, um durch Variationen K.O.-Kandidaten für die Differenzierung zwischen zwei postulierten Bindungsmodi zu finden. Die Ergebnisse der Enzymassays zeigen eine Verbesserung der Hemmeigenschaften bei gleichzeitig verbesserter Selektivität sowie erhöhter *ligand efficiency* und *ligand lipophilic efficiency* für Derivate mit sterisch anspruchsvolleren Ester-Resten und für Derivate mit einer freien Carbonsäurefunktion am Aziridin-Ring (Halbester). Der Vergleich der Ergebnisse des Dockings mit den Ergebnissen der Enzymassays spricht weiterhin zum einen für einen anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus (entgegengesetzter Verlauf der peptischen Grundstruktur des Inhibitors und der Substratbindespalte des Enzyms) und zum anderen für eine im Vergleich zu Cruzain tiefere S₁-Bindungstasche in LmCPB2.8. Die Kenntnis dieser entscheidenden Strukturinformation sollte die Weiterentwicklung der Inhibitoren dieser Substanzklasse als selektive antileishmaniale Wirkstoffe erleichtern. Für eine Optimierungsmöglichkeit – die Konfigurationsänderung zu den Derivaten mit *cis*-konfiguriertem Aziridin-Ring – konnte in der vorliegenden Arbeit außerdem bereits der Weg zur Darstellung des *cis*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylat-Bausteins etabliert werden.

Abstract

Leishmaniasis as one of the „neglected tropical diseases“ is a chronic, debilitating and stigmatizing disease. It is caused by parasitic protozoa of the genus *Leishmania*. Worldwide approximately 12 million people are infected, with about 70 thousand deaths every year. The current therapy is overshadowed by toxicity and teratogenicity caused by the available drugs, their low response in co-infections and emerging drug resistancies. An increasing understanding of disease processes, as well as publications of parasitic protein crystal structures accelerate the research towards new drugs. It is known that cysteine proteases are important virulence factors for *Leishmania* that can manipulate the host immune system to accelerate and deteriorate the infection. This makes them promising new potential therapeutic targets. However, the parasitic cysteine proteases are structurally very similar to the human ones because of their evolutionary relatedness. Therefore, the challenge in the development of anti-parasitic drugs based on the inhibition of these proteases is to develop highly selective inhibitors that do not, or only weakly inhibit host proteases.

The aim of this work was the optimization of the aziridine-2,3-dicarboxylate-based cysteine protease inhibitors **RV122C** and **CS09** regarding their affinity and selectivity against the parasitic cathepsin L-like cysteine protease LmCPB2.8 by design, incl. molecular docking, synthesis and testing. In addition to the variation of groups which are not necessary for productive interactions with the enzyme molecular docking was performed using AutoDock Vina and cruzain which served as a related model enzyme. The aim was to determine knockout candidates to distinguish between two possible binding modes. The results of the enzyme assays show increased activity with improved selectivity, increased ligand efficiency and increased lipophilic ligand efficiency for derivatives with bulky large ester groups and the derivatives with a free carboxylic acid at the aziridine ring. The comparison of the docking results with the results of the enzyme assays gives a good indication for an anti-substrate-like binding mode (inverse orientation of the peptic structure of the inhibitor and the substrate binding cleft of the enzyme) and for a deeper S₁-binding pocket in LmCPB2.8 compared to cruzain. With this structural information, the development of inhibitors of this class as selective anti-leishmanial agents should be facilitated. For one possible optimization – the change of the configuration to derivatives with *cis*-configured aziridine ring – the synthesis of a *cis*-configured aziridine-2,3-dicarboxylate building block has already been established in this work.

INHALTSVERZEICHNIS

ALLGEMEINER TEIL.....	1
1. Einleitung.....	1
1.1 Von der Aminosäure zum Arzneistoff.....	1
1.2 Nomenklatur nach Schechter und Berger	6
1.3 Klassifizierung von Proteasen	7
1.4 Cysteinproteasen	9
1.4.1 Einteilung von Cysteinproteasen nach dem MEROPS-System.....	9
1.4.2 Struktur der Cysteinproteasen der Papainfamilie	9
1.4.3 Substratspezifität von Cathepsin-L- und -B-ähnlichen Cysteinproteasen	11
1.4.4 Hydrolysemechanismus von Cysteinproteasen der Papainfamilie	11
1.4.5 Vorkommen und Funktion der Cysteinproteasen der Papainfamilien CAC1.....	12
1.5 Leishmaniose als vernachlässigte tropische Infektionskrankheit.....	16
1.5.1 Übersicht parasitär verursachter tropischer Infektionskrankheiten	16
1.5.2 Leishmaniose als neglected tropical disease (NTD).....	18
1.5.3 Leishmaniose: Krankheitsbilder und Therapie	21
1.5.4 Cath-L- und -B-ähnliche Cysteinproteasen der Leishmanien	22
1.6 Inhibitoren von Cysteinproteasen	25
1.6.1 Designfragen bei der Inhibitorentwicklung	25
1.6.2 Oxiran-2,3-dicarbonsäuren als irreversible Cysteinproteaseinhibitoren.....	26
1.6.3 Aziridin-2,3-dicarbonsäuren als irreversible Cysteinproteaseinhibitoren.....	29
1.6.4 Inhibitoren von Leishmania Cysteinproteasen.....	32
2. Zielsetzung	34
3. Ergebnisse: Synthesen und Docking.....	35
3.1 Erster Teil: Neue Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Cysteinproteaseinhibitoren	35
3.1.1 Variation am C-Terminus: Neue Aziridine	35
3.1.2 Variation am N-Terminus: Erhöhung der Hydrophilie	55
3.1.3 Darstellung der Tripeptide.....	62

3.1.4 Freisetzung der hydrophilen Gruppen.....	66
3.2 Zweiter Teil: Dockinggestütztes Design und Synthese	71
3.2.1 Molekulares Docking	71
3.2.2 Variation am C-Terminus: cis-konfiguriertes Aziridin-2,3-dicarboxylat.....	99
3.2.3 Variation am N-Terminus.....	109
3.3 Übersicht und Hydrophilie aller dargestellten Inhibitoren	111
4. Ergebnisse: Biochemische und biologische Untersuchungen	114
4.1 Enzymkinetik	114
4.1.1 Einführung zur Enzymkinetik und Hemmmechanismen	114
4.1.2 Arten der Enzymhemmung – reversibel und irreversibel.....	117
4.1.3 Enzymkinetik der irreversiblen Hemmung.....	118
4.1.4 Fluorimetrische Enzymassays nach Tian und Tsou – Theorie und Durchführung .	122
4.1.5 Ergebnisse der fluorimetrischen Enzymassays.....	126
4.2 Ergebnisse der Testungen auf Zytotoxizität und antiparasitäre Aktivität	132
4.3 Betrachtung der <i>ligand efficiency</i> (LE) und <i>ligand lipophilic efficiency</i> (LLE) der aktiven Derivate.....	135
5. Vergleich und Diskussion der Ergebnisse	142
6. Zusammenfassung.....	158
7. Summary.....	168
EXPERIMENTALTEIL.....	177
8. Allgemeine Vorbemerkungen	177
8.1 Verwendete Messgeräte.....	177
8.2 Analytische und chromatographische Methoden	179
8.3 Verwendete Chemikalien und Sprühreagenzien	182
8.4 Arbeitsmethoden	182
8.5 Fluorimetrische Enzymassays	183
9. Allgemeine synthetische Methoden	185
9.1 Darstellung und Funktionalisierung der But-2-endoate: Methoden 1-3.....	185
9.2 Peptidkupplungen: Methoden 4-5.....	187

9.3 AS-Schutzgruppenchemie: Methoden 6-11	188
9.4 Darstellung von Aziridin-2,3-dicarboxylaten: Methoden 12-13	189
9.5 Diverse Synthesen: Methoden 14-15.....	191
10. Synthetisierte Verbindungen	192
10.1 (2S,3S)+(2R,3R)-Aziridin-2,3-dicarboxylate	192
10.1.1 <i>But-2-ensäuren</i>	192
10.1.2 (2Z)- <i>But-2-endioate</i>	194
10.1.3 (2E)- <i>But-2-endioate</i>	199
10.1.4 (2S,3S)+(2R,3R)-Aziridin-2,3-dicarboxylate	214
10.2 Peptide	224
10.2.1 <i>Geschützte Aminosäuren</i>	224
10.2.2 <i>Dipeptide</i>	233
10.3 Tripeptide	242
10.3.1 <i>Symmetrische Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Inhibitoren</i>	244
10.3.2 <i>Unsymmetrische Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Inhibitoren</i>	254
10.3.3 <i>3-Carbonylaziridin-2-carbonsäure-basierte Inhibitoren</i>	263
10.4 (2S,3R)+(2R,3S)-Aziridin-2,3-dicarboxylat	270
10.5 Diverse, Testreaktionen und Nebenprodukte	274
10.5.1 <i>Dibrom-Route</i>	274
10.5.2 <i>Epoxid-Route</i>	275
10.5.3 <i>Tartrat-Route</i>	278
10.5.4 <i>PyAc-geschütztes Dipeptid</i>	282
APPENDIX	286
11. Formelregister	286
12. Abkürzungsverzeichnis	287
13. Literaturverzeichnis	289

ALLGEMEINER TEIL

1. Einleitung

1.1 Von der Aminosäure zum Arzneistoff

Proteine sind Eiweißkomplexe, die aus den Grundbauteilchen des Lebens, den Aminosäuren, aufgebaut sind.¹ Den größten Anteil der Proteine machen Enzyme aus. Sie ermöglichen chemische Reaktionen unter natürlichen Bedingungen, die ohne sie nur unter großer Hitze und/oder großem Druck möglich wären. Enzyme sind also die Katalysatoren der Natur. Enzyme, die die chemische Reaktion der Protein- bzw. Peptidspaltung durchführen, werden Proteasen bzw. Peptidasen genannt. Proteasen konnten in nahezu jedem Organismus identifiziert werden. Weiterhin lässt sich die Bedeutung von Proteasen daran abschätzen, dass ca. 2 % aller Gene in Organismen Peptidasen oder ihre Homologen codieren. Im Menschen sind dies ca. 500 Gene.²⁻⁴

Durch die Evolution haben sich Proteasen in großem Umfang an unterschiedlichste Bedingungen angepasst (verschiedene pH-Bereiche, reduktives Milieu) und so auch verschiedenste Mechanismen der Substrathydrolyse entwickelt. Neben dem einfachen Proteinabbau übernehmen Proteasen auch wichtige Signalübermittlungen. So konnte am Mechanismus der Blutgerinnung herausgefunden werden, dass die präzise Spaltung von Proteinen durch Proteasen ein sehr raffiniertes Regulierungsmittel darstellt. Proteasen sind so bei der Steuerung beinahe jeder wichtigen physiologischen Funktion beteiligt. Das sind insbesondere Verdauung, Nährstoffaufnahme, Eisprung, Befruchtung, Zellkommunikation, Zellwanderung, Gewebshomöostase, Knochenbildung und Knochenabbau, Auswachsen von Neuronen, Antigenpräsentation, Zellzyklus-Regulierung, Immunität, Phagozytose, Entzündung, Zytokin-Freisetzung, Wundheilung, Angiogenese, Apoptose und Alterung.⁵⁻⁷

Während des Zell- und Gewebewachstums und wenn sich der Organismus im Gleichgewicht (Homöostase) befindet, arbeiten die Protease-Signalwege normal und sind streng reguliert. Was geschieht nun aber, wenn die Regulierung der Signalübermittlung fehlschlägt? Auf der niedrigsten Ebene, dem Level der Substratspaltung, gibt es nur zu viel oder zu wenig enzymatische Hydrolyse von Proteinen, sog. Proteolyse. Während verminderte Proteolyse meist das Resultat genetischer Unregelmäßigkeiten ist, wird übermäßige bzw. nicht passende Proteolyse nur selten durch genetische Anomalien ausgelöst. Übermäßige Proteolyse ist meistens Folge vieler endogener und/oder exogener Einflüsse, die in der ungewollten Aktivierung eines Signalwegs resultieren. Eine gestörte Regulation im Menschen ist Auslöser

von Entzündungen und einer ganzen Reihe von Krankheiten wie immunologischen, Atemwegs-, Herz-Kreislauf-, neurodegenerativen (z.B. Alzheimer) und Krebserkrankungen.^{5,7}

Da die übermäßige Proteolyse durch das Inhibieren der richtigen Proteasen verhindert werden kann, ist dieser Bereich einer der am besten erforschten der pharmazeutischen Industrie.⁵ So werden von den bekannten humanen Proteasen derzeit fast 14 % als mögliche sog. *drug targets* untersucht. Als Beispiele sind hier Serinproteasen (z.B. Thrombin, Elastasen, Tryptasen), Threoninproteasen (z.B. Proteasom), Aspartatproteasen (z.B. Renin, Cathepsin-D), Metalloproteasen (z.B. Angiotensin-konvertierendes Enzym (ACE), Tumor Nekrose Faktor- α konvertierendes Enzym (TACE)) und Cysteinproteasen (z.B. Cathepsin-B, -H, -K, -L, -S) zu nennen.^{7,8} (Zur Benennung der Proteasen siehe auch Kap. 1.3, Cathepsine Kap. 1.4.5) Ein allgemein anerkanntes Beispiel für Protease-Inhibitoren als erfolgreiche therapeutische Wirkstoffe sind die Hemmstoffe des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE). Sie senken den Blutdruck, indem sie den peripheren Gefäßwiderstand herab setzen.⁹

Neben der gestörten Proteolyse in oben genannten Krankheiten kommt sie auch bei Infektionskrankheiten vor, die durch Bakterien, Viren oder Parasiten ausgelöst werden. Im Virus sind virale Proteasen essenziell für die Replikation des Virus, wie z.B. beim HI- (Humane Immundefizienz-Virus), Hepatitis-A, -B und -C, West-Nil-, Denguefieber-, Influenza-, Herpes- oder Coronavirus (z.B. SARS). Als Erreger von Pilzinfektionen, bei denen ebenfalls Proteasen wichtige Rollen spielen, sind *Candida albicans* und *Candida tropicalis* (SAPs, sezernierte Aspartatproteasen) zu nennen. Zu den parasitären Infektionen zählen Malaria (Plasmodien), Schistosomiasis (Cathepsine) und Hakenwürmer (Cathepsine).⁷

Die Einführung von Protease-Inhibitoren in den Jahren 1995 und 1996 korreliert mit einem signifikanten Anstieg der Überlebenszeit der Patienten mit *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS). Die Erfolge der genannten Protease-Inhibitoren, die ACE oder die HIV-Protease hemmen, haben so zu einem erhöhten Interesse an der Entwicklung von Protease-Inhibitoren zur Behandlung anderer Krankheiten geführt.⁹

Für die Entwicklung von Protease-Inhibitoren sind die zwei größten Herausforderungen zum einen die Validierung von Proteasen als *drug targets* und das klare Verständnis ihrer biologischen Funktion, zum anderen die Entwicklung spezifischer Inhibitoren trotz der großen Anzahl von Proteasen in einem Organismus.¹⁰

Die Anforderungen an das *drug target* sind prinzipiell immer ähnlich. Im Allgemeinen sollte das gesuchte *target* Einfluss auf die Aktivität der Krankheit haben. Weiterhin werden detaillierte Informationen über die spezifischen Eigenschaften der in Frage kommenden Protease benötigt. Ziel ist es, die unterschiedlichen Pathologien zu verstehen, wo genau diese Enzy-

me ihre entscheidende Rolle einnehmen. Erst dann können neue Inhibitoren entworfen werden.⁸

Von Vorteil ist, wenn ein sehr früher Punkt in der Krankheitsentwicklung gefunden wird, in den eingegriffen werden kann. Denn je früher in einer Kaskade inhibiert wird, umso geringer können die Arzneimitteldosen sein und umso effektiver wird der Inhibitor.⁵

Um die Rolle der einzelnen Protease in ihrem biologischen Prozess zu identifizieren und deren Signalübermittlung im gesunden wie kranken Zustand zu verstehen, ist es nötig, das physiologische Substrat zu kennen. Für das Verständnis des Gesamtbildes der spezifischen Protease ist die unmittelbare Wirkung auf das Substrat alleine jedoch nicht immer ausreichend. Wegen der Signalkette folgt meist ein nachgeschalteter Effekt auf das Ende des Signalweges. Entscheidend bei der *target*-Proteaseauswahl ist daher gerade das Verständnis der Komplexität dieser Kaskaden und der nachgeschalteten Auswirkungen. Unerwartete Wechselwirkungen eines Arzneistoffs mit weiteren Proteasen in der Kaskade können verheerende Auswirkungen haben. Beide Risiken machen die Auswahl und Validierung zu einer echten Herausforderung. Von den verschiedenen Ansätzen, die eine Protease-Signalkette als *target* adressieren, ist der der Proteaseinhibitoren der bis dato am besten erforschte.⁵

Die Proteaseinhibitoren können aufgrund ihrer Größe in zwei Kategorien eingeteilt werden: Protease-Inhibitoren mit Proteinstruktur, die aus einer oder mehreren Peptidketten zusammengesetzt sind zum einen, und peptidomimetische oder nicht-peptidische Inhibitoren mit geringem Molekulargewicht zum anderen.⁹

Um eine Protease zu inhibieren, stehen dem pharmazeutischen Chemiker nur wenige Strategien zur Verfügung. Die Hauptstrategie, neben der, allosterische oder *exosite*-adressierende Inhibitoren zu entwickeln, ist es, das sog. aktive Zentrum (siehe auch 1.2 und 1.4.4) durch das Nachahmen einer Teilstruktur des natürlichen Substrats zu blockieren. Denn nur die unmittelbaren Gruppen um die Spaltstelle und diese selbst werden wirklich eng an die Protease gebunden, und das im aktiven Zentrum. Das Wissen um diese „spaltnahen“ Gruppen, oder die Taschen, in die sie spezifisch binden, ist folglich essenziell für die Entwicklung von Inhibitoren des aktiven Zentrums (siehe auch 1.4.3). Normalerweise gehen erste gute Inhibitoren aus dem Austausch des Teils des natürlichen Substrats hervor, welcher direkt mit dem aktiven Zentrum reagiert. Dies kann, bezogen auf die spaltbare Amidbindung, ein nichtspaltbares Isooster sein oder ein *warhead*, der in den katalytischen Mechanismus (siehe Kap. 1.4.4) der Spaltung eingreift (siehe 1.6.1). Eine weitere Optimierung erfolgt dann durch strukturelle Modifizierung und allmähliche Reduzierung des peptidischen Charakters des Moleküls z.B. im *Trial-and-Error*-Verfahren.^{6,11}

Obwohl peptidische Inhibitoren meist schlechte pharmakokinetische Eigenschaften haben, dienen sie sehr oft als Ausgangsverbindungen für das Design von nichtpeptidischen Inhibitoren. Nichtpeptidische Ausgangsverbindungen werden daneben auch durch Screening-Methoden wie das HTS (*High throughput Screening*) von kleinen wirkstoffartigen Molekülen gefunden.¹⁰

Das Design von Proteasen-Inhibitoren kann durch die Verfügbarkeit von Informationen über die dreidimensionalen Strukturen von Proteasen entscheidend verbessert werden. Dieses nun rezeptorbasierte Design (strukturbasiertes Design) baut auf das Wissen um die strukturellen Eigenschaften der aktiven Zentren auf. Hier werden mit Hilfe von Computern entwickelte Moleküle in das aktive Zentrum eingepasst. Dies umfasst das virtuelle Screening, das fragmentbasierte Screening und das Screening von kleinen speziellen Datenbanken (typischerweise mehrere Tausend Verbindungen). Voraussetzung für ein computergestütztes Screening ist die genaue Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der Zielprotease. Ohne ihre Kenntnis können jedoch strukturverwandte Proteasen in gewissem Maße weiterhelfen. Die genaue Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der Protease ist, wenn gleich nicht unentbehrlich, so doch auch vorteilhaft für alle Screening-Methoden und für das Design von Inhibitoren im Allgemeinen.⁵ Ist eine Leitstruktur gefunden, können nun Strukturoptimierungs- (NMR, Kristallographie), rechnergestützte (Docking) und SAR-Methoden (Struktur-Wirkungs-Beziehung) zur Optimierung herangezogen werden.¹⁰

Der perfekte Inhibitor muss folgende Anforderungen erfüllen: Er sollte minimalen Peptidcharakter und hohe Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau besitzen, über gute Membranpermeabilität und lange Lebensdauer im Blutkreislauf und in der Zelle verfügen. Außerdem sollte er nicht zu schnell eliminiert werden und komplett selektiv gegenüber seinem *target* sein. Anders ausgedrückt sollte er exzellente Absorptions-, Verteilungs-, Metabolismus-, Ausscheidungs- und Toxizitätseigenschaften (sog. ADMET-Eigenschaften) besitzen. Darüber hinaus sollte er oral verfügbar und für tägliche (oder weniger häufige) Verabreichung geeignet sein. Ganz offensichtlich gibt es keinen einzigen Inhibitor, unabhängig vom *target*, der all diese Anforderungen erfüllen kann. So stellen auch die besten Proteaseinhibitoren einen Kompromiss dar zwischen Wirksamkeit und Bioverfügbarkeit bei tolerierbaren Nebenwirkungen.^{5,6}

Darüber hinaus ist für die Arzneimittelforschung eine der wichtigsten Fragen, ob reversible oder irreversible Inhibitoren entwickelt werden sollten. Auch wenn beide Klassen in der Lage sind, die Aktivität einer Protease weitgehend zu senken, haben sie doch unterschiedliche Wirkungen gegenüber anderen *off-target*-Proteasen. Ein reversibler Inhibitor, speziell einer mit einer sehr hohen Selektivität, würde nur partiell die Aktivität anderer Proteasen blocken.

Ein irreversibler Inhibitor hingegen würde, abhängig von der Kinetik, früher oder später alle Proteasen blockieren, an die er binden kann.^{5,11}

Der perfekte Inhibitor ist also – zusätzlich zu den bereits genannten Eigenschaften – aufgrund der Bedenken gegenüber Nebenwirkungen, die aus einer ungenügenden Selektivität resultieren, ein reversibel bindender, insbesondere, wenn es um die langen Zeiträume bei der Behandlung von chronischen Krankheiten geht. Trotzdem kann auch ein irreversibler Inhibitor mit nur akzeptabler Selektivität unter gewissen Umständen tragbar sein. Dies ist z.B. in akuten Situationen der Fall, wenn nur eine einmalige Dosis oder die Verabreichung über einen sehr kurzen Zeitraum bereits entscheidende Wirkung bei der Behandlung einer lebensbedrohlichen Krankheit zeigt, gerade wenn die Ausscheidung schnell genug ist und so Nebenwirkungen kaum auftreten. Ein irreversibler Hemmstoff kann auch bei der Behandlung von Infektionskrankheiten von Vorteil sein, wenn der Inhibitor trotz möglicher Nebenreaktionen mit den Wirtsproteasen eine hohe Effektivität und geringe Toxizität aufweist, da er sich im Infektionserreger ansammelt und möglicherweise nur eine kurze Behandlungszeit benötigt wird.^{5,11}

Als letzten großen Schlüsselfaktor gilt es, die Bioverfügbarkeit zu optimieren. Wenn auch die Reduzierung des peptidischen Charakters oftmals die Bioverfügbarkeit erhöht und nebenbei dem Abbau durch endogene Proteasen entgegenwirkt, stellt sie keine allgemeine Lösung für dieses Problem dar. Eine Strategie zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit besteht darin, ein sog. *prodrug*, das erst im Körper in den aktiven Metaboliten umgewandelt wird, herzustellen. Eine andere besteht darin, bereits bei der Entwicklung des Inhibitors auf gewisse Eigenschaften Rücksicht zu nehmen. Denn durch die computerchemische Analyse berechneter Eigenschaften vieler Tausend bekannter Wirkstoffe konnten Parameter gefunden werden, die, wenn sie eingehalten werden, die sog. *drug likeness* deutlich erhöhen. Die sog. *rule of five* besagt, dass die Wahrscheinlichkeit für eine gute orale Bioverfügbarkeit sinkt, sobald eine Verbindung mehr als 5 Wasserstoffbrückendonatoren (Summe aus OH- und NH-Gruppen), ein Molekulargewicht über 500 g/mol, einen logP über 5 und mehr als 10 Wasserstoffbrückenakzeptoren (Summe aus N- und O-Atomen) besitzt. Ausnahmen hierfür sind Verbindungen, die als Substrate von biologischen Transportern aufgenommen werden, oder sich von Naturstoffen ableiten.^{5,12}

1.2 Nomenklatur nach Schechter und Berger

Wie bereits beschrieben, bauen Enzyme Proteine ab. Bei dieser Substrathydrolyse wird das Substrat im aktiven Zentrum gebunden und es bildet sich ein Enzym-Substrat-Komplex. Die Bindungstaschen des Enzyms, die mit dem Substrat wechselwirken, werden nach der Schechter-und-Berger-Nomenklatur bezeichnet (Abb. 1.2-1). Ausgehend von der Spaltstelle werden die Substratreste in Richtung *N*-Terminus mit P_1 bis P_n (non-primed site) und in Richtung *C*-Terminus mit $P_{1'}$ bis $P_{n'}$ (primed site) benannt. Die Taschen im Enzym, in die die Substratreste binden, erhalten die analogen Bezeichnungen S_1 bis S_n und $S_{1'}$ bis $S_{n'}$.¹³

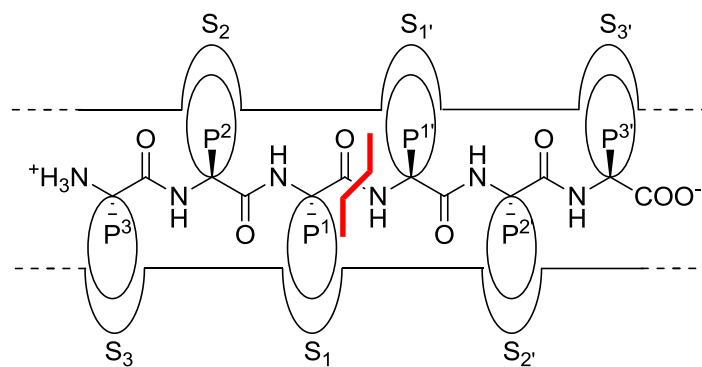


Abb. 1.2-1: Schechter-und-Berger-Nomenklatur¹³ für Enzym und Substrat mit Spaltstelle (rot)

Die Geometrie und weitere Eigenschaften wie hydrophobe, polarisierte oder ionische Bereiche dieser Enzymtaschen, die Wechselwirkungen mit dem Substrat ermöglichen oder verhindern, oder fest gebundene Wassermoleküle in oder zwischen den Taschen bestimmen die Substratspezifität eines Enzym.

1.3 Klassifizierung von Proteasen

Das NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) als Nomenklaturkommission für die numerische Klassifikation von Enzymen teilt diese anhand der Reaktionen ein, die sie katalysieren. Entsprechend dieser Einteilung erhalten die Enzyme EC-Nummern (*Enzyme Commission Numbers*). Proteasen (auch Peptidasen oder Proteinasen) gehören der Gruppe EC-3.4 der Hydrolase-Gruppe EC-3 an. Eine weitere Unterteilung erfolgt anhand der Spaltstelle der Polypeptidkette. So findet bei Exopeptidasen (EC 3.4.11-19) die Spaltung am *N*- (Aminopeptidasen, Abb. 1.3-1 Mitte) bzw. C-Terminus (Carboxypeptidasen, Abb. 1.3-1 rechts) statt. Bei Endopeptidasen (EC 3.4.21-99) findet die Spaltung sehr spezifisch innerhalb der Polypeptidkette statt (Abb. 1.3-1 links). Die weitere Einteilung in Untergruppen erfolgt anhand des aktiven Zentrums, bzw. den darin beteiligten reaktiven Gruppen, in z.B. Aspartyl-, Cystein-, Metallo-, Serin- und Threonylproteasen.^{14,15}

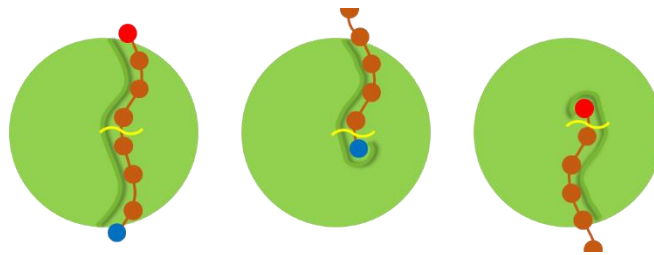


Abb. 1.3-1: Substratspaltung von Peptidasen: Enzym (grün), Substrat (braun), C-Terminus (rot), N-Terminus (blau), Schnittstelle (gelb) – **Links** Endopeptidase – **Mitte** Exopeptidase: Aminopeptidase – **Rechts** Exopeptidase: Carboxypeptidase – Abbildung in Anlehnung an Turk *et al.*⁵

Nach Rawlings und Barrett weist das System des NC-IUBMB für Peptidasen allerdings insofern Schwächen auf, als dass eine kontinuierliche Benennung und Klassifizierung – basierend auf den Reaktionen, welche die Enzyme katalysieren – für diese unmöglich war. Grund hierfür sind die Besonderheiten der proteinhydrolysierenden Enzyme, die eine konsequente oder einfache Bestimmung verhindern. Die aus diesem Grund ersatzweise vergebenen Trivialnamen können dann leicht zu Verwirrungen führen, wenn sie nicht koordiniert vergeben werden.²

Das MEROPS-System nach Rawlings und Barrett berücksichtigt dagegen strukturelle und evolutionäre Gemeinsamkeiten, indem es die Einteilung anhand der Aminosäuresequenz vornimmt. Enzyme, die aufgrund ihrer Sequenz oder der für die Aktivität verantwortlichen Aminosäuren oder ihrer Tertiärstruktur evolutionär verwandt sind, werden in Familien eingeteilt. Familien, die Anzeichen evolutionärer Verwandtschaft ohne signifikante Ähnlichkeiten in

ihren Sequenzen zeigen, werden in einem Clan zusammengefasst. Sie gehen evolutionär aus einem „Urprotein“ hervor (Abb. 1.3-2).¹⁶

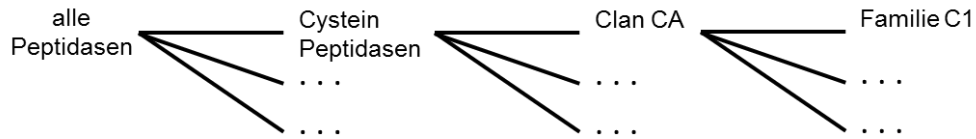


Abb. 1.3-2: Hierarchische Taxonomie nach der MEROPS Datenbank aus Sajid¹⁷

Im MEROPS-System erfolgt die Klassifizierung weiterhin anhand des aktiven Zentrums und des damit verbundenen Katalysemechanismus, repräsentiert durch einen Großbuchstaben. ‚A‘ für Aspartat-, ‚C‘ für Cystein-, ‚G‘ für Glutamat-, ‚M‘ für Metallo-, ‚S‘ für Serin-, ‚T‘ für Threonin- und ‚U‘ für Proteasen mit unbekanntem Typ sowie ‚P‘ für Protein-Nucleophilie (gemischt katalytisch). Neu ist weiterhin die erst 2012 aufgenommene Hauptgruppe ‚N‘ für Asparaginylasen.^{3,18}

1.4 Cysteinproteasen

1.4.1 Einteilung von Cysteinproteasen nach dem MEROPS-System

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf Cysteinproteasen der Papain-Familie im Menschen und in Protozoen. Nach dem MEROPS-System werden Cysteinproteasen in neun Clans eingeteilt (CA, CB, CD, CF, CL, CM, CN, CO, CP), die 61 Familien und weitere 21 Subfamilien umfassen.¹⁸

Der Clan CA umfasst 32 Familien, u.a. die Familie C1 (Papain). Papain (EC 3.4.22.2) aus der Papayafrucht ist die am besten untersuchte pflanzliche Cysteinprotease und dient als Namensgeber für diese Familie. Die Proteinstruktur von Papain war eine der Ersten, die aufgeklärt wurde (1968), 1969 folgte die vollständige Aufklärung der Aminosäuresequenz. Alle Proteasen innerhalb der Familie C1 haben strukturelle Ähnlichkeiten mit Papain, unterscheiden sich aber trotzdem in ihrer Substratspezifität.^{19–21}

1.4.2 Struktur der Cysteinproteasen der Papainfamilie

Entsprechend der Einteilungskriterien des MEROPS-Systems, wie evolutionäre Verwandtschaft, Sequenzähnlichkeit und Tertiärstruktur, weisen alle Cysteinproteasen der Papainfamilie Gemeinsamkeiten auf. Sie bestehen alle aus einem Signalpeptid, einem Propeptid und dem aktiven Zentrum für die Proteolyse. Die Signalsequenz besteht aus 10-20 Aminosäuren. Sie sorgt während der ribosomalen Proteinexpression für die Translokation ins endoplasmatische Retikulum. Dort wird dann, nach der Abspaltung der Signalsequenz, das Propeptid durch Proteolyse in die aktive Form umgewandelt. Von der Prodomäne sind drei Funktionen bekannt: Als Gerüst sorgt sie für die richtige Positionierung und Faltung des aktiven Zentrums. Weiterhin sorgt sie für den Transport des Proenzym in das endosomale-lysosomale Kompartiment. Und zuletzt stellt die Prodomäne einen hochaffinen, reversiblen Inhibitor dar, der verhindert, dass die katalytische Domäne vorzeitig aktiviert wird. Die katalytische Domäne umfasst 220-260 Aminosäuren und ist von den drei Teilstrukturen die am höchsten konservierte. Daneben sind besonders die Sequenzen in unmittelbarer Nachbarschaft des katalytischen Zentrums und die Regionen direkt um den Asparagin- und Histidinrest hoch konserviert.^{22–29}

Aus den hochkonservierten Sequenzen resultiert auch die hoch konservierte dreidimensionale Tertiärstruktur. Die Papain-Familie zeichnet sich durch drei Disulfidbrücken aus, die zwei Domänen verknüpfen. Wie am Beispiel von Papain (Abb. 1.4.2-1 links, orange) beschrieben,

besteht die räumliche Struktur aus zwei in etwa gleich großen Domänen, der L- (links) und R-Domäne (rechts). Das aktive Zentrum befindet sich zwischen diesen beiden Domänen im Bindungsspalt (sog. *active site cleft*) und wird durch einen Cysteinrest, der Teil einer α -Helix der L-Domäne ist, und durch einen Histidinrest, der Teil einer β -Faltblatt-Struktur der R-Domäne ist, ausgebildet. Diese beiden Reste bilden das Thiolat-Imidazolium-Paar, welches die Proteolyse katalysiert und in der Mitte des *active site cleft* liegt.^{28,30,31}

Eine weitere Unterteilung der Cysteinproteasen der Papain-Familie erfolgt anhand der Proteinsequenzen der katalytischen Domänen. Humane und parasitäre Proteasen werden in drei Gruppen eingeteilt: Cathepsin-L- (Abb. 1.4.2-1 Mitte), Cathepsin-B- (Abb. 1.4.2-1 rechts) und Cathepsin-F-like. Für diese Arbeit sind nur die ersten beiden Gruppen von Interesse.

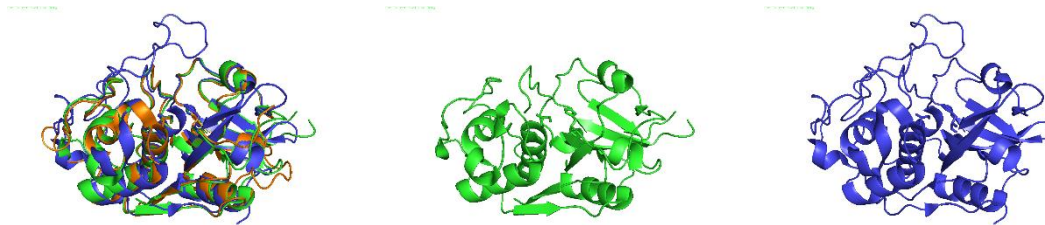


Abb. 1.4.2-1: **Links** Überlagerung von Papain (orange, 1CVZ³²), humanem Cathepsin-L (grün, 2YJC²⁹) und humanem Cathepsin-B (blau, 3A18³³ – **Mitte** Cathepsin-L – **Rechts** Cathepsin-B – hervorgehoben sind Cystein und Histidin des jeweiligen aktiven Zentrums – PDB^{34–37}-Strukturen mit PyMOL³⁸ dargestellt

Der *active site cleft* Cathepsin-L-ähnlicher Proteasen geht über die volle Schnittstelle der L- und R-Domäne (*inter-domainal interface*). Bei Cathepsin-B-ähnlichen Proteasen ist dies nicht der Fall. Hier sind die Bindungsstellen durch den sog. *occluding loop*, der Teile der *primed site* verdeckt, verkleinert. Dieser *occluding loop* entsteht durch eine eingeschobene Sequenz zwischen dem konservierten Pro-Tyr-103- und dem Cys-128-Rest (Cathepsin-B Nummerierung). Weiterhin sind in diesem *loop* auch zwei benachbarte Histidinreste (His-110 und His-111) lokalisiert. Durch diese Besonderheit ist Cathepsin-B eine Carboxypeptidase und spaltet als Exopeptidase (siehe Kap. 1.3) hauptsächlich Dipeptide vom C-Terminus eines Proteins ab. Abhängig vom pH-Wert (neutral) kann Cathepsin-B aber auch Endoproteaseaktivität zeigen. Cathepsin-L besitzt dagegen nur Endopeptidaseaktivität.^{28,31,39}

1.4.3 Substratspezifität von Cathepsin-L- und -B-ähnlichen Cysteinproteasen

Wie in Kap. 1.2 bereits angedeutet bestimmen die Eigenschaften der Bindungstaschen die Substratspezifität. Die Substratspezifität von Cathepsin-L wird durch die Anwesenheit großer hydrophober Reste in der S_2 -Tasche dominiert. Folglich spaltet Cathepsin-L Substrate in der Nähe von großen aromatischen Resten, die in die S_2 - und S_3 -Taschen binden. Für die S_1 -Tasche werden kleine bzw. flexible und unverzweigte Reste bevorzugt. Die Substratspezifität von Cathepsin-B hingegen wird durch basische Reste bestimmt, die in die S_2 -Tasche binden. Mit geringerer Affinität wird auch Phe gebunden. Für die S_1 -Tasche werden große hydrophobe Reste vorgezogen.^{40–42}

1.4.4 Hydrolysemechanismus von Cysteinproteasen der Papainfamilie

Wie in Kap. 1.4.2 beschrieben, besteht das katalytische Zentrum der Cysteinproteasen der Papain-Familie (CAC1) aus dem hochkonservierten Thiolat-Imidazolium-Paar mit Cys-25 und His-159 (Papain-Nummerierung). Weiterhin ist der Asn-175-Rest essenziell für die Katalyse, auch wenn er nur indirekt an dieser beteiligt ist. In der katalytischen Triade ist er für die Ausrichtung des His-159-Rests durch Wasserstoffbrückenbindungen zuständig. So wird der Imidazol-Rest des His-159 so orientiert, dass er die Thiolgruppe des Cys-25 polarisiert und diese schon bei schwach saurem pH-Wert deprotoniert wird. Durch diese für das Cys-25-Thiol außerordentlich hohe Acidität ($pK_a = 4$) kann das präkatalytische Ionenpaar ausgebildet werden. Der Katalysemechanismus der Cysteinproteasen der Papainfamilie erfolgt durch den Angriff des so vorgebildeten nucleophilen Thiolats des Cysteins, unterstützt durch die Protonendonatoreigenschaften des protonierten Imidazols des Histidins (Abb. 1.4.4-1 **1**).^{21,28} Modellrechnungen zum Einfluss protischer Umgebungen zeigen jedoch, dass ein benachbartes Wassermolekül die wahrscheinlichste Protonenquelle darstellt.⁴³ Beim Angriff an ein zu spaltendes Substrat entsteht zuerst ein tetraedrisches Zwischenprodukt, welches durch Wasserstoffbrückenbindungen in das sog. *oxyanion hole* stabilisiert wird (Abb. 1.4.4-1 **2**). Bei dem *oxyanion hole* handelt es sich um eine durch die NH_2 -Gruppe der Seitenkette des Gln-19 und die *backbone*-NH-Funktion des Cys-25 gebildete Tasche in der Protease. Nach Protonenübertrag wird das C-terminale Bruchstück des Substrates abgespalten und der Thiol-Rest acyliert (Abb. 1.4.4-1 **3**). Schließlich entsteht durch die Hydrolyse mit Wasser ein zweites tetraedrisches Zwischenprodukt (Abb. 1.4.4-1 **4**). Als Letztes entsteht eine Carbonsäure des N-terminalen Bruchstücks des Substrates und die freie Thiolgruppe des Cys-25 wird wieder zurückgebildet (Abb. 1.4.4-1 **5**). Danach ist wieder ein neuer Katalysezyklus möglich.^{21,28}

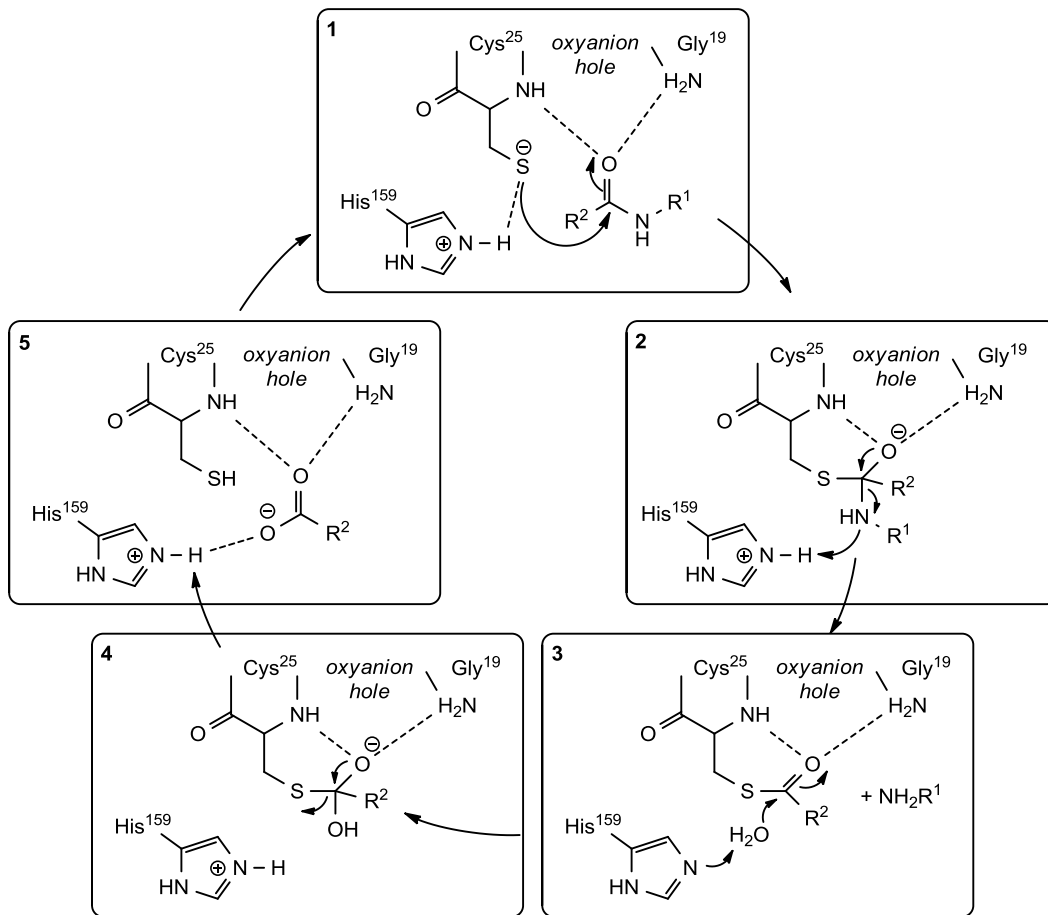


Abb. 1.4.4-1: Katalysemechanismus der Hydrolyse von Papain an Anlehnung an Otto *et al.*²¹

1.4.5 Vorkommen und Funktion der Cysteinproteasen der Papainfamilien CAC1

Im Folgenden soll das Augenmerk auf die humanen und parasitären Papain-ähnlichen Cysteinproteasen gelegt werden. Dabei ist die Familie C1 von besonderem Interesse, da in ihr viele Proteasen enthalten sind, die als potentielle *targets* für Arzneistoffe gelten.

In Säugern sind das viele Proteasen der sog. Cathepsin-Gruppe (Clan CA, Familie C1). Der Begriff Cathepsine wird benutzt, um die intrazellulären Proteasen zu beschreiben, von denen sich die meisten in den Lysosomen befinden. Lysosomen werden vom Golgi-Apparat abgeschnürt und enthalten Verdauungsenzyme und Phosphatasen. Ihre Aufgabe liegt darin, körperfremde Proteine und Substanzen zu verdauen. Die meisten dieser Verdauungsenzyme sind Cysteinproteasen, die bei schwach saurem pH - der lysosomale pH liegt bei etwa 5 – aktiv sind. Neben ihrer Hauptfunktion im lysosomalen Proteinrecycling sind Cathepsine auch bei einer Vielzahl von wichtigen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt:

z.B. Apoptose, Knochenumbau, Differenzierung der Keratinozyten und Antigenpräsentation (Übersicht der humanen Cathepsine in Tab. 1.4.5-1). Bei der Apoptose kommen Cathepsin-B und -L als Cysteinproteasen neben -D (Aspartatprotease) Schlüsselrollen zu. Da Apoptose auch ein entscheidender Prozess in der Immunregulation darstellt, ist es sehr wahrscheinlich, dass die lysosomalen Cathepsine auch eine bedeutende Rolle bei der Immunantwort spielen. Denn das Abklingen einer Entzündung ist abhängig von der Apoptose der entzündeten Zellen und deren Beseitigung durch Fresszellen wie Makrophagen.

Wie in Kap. 1.1 bereits angedeutet kann sich die veränderte Aktivität von Enzymen negativ auswirken. So ist falsch regulierte Cathepsinaktivität mit Ursache von, oder fördert Krankheiten wie, Krebs, Asthma, Arteriosklerose, Alzheimer-Krankheit, Periodontitis, rheumatische Arthritis, entzündlicher Darmerkrankung, Osteoarthritis und Lungenfibrose (Tab. 1.4.5-1). Damit bieten Cathepsine direkte Angriffspunkte zur Krankheitsbehandlung.^{21,44}

Tab. 1.4.5-1: Humane Cathepsine mit ausgewählten Funktionen und Krankheiten in Anlehnung an Conus und Simon⁴⁵

Cathepsin	Klasse	Vorkommen	Funktion	Krankheiten
<i>Cathepsin-B</i>	Cystein	ubiquitär	Frühe Neutrophile, T- und B-Zellen Apoptose	Entzündungskrankheiten, Alzheimer, Krebs
<i>Cathepsin-C</i>	Cystein	ubiquitär	Aktivierung der Granzyme A und B	Entzündungserkrankungen
<i>Cathepsin-D</i>	Aspartat	ubiquitär	Frühe Neutrophile, T- und B-Zellen Apoptose, Auswahl von Peptid-MHC-II-Komplexen	Entzündungserkrankungen, Krebs, rheumatische Arthritis, Alzheimer
<i>Cathepsin-E</i>	Aspartat	Immunzellen	Auswahl von Peptid-MHC-II-Komplexen	Neurodermitis, Dermatitis
<i>Cathepsin-F</i>	Cystein	ubiquitär	TLR-Signalisierung	Krebs
<i>Cathepsin-G</i>	Serin	Neutrophile Lysosomen B-Zellen	IL-8, IL-1beta und TNF-alpha Aktivierung, IL-6 Deaktivierung, Zerstörung des Autoantigens MBP (in B-Zellen)	Entzündungserkrankungen
<i>Cathepsin-H</i>	Cystein	ubiquitär	ECM Abbau	Krebs
<i>Cathepsin-K</i>	Cystein	Epithelzellen	TLR-Signalisierung, ECM Abbau, Knochenumbau	rheumatische Arthritis
<i>Cathepsin-L</i>	Cystein	ubiquitär	TLR-Signalisierung, Auswahl von Peptid-MHC-II-Komplexen, Produktion von NKT und CD4 T-Zellen, neuronaler Zelltod, Osteoklasten Knochenabbau, ECM Abbau	Krebs, rheumatische Arthritis, Arteriosklerose, Thymuspathologie
<i>Cathepsin-S</i>	Cystein	antigen-präsentierende Zellen	TLR-Signalisierung, Auswahl von Peptid-MHC-II-Komplexen, Produktion von NKT und CD4 T-Zellen, ECM Abbau	Arthritis, Arteriosklerose, bronchiales Asthma, Chronisch obstruktive Lungenerkrankung, Schuppenflechte, Krebs
<i>Cathepsin-V</i>	Cystein	ubiquitär	Auswahl von Peptid-MHC-II-Komplexen, Produktion von NKT und CD4 T-Zellen	Thymuspathologie, Krebs
<i>Cathepsin-W</i>	Cystein	NK und CD8+ zytotoxische T-Zellen	Auswahl von Peptid-MHC-II-Komplexen	atrophische Gastritis
<i>Cathepsin-X</i>	Cystein	ubiquitär	Aktivierung von T-Zellen	Krebs

In parasitären Organismen übernehmen Peptidasen sehr viele unterschiedliche biologische Aktivitäten. In erster Linie ist es für das Überleben und die Fortpflanzung essenziell den Wirt zu infizieren. Hier ermöglichen Peptidasen die Invasion in Zellen und sie verdauen Wirtsproteine zur Ernährung. Darüber hinaus sind sie an der Manipulation des Immunsystems betei-

ligt, um eine Immunantwort zu unterbinden oder zu verändern, und damit das Überleben und die Vermehrung des Parasiten zu ermöglichen.¹⁷

Von den 32 Familien in Clan CA enthalten mindestens 12 Familien Peptidasen von Protozoen und umfassen mit 84 % die größte Gruppe parasitärer Cysteinproteasesequenzen (für eine Übersicht von Cysteinproteaseclans, die aus Parasiten und Protozoen stammen, siehe Abb. 1.4.5-2). Innerhalb des Clans CA gehören die parasitären Cysteinproteasen zu den am besten untersuchten. Darunter befinden sich Proteasen, die als vielversprechende *targets* für die Wirkstoffentwicklung angesehen werden, wie z.B. Falcipaine von *Plasmodium* (Malaria) und Cruzain von *Trypanosoma cruzi* (Chagas-Krankheit). Am Beispiel von Cathepsin-L-ähnlichen Cysteinproteasen von *Leishmania mexicana* konnte gezeigt werden, dass sie die Th1-Immunantwort des Wirts hemmen.¹⁷

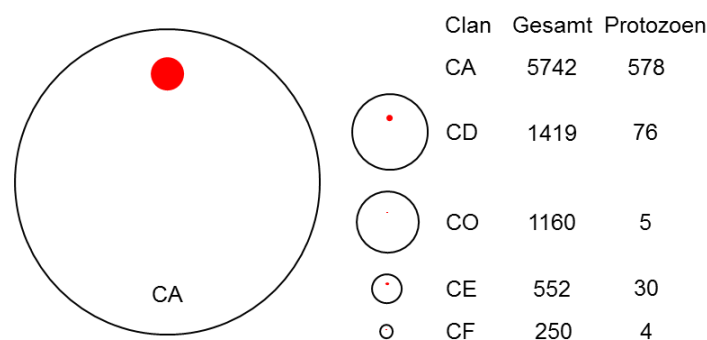


Abb. 1.4.5-2: Übersicht der Cysteinproteasesequenzen der MEROPS-Datenbank mit den Anteilen der Proteasen aus Protozoen und Parasiten (rote Kreise). Die Größe der Kreise ist proportional zur Anzahl der Peptidasen, die sie repräsentieren. Abb. in Anlehnung an Atkinson *et al.*¹⁷

45 % der in Clan CA zugeordneten Proteasen aus Parasiten und Protozoen gehören der Familie C1 und dort der Subfamilie C1A an, der auch die oben genannten Cathepsine des lysosomalen Systems angehören. Sie lassen sich weiterhin ebenfalls in Cathepsin-L- und -B-ähnlich unterteilen. Damit existieren zu den humanen Proteasen, die für eine Immunabwehr essenziell sind, auch homologe parasitäre Proteasen. Die Herausforderung bei der Entwicklung antiparasitärer Wirkstoffe ist es nun, neben sehr potenten auch eben sehr selektive Inhibitoren zu entwickeln, die die Wirtsproteasen nicht, oder nur in einem vertretbaren Rahmen, inhibieren. Ansatzpunkt hierfür ist das unterschiedliche pH-Optimum. Dieses liegt, wie beschrieben, bei den intrazellulär agierenden Cathepsinen im leicht sauren Milieu. Da die parasitären Proteasen neben den intra- auch extrazelluläre Funktionen übernehmen, liegt ihr pH-Optimum, der extrazellulären Matrix angepasst, im neutralen bis leicht basischen Bereich.^{17,28,46,47}

1.5 Leishmaniose als vernachlässigte tropische Infektionskrankheit

1.5.1 Übersicht parasitär verursachter tropischer Infektionskrankheiten

Die Bezeichnung „vernachlässigte tropische Krankheiten“ bezieht sich auf eine Gruppe von vor allem chronischen, schwächenden, oftmals auch stigmatisierenden Krankheiten, die in erster Linie Auswirkungen auf die Ärmsten der Armen und Menschen in abgelegenen ländlichen und benachteiligten städtischen Gegenden haben. Typisch sind verzögerte körperliche und geistige Entwicklung in der Kindheit und verminderte Arbeitsproduktivität im Alter. Die erste Liste der sog. *neglected tropical diseases* (NTDs) der WHO umfasste noch 13 durch Würmer, Bakterien oder Protozoen hervorgerufene Infektionskrankheiten. Mittlerweile laufen mit viralen, Pilz- und ektoparasitischen Infektionen über 40 Krankheiten unter dieser Bezeichnung (Tab 1.5.1-1).^{48,49}

Tab. 1.5.1-1: Übersicht der NTDs mit Erregern und endemischen Gebieten mit Fokus auf Protozoeninfektionen in Anlehnung an Utzinger *et al.*⁴⁹

NTDs	Erreger	Endemische Gebiete
Wurminfektionen		
Bakterieninfektionen		
Protozoeninfektionen		
- Chagas-Krankheit	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Lateinamerika
- Afrikanische Schlafkrankheit	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i> und <i>T. brucei rhodesiense</i>	Afrika
- Leishmaniose	Viscerale L.: <i>Leishmania donovani</i> , <i>L. chagasi</i> , <i>L. infantum</i> (Muko-)kutane L.: <i>L. major</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. mexicana</i> und andere <i>L. spp</i>	Indischer Subkontinent, Asien, Afrika, mediterranes Becken, Südamerika
Pilzinfektionen		
Virenfektionen		
Ektoparasitinfektionen		

Im Gegensatz zu den „großen Drei“, das sind die Tropenkrankheit Malaria, die Tuberkulose und HIV/AIDS, die durch ihre globalen epidemiologischen und ökonomischen Auswirkungen dauerpräsent und damit nicht auf diesen Listen zu finden sind, trifft das für die vernachlässigten Tropenkrankheiten nicht zu. Die Gründe für diese Vernachlässigung sind vielfältig. Zu den wichtigsten gehören die enge Verzahnung mit Armut, die geographische Isolation und unzureichende politische wie finanzielle Ressourcen zu ihrer Kontrolle, um nur ein paar zu nennen. Die globale Belastung alleine durch die in Tab. 1.5.1-2 hervorgehobenen protozoischen Erkrankungen ist enorm. Die Folgen der Vernachlässigung sind jahrzehntealte Medikamente, die von Beginn an bereits starke Nebenwirkungen zeigten und deren Erfolg nun durch aufkommende Resistenzen zusätzlich erschwert wird.⁴⁷⁻⁴⁹

Tab. 1.5.1-2: Globale Belastung durch ausgewählte Protozoeninfektionen im Vergleich mit den „großen Drei“ in Anlehnung an Utzinger *et al.*⁴⁹ – nd = not determined

Krankheit	Risikopopulation (in Mio.)	Infizierte (in Mio.)	Kranke (in Tausend)	Tote (in Tausend/a)
<i>NTD Protozoeninfektionen</i>				
- <i>Leishmaniose</i>	350	12	nd	70
- <i>Chagas-Krankheit</i>	120	8	nd	14
- <i>Afrikanische Schlafkrankheit</i>	>60	>0.03	nd	<10
<i>Die „großen Drei“</i>				
- <i>Malaria</i>	2211	nd	515	889-1272
- <i>HIV/AIDS</i>	nd	33	nd	1800-2777
- <i>Tuberkulose</i>	nd	nd	>8,8	1464-1566

1.5.2 Leishmaniose als *neglected tropical disease* (NTD)

Risikogebiete

Wie in Tab. 1.5.1-2 gezeigt gibt es nach Schätzung der WHO weltweit ca. 12 Mio. mit Leishmaniose infizierte Menschen, von denen jährlich ca. 70 Tausend der Krankheit erliegen. 350 Mio. weitere leben in Risikogebieten. Diese korrelieren mit dem Lebensraum der Vektoren, die die Parasiten übertragen. Das sind die weiblichen Sandmücken der Gattungen *Phlebotomus* und *Lutzomyia*. Somit sind hauptsächlich tropische und subtropische Regionen in Afrika, Amerika, Südostasien und Indien betroffen, aber auch der Mittelmeerraum. In Europa, das traditionell als *Leishmania-frei* angesehen wurde, verschob sich zudem die Ausbreitung der Sandfliegen innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte weiter nach Norden. Dies ist möglicherweise auf den Klimawandel zurückzuführen, auf jeden Fall vergrößerte sich aber dadurch das Risikogebiet für Infektionen.^{48,50,51}

Arten

Die protozoischen Parasiten der Gattung *Leishmania* lassen sich in zwei Untergattungen unterteilen. Die der „neuen Welt“ (= Amerikanischer Kontinent) *Viannia* (z.B. *Leishmania braziliensis*) und die der „alten Welt“ (= Afrika, Asien, Europa) *Leishmania* (z.B. *Leishmania major*). Weiterhin zeigen die Parasiten zwei Entwicklungsformen, abhängig von den Phasen in ihrem Lebenszyklus: Amastigoten, als vorwiegend intrazelluläre, unbegeißelte Wirtsform und die promastigote begeißelte Form im Darm des Vektors. Eine genaue Übersicht der *Leishmania* Arten mit geographischer Verbreitung ist Tab. 1.5.2-1 zu entnehmen.^{50,52}

Tab. 1.5.2-1: Nomenklatur der *Leishmania*-Arten nach Gattung, Komplex, Art und geographischer Verbreitung in Anlehnung an Antinori *et al.*⁵³

Gattung	Komplex	Art	Geographische Verbreitung	
<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>	China, indischer Subkontinent, Äthiopien, Sudan, Kenia, Iran, Saudi Arabien, Jemen	
		<i>L. infantum</i>	Albanien, Algerien, Frankreich, Griechenland, Italien, Marokko, Portugal, Spanien, Syrien, Tunesien, Türkei, Jemen	
		<i>L. chagasi</i>	Argentinien, Bolivien, Brasilien, Kolumbien, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, Martinique, Mexiko, Nicaragua, Paraguay, Suriname, Venezuela	
			<i>L. archibaldi</i>	Indien, Sudan, Äthiopien, Libanon, Israel
	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	Afghanistan, Algerien, Aserbaidshan, Griechenland, Iran, Irak, Israel, Marokko, Tunesien, Türkei, Jemen	
			<i>L. aethiopica</i>	Äthiopien, Kenia
			<i>L. major</i>	Afghanistan, Algerien, Tschad, Iran, Irak, Israel, Libyen, Mauretanien, Marokko, Syrien, Sudan
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i>	Belize, Kolumbien, Costa Rica, Dominikanische Republik, Ecuador, Guatemala, Honduras, Mexiko, Panama, Venezuela	
			<i>L. amazonensis</i>	Bolivien, Brasilien, Kolumbien, Costa Rica, Ecuador, Französisch-Guyana, Peru, Suriname, Venezuela
			<i>L. garnhami</i>	Venezuela
<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	Brasilien, Kolumbien, Ecuador, Französisch-Guyana, Peru, Suriname, Venezuela	
			<i>L. panamensis</i>	Belize, Kolumbien, Costa Rica, Ecuador, Honduras, Nicaragua, Panama, Venezuela
			<i>L. naiffi</i>	Brasilien, Französisch-Guyana, Ecuador, Peru
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	Argentinien, Belize, Bolivien, Brasilien, Kolumbien, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, Nicaragua	
			<i>L. peruviana</i>	Peru
		<i>L. liaisoni</i>	Brasilien, Bolivien, Peru	

Lebenszyklus

Die Infektion erfolgt durch die Übertragung von Promastigoten aus dem Speichelapparat beim Stich der Mücke in den Menschen. Unter der Haut werden die Promastigoten von Monozyten, dendritischen Zellen oder Makrophagen als Fremdkörper erkannt und zur Zerstörung durch Phagozytose aufgenommen. Entgegen dem normalen Vorgang bleiben die Parasiten dabei aber in den phagolysosomalen Vakuolen, ohne intrazellulär verdaut zu werden. Um dies zu erreichen, haben die Leishmanien eine Reihe von ausgefeilten und raffinierten Mechanismen entwickelt, mit denen sie die Verteidigungsmechanismen der Wirtszelle untergraben. Dies umfasst vor allem das Unterbinden der Aktivierung von Stickstoffmonoxid (NO) als tödliches antimikrobielles Mittel und die Manipulation verschiedenster Signalwege durch die Spaltung diverser Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren, die für die natürliche Ausbildung einer wirksamen Immunantwort notwendig wären. So wird die natürliche Immunantwort unterdrückt und die nun zu Amastigoten reifenden und sich vermehrenden Promastigoten können sich in den phagolysosomalen Vakuolen, wie in einem trojanischen Pferd, in den Wirtszellen verstecken. Die Wirtszelle wird also bei der Invasion nicht direkt getötet, sondern bis zu ihrem Aufbrechen als lebendige Nahrungsquelle erhalten. Die später frei werdenden neuen Amastigoten können weitere Zellen infizieren und durch einen zweiten Stich außerdem wieder in eine Mücke gelangen. Im Darm des Vektors erfolgt dann die Umwandlung in Promastigoten, die hier nicht weiter behandelt werden soll.⁵⁴⁻⁵⁶

Immunantwort

Einen Arzneistoff zu entwickeln erfordert ein tieferes Verständnis der natürlichen bzw. veränderten Immunantwort. Die natürliche Immunantwort wird durch eine komplexe Abfolge von Immunparametern vermittelt. Diese umfassen als angeborene Immunabwehr Makrophagen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten. Außerdem gehören zum adaptiven Immunsystem B- und T-Lymphozyten. Einteilen lässt sich die Immunantwort in die Th1-Antwort (Immunabwehr gegen intrazelluläre Pathogene wie Viren durch Makrophagen und T-Lymphozyten) und Th2-Antwort (Immunabwehr gegen extrazelluläre Pathogene wie Bakterien durch B-Lymphozyten). Die Th1-Antwort wird durch die Botenstoffe Interferon- γ und Interleukin-2 (IL-2) und -12 dominiert, die Th2-Antwort durch Interleukin-4 und -5. Im natürlichen Zustand wird bei der Aktivierung der einen Immunantwort die andere herunter reguliert. Im Fall der Invasion von Makrophagen durch Promastigoten kommt es z.B. bei *Leishmania major* zu einer Inhibierung der Interleukin-12-Produktion. IL-12 ist aber essenziell für die korrekte Immunabwehr, da es normalerweise durch Hochregulierung der Stickstoffmonoxid-Synthase und Interferon- γ Produktion die Konzentrationen dieser beiden Botenstoffe am In-

fektionsort erhöht, und so zur korrekten Immunantwort weitere proinflammatorische Zellen (Neutrophile, Mastzellen und Makrophagen) angefordert werden. Durch eine abgesenkte Interleukin-12-Produktion wird die Immunantwort nun in Richtung extrazellulärer Th2-Antwort verschoben, welche aber eben nicht in der Lage ist, die intrazellulären Parasiten zu bekämpfen. Ein Aufrechterhalten bzw. Auslösen der korrekten Immunantwort könnte folglich vor einer Erkrankung schützen oder zumindest eine Vermehrung der Parasiten verringern.⁵⁷⁻⁵⁹

1.5.3 Leishmaniose: Krankheitsbilder und Therapie

Durch die Leishmaniose werden drei Krankheitsbilder ausgelöst:

- *Cutaneous Leishmaniasis*: Nach dem Stich bilden sich für gewöhnlich knotige Hautveränderungen (Orientbeule), die sich langsam vergrößern und eitern. In der Regel heilen die Läsionen spontan ab und hinterlassen Narbengewebe. Je nach Erreger sind Übergänge zur mukokutanen Form möglich. Die auslösenden Erreger sind für die „neue Welt“: *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, und für die „alte Welt“: *L. major*, *L. tropicana* und *L. aethiopica*.⁶⁰
- *Mucocutaneous Leishmaniasis*: Die kutane Form kann sich - bei Erregern der „neuen Welt“ - im Laufe der Erkrankung auf Schleimhäute (Nase, Mund & Rachen) ausdehnen. Dort werden im unbehandelten Verlauf der Krankheit die Schleimhäute und Bindegewebe- und Knorpelstrukturen des Nasen-Rachen-Raums zerstört. Die auslösenden Erreger sind *L. braziliensis* und *L. guyanensis*.^{53,60,61}
- *Visceral Leishmaniasis*: Auch als Dum-Dum-Fieber bekannt; bei der visceralen Form werden innere Organe befallen. Die Folgen sind z.B. Fieber, Gewichtsverlust und die typische dunkle Pigmentierung der Haut (indisch: Kala Azar). Unbehandelt sterben ca. 90 % der Patienten (abhängig vom Immunsystem) innerhalb von zwei Jahren. Meist sind innere Blutungen oder Sekundärinfektionen der Grund. Die auslösenden Erreger sind *L. donovani*, *L. infantum* und *L. chagasi*.^{48,53,60}

Die aktuelle Therapie wird überschattet von Toxizitäts- und Teratogenitätsproblemen der verfügbaren Arzneimittel, niedriges Anspringen bei Koinfektionen und aufkommenden Resistenzen. Fünfwertige Antimonverbindungen (Pentostam®, Glucantime®) werden seit mehr als fünf Jahrzehnten verwendet und sind immer noch erste Wahl, solange keine Resistenzen vorliegen. Neben den aufkommenden Resistenzen sind aber vor allem die Kardiotoxizität sowie die möglichen Nebenwirkungen Anaphylaxie, Anämie, Leukopenie, Thrombozytopenie, Hautausschlag, Kopfschmerzen, Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Gelenkschmer-

zen und Muskelschmerzen ein großes Problem. Auch die Alternativen Pentamidin (Pentacarinat®) und Amphotericin (bzw. die Formulierungen AmBisome®, Abelcet® und Amphocil®) zeigen akute Nebenwirkungen wie hohes Fieber, Schüttelfrost, Hypotonie, Appetitlosigkeit, Atembeschwerden, Kurzatmigkeit und führen in Ausnahmefällen zu einem anaphylaktischen oder kardiogenen Schock. Auch das seit 2002 verfügbare Miltefosin (Impavido®), von dem mit bis zu 94 % die höchsten Heilungsraten dokumentiert sind, muss als teratogen angesehen werden und zeigt als Nebenwirkungen Erbrechen, Durchfall und Kinetosen. Außerdem gibt es jetzt bereits Bedenken wegen möglicher Resistenzen, da *in vitro* leicht resistente Stämme kultiviert werden können. Das Bild runden Posaconazol (Triazol-Antimykotikum gegen die Chagas-Krankheit) und Tafenoquine (Malaria) ab, die ursprünglich gegen andere Krankheiten entwickelt wurden, aber teils hochaktiv gegen *Leishmania in vitro* sind. Darüber hinaus ist der genaue Wirkungsmechanismus einiger dieser Medikamente nicht klar. Bei der Suche nach neuen potentiellen *drug targets* liegt der Fokus aktuell bei für den Parasiten essenziellen Stoffwechselwegen.^{62–64}

1.5.4 Cath-L- und -B-ähnliche Cysteinproteasen der Leishmanien

Parasitäre Cysteinproteasen der Familie CAC1

Wie für die Leishmaniose beschrieben, stützt sich die Behandlung von vernachlässigten Krankheiten, die durch parasitäre Protozoen ausgelöst werden, hauptsächlich auf Jahrzehnte alte Medikamente. Schwere toxische Nebeneffekte und das Entstehen neuer resistenter Parasitenstämme zeigt die Notwendigkeit für neue, sichere und wirksame Medikamente. Ein immer besseres Verständnis der Krankheitsprozesse und die Veröffentlichungen von Kristallstrukturen parasitärer Proteine beschleunigen die Forschung in diese Richtung. Papain-ähnliche Cysteinproteasen wurden z.B. in *Trypanosoma cruzi* (Cruzain), *Plasmodium falciparum* (Falcipaine), *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Rhodesain und TbCatB) und in verschiedenen *Leishmania*-Arten identifiziert. Die Hemmung dieser Peptidasen hat vielversprechende Ergebnisse sowohl *in vitro*, in Gewebekulturmodellen als auch *in vivo* geliefert. Abbildung 1.5.4-1 zeigt den hohen Homologiegrad durch Überlagerungen von Cathepsin-L- und -B-ähnlichen Cysteinproteasen der Familie CAC1.⁶⁵ Dabei wird auch die sehr starke Ähnlichkeit parasitärer zu humanen Cysteinproteasen offensichtlich.

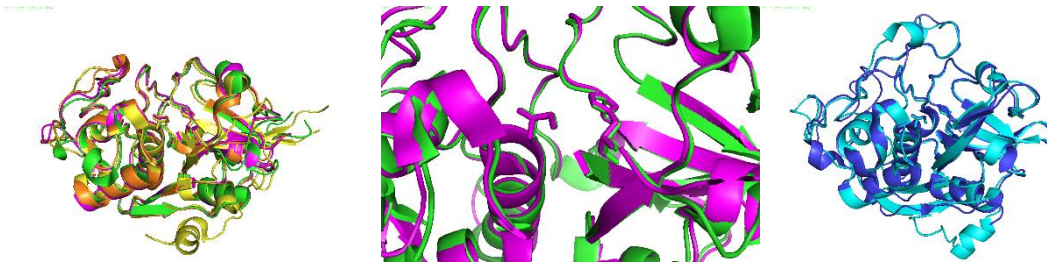


Abb. 1.5.4-1: Überlagerung von: **Links** humanes Cathepsin-L (grün, 2YJC²⁹), Cruzain (lila, 1ME4⁶⁶), Falcipain-2 (gelb, 3BPF⁶⁷), Rhodesain (orange, 2P7U⁶⁸) – **Mitte** humanes Cathepsin-L (grün) und Cruzain (lila) – **Rechts** humanes Cathepsin-B (blau, 3AI8³³, und TbCatB (türkis, 3HHI⁶⁹) – hervorgehoben sind Cystein und Histidin des jeweiligen aktiven Zentrums – PDB^{34–37}-Strukturen mit PyMOL³⁸ dargestellt

Cathepsin-L- und -B-ähnliche Cysteinproteasen der Leishmanien

Bei der Entschlüsselung des Genoms von *L. major* wurden 154 Peptidasen gefunden, darunter Aspartat-, Cystein-, Serin-, Threonin- und Metalloproteasen. Von den 154 Peptidasen sind 65 Cysteinproteasen, die in vier Clans und 13 Familien eingeteilt werden können. In Clan CA befinden sich Cysteinproteasen von acht Familien, und zur Familie C1 gehören die lysosomalen Proteasegruppen CPA, CPB und CPC, welche intensiv untersucht wurden. CPA und CPB sind Cathepsin-L-, CPC Cathepsin-B-ähnlich. Über die genauen Funktionen der Cysteinproteasen ist in den meisten *Leishmania* Gattungen wenig bekannt. Klar ist aber, dass Cysteinproteasen wesentliche Virulenzfaktoren sind, die das Immunsystem des Wirts zum Vorteil des Parasiten manipulieren können. Das macht sie zu potentiellen Therapie-*targets*. Hervorzuheben ist CPB. So sind mutante Amastigoten von *L. mexicana* ohne die Gene der Protease-Gruppe CPB nicht mehr in der Lage, das Wachstum von Läsionen bei BALB/c-Mäusen auszulösen. Außerdem konnte eine signifikante Verschiebung von der zuvor überwiegenden Th2-Antwort zur Th1-Antwort beobachtet werden. Dies passt zum einen zur Beobachtung, dass Cysteinproteasen von *Leishmania* die Expression von Interleukin-4 und -1 stimulieren, was die Immunreaktion in Richtung der Th2-Antwort verschiebt. Zum anderen ist es im Einklang mit den Effekten, die bei Verwendung des Cathepsin-L-spezifischen Inhibitors **K11777** auftreten: Der Inhibitor hemmt das Wachstum von *L. tropicana* und *L. major*. Beides zeigt, dass diese Peptidasen essenziell für die Parasiten sind.^{64,70–73}

Wie in Kap. 1.1 bereits erwähnt ist die genaue Kenntnis der dreidimensionalen Struktur einer Protease vorteilhaft für das Design von Inhibitoren im Allgemeinen und für das virtuelle Screening im Speziellen. Von den *Leishmania*-Protease-Gruppen CPA, CPB und CPC konnten noch keine Strukturen aufgeklärt werden. Für z.B. die CPB2.8 von *L. mexicana* ist aber eine Sequenzübereinstimmung von 60 % für das natürliche Protein bzw. 74 % Sequenzähnlichkeit für CPB2.8 Δ CTE (CPB2.8 ohne C-terminale Verlängerung) mit Cruzain (1ME4⁶⁶)

bekannt, was durchaus ausreichend für das Erstellen eines geeigneten Homologiemodells ist.^{65,74}

Trotz hoher Homologie und stark konservierten katalytischen aktiven Bereichen gibt es zwischen den rekombinanten Formen der Cysteinproteasen von *Trypanosoma cruzi* (Cruzain) und *Leishmania mexicana* (CPB2.8) Unterschiede in der Substratspezifität, die aus den geringen Unterschieden der Bindungstaschen resultieren (Tab 1.5.4-2). So werden für Cruzain an P₁ und P₂ hydrophobe Reste, in P₂ auch basische Reste akzeptiert (aber nicht favorisiert), wobei die flache S₂-Tasche die Substratspezifität bestimmt. Für CPB2.8ΔCTE sind strenge Präferenzen für die S₁ bis S₃ *subsites* bekannt, mit basischen Resten an P₁, hydrophoben Resten an P₂ und Lysin an P₃. Hierbei bestimmen kleine, nicht geladene, hydrophobe Reste in S₂ die Substratspezifität. Im Unterschied zu Cruzain benötigt CPB2.8 weiterhin für die produktive Hydrolyse sehr selektive Wechselwirkungen, die von der Passgenauigkeit der P₁-Seitenkette in die S₁-Tasche abhängen.⁷⁵⁻⁷⁷

Tab. 1.5.4-2: Aminosäurereste der katalytischen Triade, der S- und S'-*subsites* für Papain, Cruzain, *L. mexicana* CPB und *L. major* CPB soweit auch im Parasiten identifiziert, nach Juliano *et al.*⁷⁸ – Unterschiede zwischen Cruzain und *L. mexicana* CPB sind **fett** hervorgehoben – Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben: A (Alanin), C (Cystein), E (Glutaminsäure), F (Phenylalanin), G (Glycin), H (Histidin), L (Leucin), M (Methionin), N (Asparagin), P (Prolin), Q (Glutamin), S (Serin), V (Valin), W (Tryptan), Y (Tyrosin)

Protease	S ₂ <i>subsite</i>	S ₁ <i>subsite</i>	Katalytische Triade	S ₁ ' <i>subsite</i>
Papain	W69, S205, F207	Y67, P68, V133, A160	C25, H159, N175	Q19, W177
Cruzain	N69, E208, S210	L67, M68, A138, G163	C25, H162, N182	Q19, W177
<i>L. mexicana</i> CPB	L69, Y209, V211	L67, M68, A139, G164	C25, H163, N183	Q19, W185
<i>L. major</i> CPB	L69, Y209, V211	L67, M68, A139, G164	C25, H163, N183	Q19, W185

1.6 Inhibitoren von Cysteinproteasen

1.6.1 Designfragen bei der Inhibitorentwicklung

Wie in Kap. 1.1 erläutert, gibt es bei der Suche nach Proteaseinhibitoren zwei Herangehensweisen: entweder die Identifizierung neuer *lead compounds* durch das Screening realer oder virtueller Substanzbibliotheken und anschließende Optimierung, oder das ligandbasierte bzw. bei Kenntnis der Struktur des *targets*, strukturbasierte *drug design*, welches meist zuerst auf der Sequenz des natürlichen Substrats aufbaut. Weiterhin lassen sich zwei Strategien unterscheiden, und zwar die Entwicklung von: kompetitiven (adressieren das aktive Zentrum) oder allosteren Inhibitoren (adressieren eine allosterische Stelle). Außerdem lassen sich reversible und irreversible Inhibitoren unterscheiden, die je nach therapeutischem Kontext favorisiert werden (siehe Kap 1.1).

Die meisten irreversiblen Cysteinproteaseinhibitoren gegen Tropenkrankheiten aus dem klassischen, auf der Struktur des natürlichen Substrats aufbauenden *drug designs* sind folglich peptidische und peptidomimetische Inhibitoren. Eine kurze Peptiderkennungssequenz sorgt für eine gute Affinität und ein *warhead* (die reaktive Gruppe) wird bei der Reaktion mit dem Cysteinrest des aktiven Zentrums irreversibel in die *active site cleft* gebunden (Hemmmechanismus am Beispiel eines Epoxids siehe Abb. 1.6.1-1). Möglich sind irreversible Alkylierungen und Acylierungen durch z.B. Halomethylketone, Vinylsulfone, Epoxide (siehe Kap. 1.6.2), α,β -ungesättigte Ketone und Aziridine (siehe Kap. 1.6.3).^{21,79}

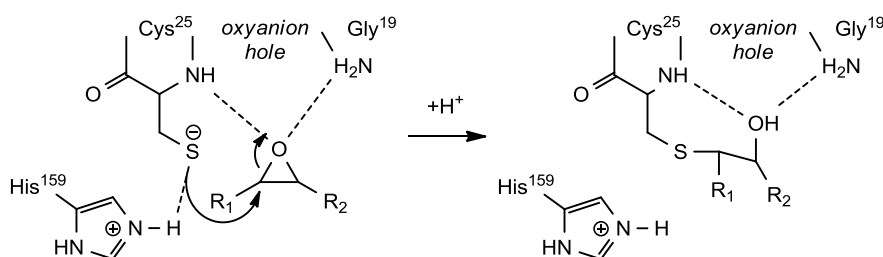


Abb. 1.6.1-1: Hemmung von Cysteinproteasen durch irreversible Ringöffnung am Beispiel eines Epoxids

Im Folgenden soll der Fokus auf Inhibitoren mit Epoxiden (Oxirane) und Aziridinen als irreversible *warheads* für Cysteinproteasen der Papainfamilie gelegt werden.

1.6.2 Oxiran-2,3-dicarbonsäuren als irreversible Cysteinproteaseinhibitoren

Die Gruppe peptidomimetischer Inhibitoren mit Epoxiden (Oxirane) als irreversible *warheads* lässt sich in vier weitere Untergruppen einteilen (Abb. 1.6.2-1). Die Epoxysuccinylpeptide (Abb. 1.6.2-1 Typ II) sind unter physiologischen Bedingungen stabil gegen einfache Thiole und hemmen im Gegensatz zu anderen Inhibitoren nur Cysteinproteasen. Das macht diese Klasse von Inhibitoren für die Arzneimittelforschung sehr interessant.⁷⁹ Im Folgenden sollen deshalb ausgewählte Vertreter des Typs II behandelt werden.

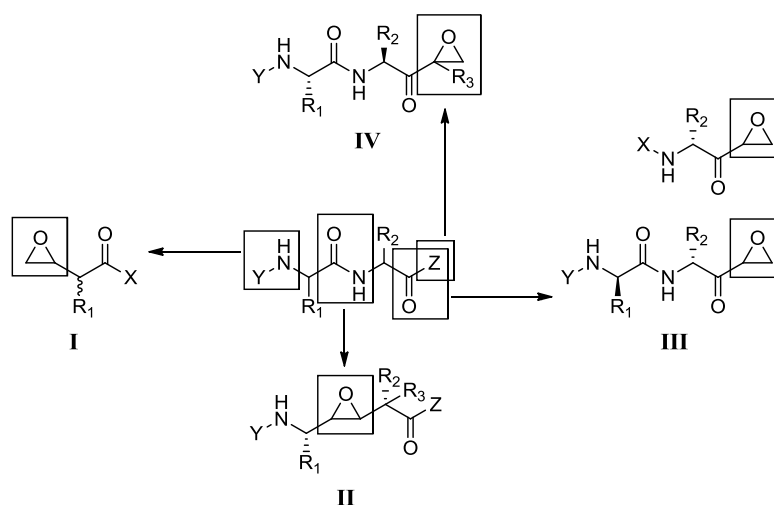


Abb. 1.6.2-1: Peptidomimetische Epoxidinhibitoren der Typen I-IV nach Schirmeister *et al.*⁸⁰

Der erste Vertreter der Klasse der Epoxysuccinylpeptide wurde 1987 als Naturstoff **E-64** aus *Aspergillus japonicus* extrahiert. **E-64** war der erste Cysteinproteaseinhibitor mit einem *trans*-konfigurierten Epoxidring als Schlüsselfunktion. Röntgenstrukturen von **E-64** und **E-64c** in Cathepsinen zeigten einen hochkonservierten Bindungsmodus.⁸¹ **E-64** und **E-64c** zeigen eine anti-Substrat-ähnliche Ausrichtung in die *S-site* von Papain und Cathepsin-B.⁸² Aufgrund der Größe und Struktur der (2*S*,3*S*)-Oxiran-2,3-dicarbonsäure, die mehr als den natürlichen Raum einer Peptidbindung einnimmt, wird die Leucin-Seitenkette (eigentlich ein P₁-Rest) in die hydrophobe S₂-Tasche gebunden. Dies führt dazu, dass bei der Verwendung des Oxiran-Bausteins als *warhead* nicht gleichzeitig auch die *non-primed* S₁-Bindungstasche adressiert werden kann.⁸¹ Die nicht adressierte S₁-Bindungstasche, und die Tatsache, dass die Leucin-Seitenkette nicht ausreicht, um die Unterschiede der S₂-Bindungstaschen innerhalb der Papainfamilie bezüglich der Selektivität auszunutzen, sind Gründe, warum **E-64** und seine Analoga Breitbandinhibitoren von Cysteinproteasen der Familie C1 innerhalb von Clan CA sind.^{80,81} Das (2*S*,3*S*)-Oxiran-2,3-dicarbonsäure-Gerüst bietet allerdings die Möglichkeit Peptide an beiden Seiten anzuknüpfen. Aufgrund dieser Eigenschaft der (2*S*,3*S*)-Oxiran-2,3-

dicarbonsäure kann so je nach verknüpftem(n) Peptidabschnitt(en) entweder ein Breitband- oder ein selektiver Inhibitor entwickelt werden (Abb. 1.6.2-2).⁸¹

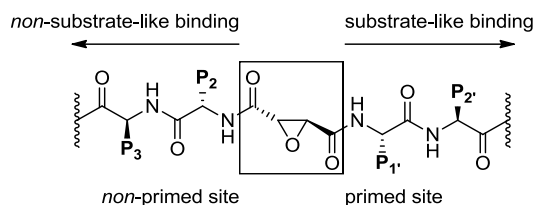


Abb. 1.6.2-2: (2S,3S)-Oxiran-2,3-dicarbonsäure als „Plattform“, um die S- und S'-Bindungstaschen des aktiven Zentrums zu adressieren. Die (2S,3S)-Oxiran-2,3-dicarbonsäure ist durch einen Kasten hervorgehoben und die Nummerierung der Aminosäurereste entspricht der Schechter-und-Berger-Nomenklatur – Abb. in Anlehnung an Schaschke *et al.*⁸¹

So konnten ausgehend von **E-64** weitere Inhibitoren, darunter auch Cathepsin-L- und -B-selektive, dargestellt werden. Von **E-64** (für die Struktur siehe Tab. 1.6.2-3) konnte durch Austausch des Agmatin-Rests und durch Einführen der Ethylestergruppe Loxistatin (**E-64d**) als zellgängiger Arzneistoff gegen muskuläre Dystrophie gefunden werden, der erst in der fortgeschrittenen klinischen Entwicklungsphase scheiterte. Wichtig hierbei ist, dass Ester (z.B. **E-64d**, Tab. 1.6.2-3) *in vitro* nur 1 % - 1 ‰ der Aktivität der freien Säuren aufweisen (z.B. **E-64c**, Tab. 1.6.2-3), als *prodrugs* aber leicht aufgenommen und im Körper in ihre aktive Form, die Carbonsäure, hydrolysiert werden.^{82,83}

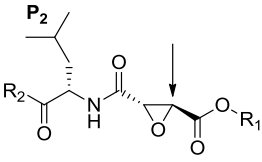
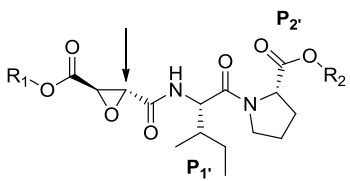
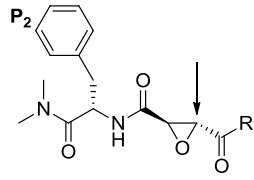
Selektivität für Cathepsin-B *in vitro* lässt sich durch ein C-terminales Carboxylat in der *primed site* erreichen. Hier werden Unterschiede zwischen Cathepsin-L-ähnlichen und -B-ähnlichen Proteasen, die auf den *occluding loop* zurückzuführen sind, ausgenutzt. **CA030** und **CA074** z.B. binden in die S'-*subsite* von Cathepsin-B und die C-terminalen Carboxylate interagieren jeweils mit den beiden protonierten His-Resten des *occluding loop* (**CA0**-Derivate, Tab. 1.6.2-3).^{80,82,84}

Cathepsin-L selektive Inhibitoren hingegen sollten Substituenten tragen, die zu groß sind für die, teilweise durch den *occluding loop* verdeckten, S₁- und S₂-Bindungstaschen der *primed site* von Cathepsin-B. Für die S₂- Bindungstasche der *non-primed site* lässt sich zudem der Umstand ausnutzen, dass Cathepsin-L als einziges Cathepsin auch einen sperrigen Phenylring von z.B. Phenylalanin aufnehmen kann (**CLIK**-Serie, Tab. 1.6.2-3).⁸⁰

Weiterhin wichtig ist, dass Säurederivate der Epoxybernsteinsäure, die in die *non-primed* Bindungstaschen binden sollen, am Oxiran (2S,3S)- (z.B. **E-64**), solche, die in die *primed* Bindungstaschen binden sollen, (2R,3R)-konfiguriert sein sollten. In jedem Fall ist eine *trans*-

Konfiguration essenziell, wenn eine Cysteinprotease inhibiert werden soll, denn eine *cis*-Konfiguration am Inhibitor führt zum totalen Verlust der Aktivität.⁸⁵

Tab. 1.6.2-3: Ausgewählte **E64**- und **CA0**-Derivate sowie Vertreter der **CLIK**-Serie als Beispiele für selektive Inhibitoren innerhalb der Papainfamilie – Der Pfeil zeigt das jeweils vom Cysteinrest angegriffene C-Atom

			
	E-64-Derivate	CA0-Derivate	CLIK-Derivate
<i>Derivate</i>	E-64 $R_1 = H, R_2 = Agm$ E-64c $R_1 = H, R_2 = NH-iAm$ E-64d $R_1 = Et, R_2 = NH-iAm$	CA030 $R_1 = Et, R_2 = H$ CA074 $R_1 = NH-iBu, R_2 = H$ CA074Me $R_1 = NH-iBu, R_2 = Me$	CLIK-148 $R = NH-(CH_2)_2-2-Py$ CLIK-195 $R = Phe-N(Me)_2$
<i>Selektivität</i>	Papain-Familie	Cathepsin-B-ähnlich	Cathepsin-L-ähnlich
<i>Literatur</i>	80,85	80,85,86	80,85

Am Beispiel von Studien des Paares **CA074/CA074-Me** (Säure/Ester) *in vitro*, in Zelllysaten und in Zellen, lässt sich ein Hauptproblem hinsichtlich der Spezifität von Cathepsin-B-selektiven Inhibitoren aufzeigen. **CA074** ist zwar aktiv und Cathepsin-B-selektiv *in vitro*, aber nicht zellgängig. Als C-terminal veresterter Inhibitor **CA074-Me** wird dieser zwar zellgängig, eine Interaktion mit dem *occluding loop* ist allerdings nicht mehr möglich, sodass die verbesserte Zellgängigkeit mit einem erheblichen Verlust der Cathepsin-B-Selektivität *in vivo* einhergeht.⁸⁰

Hält man sich die Tatsache des Beispiels von **E-64c/E-64d** (Säure/Ester) zusammen mit den gezeigten Vertretern der **CLIK**-Serie (Selektivität durch Adressierung beider *subsites*) vor Augen, wird klar, dass das eingangs angepriesene Oxiran-Gerüst zwar viele Möglichkeiten bietet, aber dann an seine Grenzen stößt, wenn neben der Selektivität auch noch die Affinität erhöht werden soll. Bei zwei Carboxy-Funktionen können eben nicht S- und S'-*subsite* zur Selektivitätserhöhung adressiert und gleichzeitig eine freie Carboxy-Funktion am Oxiran erhalten werden, die die Aktivität um mehrere Potenzen erhöht.

Eine Klasse von Inhibitoren, die diese Limitierung überwinden könnte, sind die im folgenden Kapitel beschriebenen Inhibitoren, die anstatt des Oxiran- einen Aziridin-Baustein besitzen.

1.6.3 Aziridin-2,3-dicarbonsäuren als irreversible Cysteinproteaseinhibitoren

Eine neue Klasse von Inhibitoren, die das Problem der in Kap. 1.6.2 beschriebenen mangelnden Selektivität bei gleichzeitiger guter Affinität überwinden könnte, sind Peptide mit elektrophilem Aziridin-2,3-dicarbonsäure-Baustein. Hier können Aminosäuren und Peptide an den Carboxy-Funktionen und zusätzlich an das Stickstoffatom gekoppelt werden, was eine Vielzahl von Derivatisierungen möglich macht. Wie die Epoxide sind auch Aziridine anfällig für eine nucleophile Ringöffnung und können so den Cysteinrest des aktiven Zentrums von Cysteinproteasen in gleicher Weise alkylieren. Im Vergleich zu Epoxiden lassen sich aber am Aziridinstickstoff eben Substituenten anbringen, die neben dem Substitutionsmuster auch die Elektrophilie des Dreirings verändern.⁸⁶

Zu den ersten Epoxidanaloga mit dem Aziridin-Ring zählen Aziridin-2,3-dicarbonsäureanaloga von **E-64** und **CA074**. Sie gehören zu den Typ II Aziridinylpeptiden (Abb. 1.6.3-1), sind aber im Vergleich schwächere Inhibitoren als die entsprechenden Epoxysuccinylpeptide.^{82,87} Die Gruppe der Aziridinylpeptide lässt sich in drei Untergruppen einteilen. Inhibitoren des Typs I, bei denen der Aziridinstickstoff mit einer Aminosäureseitenkette *N*-acyliert ist, Typ II und III mit der Aminosäureseitenkette an einer der Carboxylatfunktionen, wobei Typ III zusätzlich eine Schutzgruppe oder eine Peptidgruppe am Aziridinstickstoff trägt (Abb. 1.6.3-1).⁸⁶ Im Folgenden soll der Fokus auf Erkenntnisse der Eigenschaften von Typ I und II gelegt werden.

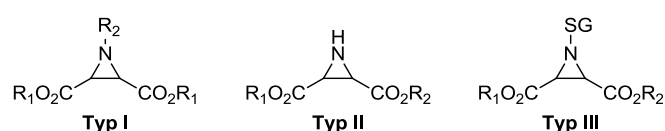


Abb. 1.6.3-1: Schematische Repräsentation von Aziridinylpeptiden des Typs I-III nach Schirmeister⁸⁶ – R₁ = H/nicht-AS-Seitenkette; R₂ = AS-Seitenkette; SG = Schutzgruppe

Die experimentellen Befunde zu Epoxiden und Aziridinen als Inhibitoren von Cysteinproteasen können wie folgt zusammengefasst werden:⁸⁸

- i) Bei pH-Werten um 7 sind Aziridine weniger wirksam, aber bei pH Werten um 4 sind *N*-unsubstituierte und *N*-alkylierte Aziridine genauso potent wie die Epoxide⁸⁸
- ii) Für Verbindungen mit dem Bindungsmodus von **E-64** (*non-primed site*) erhöht eine freie Säure am Dreiring bei Epoxiden wie auch bei Aziridinen die Hemmwirkung im direkten Vergleich mit den entsprechenden Estern.⁸⁸ Grund hierfür ist die starke ionische Wechselwirkung zwischen der Carboxy-Funktion und dem positiv

geladenen Imidazoliumring des Histidin-Rests im katalytischen Zentrum. Diese Wechselwirkung erhöht die Affinität der Verbindungen an das Enzym, was sich in niedrigeren Dissoziationskonstanten (K_i , Enzymkinetik siehe Kap. 4.1.1) zeigt.

- iii) Die Regioselektivität der nucleophilen Ringöffnung durch den Cys-Rest der Protease ist bei Epoxiden: Angriff am α -Kohlenstoff = C2 bei Verbindungen mit Säuren an C2; Angriff an C2 oder C3 (abh. vom gesamten Bindungsmodus) bei Verbindungen mit Ester an C2.⁸⁸ Für Aziridin-Ester des Typs II werden fast gleiche Bindungsposten in der Protease angenommen,⁸⁹ was in der gleichen Regioselektivität münden sollte.
- iv) Für **E-64**-Analoga ist die Reihenfolge bezüglich der Aktivität abhängig vom C2-Substituenten: $\text{CO}_2\text{H} > \text{CONH}_2 > \text{COCH}_3 > \text{CO}_2\text{Et} \approx \text{CO}_2\text{Me} > \text{CH}_2\text{OH} \approx \text{H}$. Der Austausch von CO_2H gegen CONHOH (Hydroxamsäure) bzw. CONH_2 (Amid) bzw. COCH_3 (Keton) beeinflusst dabei hauptsächlich die Geschwindigkeit der Bildung des reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplexes, nicht aber die der irreversiblen Alkylierung des Enzyms.⁸⁸
- v) *N*-acylierte oder *N*-halogenierte Aziridinderivate sind generell potenter als die entsprechenden *N*-unsubstituierten bzw. *N*-alkylierten Analoga. Dieser Trend konnte auch durch theoretische Studien mit elektronenziehenden Gruppen am Stickstoffatom untermauert werden.⁹⁰

Nach den ersten Typ-II-Aziridinen wurden in den folgenden Jahren eine ganze Reihe von Inhibitoren mit Aziridin-2,3-dicarbonsäure-Baustein des Typs I synthetisiert. Die ersten waren Inhibitoren von Papain, Cathepsin-L und Cathepsin-B.^{82,86,91,92} Durch weitere Arbeiten konnten Verbindungen mit antiplasmodialer Aktivität (z.B. **bADA**, ein biotinylierter Dibenzylester)^{93,94}, antitrypanosomaler Aktivität (13c, **RV112D**, Boc-(*S*)-Leu-(*S*)-Pro-(*R,R*)-Azi-(OBn)₂)⁹⁵, weitere Inhibitoren von Cathepsin-L (18a, **RV116C**, Boc-(*S*)-Leu-(*S*)-Azi-(*S,S*)-Azi-(OBn)₂, Abb. 1.6.3-2 links)⁹⁶ sowie Verbindungen mit antileishmanialer Aktivität (13b bzw. 13e, **RV122C** bzw. **RV212C**, Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*S,S*)-Azi(OBn)₂, Abb. 1.6.3-2 rechts, bzw. Boc-(*R*)-Leu-(*S*)-Pro-(*S,S*)-Azi(OBn)₂, beide siehe auch Kap. 1.6.4)⁹⁷ gefunden werden. Dabei kristallisierten sich Verbindungen mit Aziridin-2,3-dicarbonsäurebenzylester und Leucin-Prolin als Dipeptid am Aziridin-Stickstoff als vielversprechende Basis für die Entwicklung anti-parasitärer Leitstrukturen heraus.⁹⁵

Der genaue Bindungsmodus dieser Inhibitoren ist aufgrund fehlender Röntgenstrukturen bis heute unbekannt. Dockingstudien für **RV116C** sagen allerdings einen Substrat-ähnlichen Bindungsmodus in Cathepsin-L voraus. Hier wird ein Benzylester in die S_1 -Tasche, der andere in die S_1 Tasche dirigiert wird. Das Dipeptid mit Boc-Schutzgruppe ragt in die S_2 -

Tasche hinein.⁸⁵ Für **RV122C** in Cathepsin-L hingegen liefert ein anti-Substrat-ähnlicher Bindungsmodus die beste *scoring function* (siehe auch Kap. 3.2.1.1). Hier adressiert der Leucin-Rest die S_1 -Tasche und ein Benzylester die S_1 -Tasche. Der zweite Benzylester und die Boc-Schutzgruppe sind mit diesem Bindungsmodus nicht essenziell für die Bindung an das Enzym. Letzteres konnte erst kürzlich experimentell durch den Inhibitor **CS15** (Boc-Gly-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂) bestätigt werden, der statt der Boc-Schutzgruppe Boc-Gly am *N*-Terminus trägt.⁹⁸

Unveröffentlichte Arbeiten einer (leider wenig aufgelösten) Röntgenkristallstrukturanalyse eines Komplexes von Rhodesain mit dem Inhibitor **RV134C** (Boc-(*S*)-Leu-(*R+S*)-Nip-(*S,S*)-Azi(OBn)₂) deuten jedoch auf einen anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus (entgegengesetzter Verlauf der peptischen bzw. peptid-ähnlichen Grundstruktur des Inhibitors und der Substratbindespalte des Enzyms) hin.

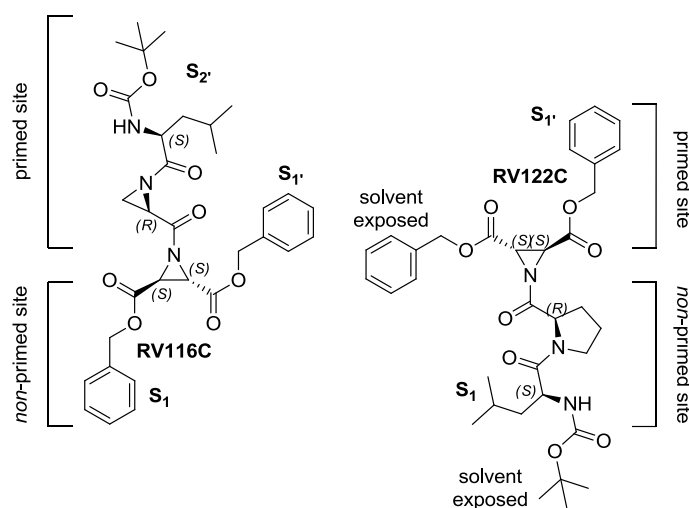


Abb. 1.6.3-2: Schematische Darstellung der berechneten Bindungsmodi von **RV116C**⁹⁶ (links, Substrat-ähnlicher Bindungsmodus) und **RV122C** (unveröffentlichte Ergebnisse) (rechts, anti-Substrat-ähnlicher Bindungsmodus) in Cathepsin-L (1MHW⁹⁹)

Eine weitere wichtige Erkenntnis aus Testungen dieser Substanzbibliotheken für diese Arbeit ist, dass im Gegensatz zu früheren Ergebnissen der Austausch beider Estergruppen durch Säuren nicht zu einer Verbesserung der Hemmung führte. Außerdem sind die Dibenzylester-Derivate denen mit Diethylester überlegen.⁸⁵

1.6.4 Inhibitoren von *Leishmania* Cysteinproteasen

Mit einigen Cysteinproteaseinhibitoren des Clans CA wurde bisher gezeigt, dass sie das Wachstum mehrerer Arten von *Leishmania*, einschließlich *L. donovani*, *L. chagasi*, *L. tropica* und *L. major* hemmen. Hierfür werden eine Reihe von Mechanismen diskutiert.¹⁰⁰

Leitstrukturen dieser Arbeit sind **RV122C** und **CS09** (Strukturen siehe Kap. 2, Abb. 2.-1). **RV122C** entstammt einer Substanzbibliothek, die als Inhibitoren von Cathepsin-L und Cathepsin-L-ähnlichen Cysteinproteasen entwickelt wurde. **RV122C** und **CS09** zeigen antileishmaniale Aktivität. Für EC₅₀-Werte der Aktivität der Testungen an Promastigoten (*L. m. (P)*) und Amastigoten (*L. m. (A)*) von *L. major* sowie *T. brucei brucei* (*T. b. b.*) und *P. falciparum* (*P. falc.*) und Makrophagen (Zytotoxizitätsbestimmung an Zelllinie *J774.1*) siehe Tab. 1.6.4-1.

Tab. 1.6.4-1: Antiparasitäre Aktivität von **RV122C** und **CS09** und Zytotoxizitätsbestimmung – ni = no inhibition

Verb. \ EC ₅₀ [µM]	<i>L. m. (P)</i>	<i>L. m. (A)</i>	<i>T. b. b. 48h</i>	<i>P. falc.</i>	<i>J774.1</i>
RV122C ¹⁰¹	39.6 ⁹⁷	2.7 ¹⁰²	31.4 ⁹⁵	16.2/17.5 ¹⁰³	> 100 ⁹⁷
CS09 ⁹⁸	37.4	2.3	29.5	ni	68.2

CS09 entstammt einer weiteren Substanzbibliothek, die auf **RV122C** und **RV212C** aufbaute und u.A. zum Ziel hatte, Konstitutionsisomere (Austausch von Leu und Pro) sowie Stereoisomere (Variation von (S,S) zu (R,R)) am Aziridin zu untersuchen.¹⁰²

RV122C und **CS09** teilen die identische Peptidsequenz und unterscheiden sich alleine durch die Stereoinformationen am *trans*-konfigurierten Aziridinring. **RV122C** ist (S,S), **CS09** (R,R) konfiguriert. **CS09** ist aber im Gegensatz zu **RV122C** selektiv für parasitäre, Cathepsin-L-ähnliche Cysteinproteasen.¹⁰² Für Dissoziationskonstanten (*K_i*) von **RV122C** und **CS09** gegenüber ausgewählten Cysteinproteasen siehe Tab. 1.6.4-2.

Tab. 1.6.4-2: *K_i*-Werte von **RV122C** und **CS09** an Cathepsin-L (Cath-L), Cathepsin-B (Cath-B), Falcipain-2 (Fal-2), Falcipain-3 (Fal-3), Rhodesain (Rho), Cruzain (Cruz) und LmCPB2.8 – ni = no inhibition, *K_i* > 100 µM – nd = not determined

Verb. \ <i>K_i</i> [µM]	Cath-L	Cath-B	Fal-2	Fal-3	Rho	Cruz	LmCPB2.8
RV122C	6.0 ⁹⁶	ni ⁹⁶	209 ¹⁰³	149 ¹⁰³	1.2 ⁹⁵	0.91 ¹⁰²	1.7 ¹⁰²
CS09	ni	ni	ni	nd	1.7 ¹⁰²	ni	3.8 ¹⁰²

Von Verbindung **RV122C** ist, außer dass sie das Wachstum von Promastigoten von *L. major* mit einem EC_{50} -Wert von $\sim 40 \mu\text{M}$ beeinträchtigt, weiterhin bekannt, dass sie die Infektionsrate von Makrophagen durch Promastigoten mit einem EC_{50} -Wert von $3 \mu\text{M}$ verringert. Bei gleichzeitiger Behandlung mit Interferon- γ konnte diese Konzentration sogar noch weiter gesenkt werden. Auch wenn Verbindung **RV122C** im Vergleich zu Amphotericin B (siehe auch Kap 1.5.3) weniger wirksam gegen extra- und intrazelluläre Parasiten ist, wird – im Gegensatz zu Amphotericin B – bei Konzentrationen nahe des EC_{50} die Ausschüttung der für die Immunantwort wichtigen Cytokine wie Interleukin-12 beeinflusst und außerdem die Stickstoffmonoxid-Produktion der infizierten Makrophagen angeregt. Die Tests an infizierten Makrophagen zeigten so neben dem leishmaniziden Effekt am Enzym, dass Verbindung **RV122C** die Ausbildung der zur Parasitenabwehr nötigen Th1-Immunantwort begünstigt. Und dies, ohne bei den verwendeten Konzentrationen toxisch für die Makrophagenzelllinie J774.1 (Mensch), die NIH 3T3 Fibroblasten (Maus), dendritische Knochenmarkzellen (Maus) oder Bauchfellmakrophagen (Maus) zu sein.⁹⁷

2. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Weiterentwicklung der Aziridin-2,3-dicarbonsäure-basierten Cysteinproteaseinhibitoren **RV122C** bzw. **CS09** durch Design (einschließlich Docking-Rechnungen), Synthese und Testung. Ausgehend von den postulierten Bindungsmodi von **RV116C** und **RV122C** mit Benzylestern in S_1' und/oder S_1 (siehe Kap. 1.6.3) sollten die hydrophoben Gruppen an den Carbonsäuren variiert werden, um die Selektivität und Affinität weiter zu verbessern. Außerdem sollten ausgehend vom postulierten Bindungsmodus von **RV122C**, nach dem weder die Boc-Schutzgruppe noch ein Benzylester essenziell für die Bindung wäre, hydrophile Gruppen am *N*- bzw. *C*-Terminus eingeführt werden. Hauptaugenmerk sollte auf die Einführung einer freien Säure am Aziridin gelegt werden. Der Gedanke hierbei ist die in Kap. 1.6.2 bzw. Kap. 1.6.3 genannten Nachteile der Oxiran-2,3-dicarboxylate auszugleichen. Das zu entwickelnde Aziridinylpeptid des Typs I (siehe Kap. 1.6.3) soll so zum einen beide Enzym-*subsites* adressieren können (durch einen hydrophoben Ester-Rest und das Dipeptid) und zum anderen gleichzeitig eine freie Säure tragen. Durch diese Säure soll die Hemmung durch ionische Wechselwirkung mit dem Histidinium-Rest des katalytischen Zentrums verbessert werden.

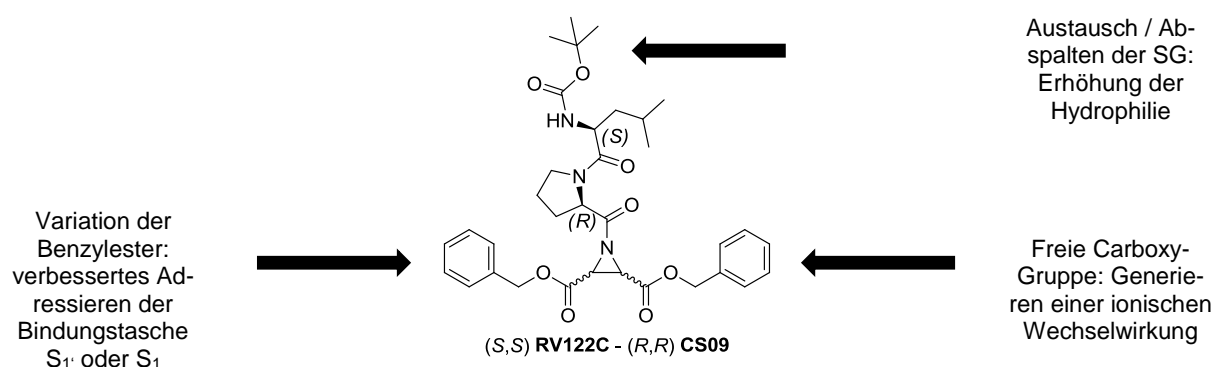


Abb. 2.-1: Struktur von **RV122C** bzw. **CS09** und geplante Modifikationen

Auf der Benzylester-Seite sollte die Kettenlänge variiert werden, aber auch ein Austausch durch kleinere, größere, hydrophobere und hydrophilere Reste stattfinden. Neben dem gleichzeitigen Tausch beider Benzylester, der zu symmetrischen Aziridinen führt, sollten insbesondere unsymmetrische Aziridine generiert werden. Aus diesen unsymmetrischen *warheads* sollten später freie Säuren (Hydrophilie am *C*-Terminus und verbesserte Hemmwirkung, siehe oben) gewonnen werden können. Neben der Einführung einer hydrophilen Gruppe durch Tausch der Boc-Schutzgruppe am *N*-Terminus sollte durch Abspaltung der *N*-terminalen Schutzgruppe eine Verbindung mit freiem Amin dargestellt werden.

3. Ergebnisse: Synthesen und Docking

3.1 Erster Teil: Neue Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Cysteinproteas-einhibitoren

3.1.1 Variation am C-Terminus: Neue Aziridine

3.1.1.1 Kenntnisstand und Problemstellung

Nach den postulierten Dockingmodi^{85,96,(unveröffentlichte Ergebnisse)} von **RV116C** und **RV122C** zeigt je mindestens ein Benzylester in entweder die S_1 - und/oder S_1 -Bindungstasche und ist damit wichtig für die Selektivität und die Aktivität. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Benzylester am Aziridin-Ring zu variieren, um dadurch die Bindungstaschen besser adressieren zu können. Die gleichzeitige Variation beider Benzylester, d.h. also die Synthese symmetrischer Diester, stellt keine Herausforderung dar, da diese in jeder bestehenden Syntheseroute nur einfach ausgetauscht werden müssen.

Anders sieht es bei der Synthese von Inhibitoren mit einer freien Carboxy-Funktion aus. Hier sind einige Limitierungen zu beachten:

- 1) Die Freisetzung der Carboxy-Funktion ist erst nach der Kupplung mit dem Dipeptid möglich. Der Grund hierfür sind mögliche Nebenreaktionen der Säurefunktion des Aziridins bei dessen *N*-Acylierung mit dem *N*-geschützten Dipeptid.
- 2) Die Freisetzung der Carboxy-Funktion muss selektiv und mild erfolgen. Eine wässrig saure Hydrolyse der Carboxy-Schutzgruppe ist aufgrund der Instabilität des Aziridinrings gegenüber säurekatalysierten Ringöffnungsreaktionen nicht möglich. Dies gilt besonders für *N*-substituierte Aziridine, die durch entsprechende Substituenten für eine nucleophile Ringöffnung prädestiniert sind (Acylreste, Halogene, siehe auch Kap. 3.1.4.2),¹⁰⁴ aber auch für *N*-unsubstituierte Aziridine.¹⁰⁵ Außerdem ist die Aziridinbindung als nicht-mesomeriestabilisierte Amidbindung in zu saurem oder zu alkalischem Medium hydrolyselabil (siehe auch Kap. 3.1.3).
- 3) Die *N*-acylierten Aziridine zeigen als *warheads* notwendigerweise eine gewisse Reaktivität gegenüber dem Thiolat der Cysteinproteasen.⁹³ Weiterhin können auch bei nicht-aktivierten Aziridinen mit diversen Nucleophilen Ringöffnungsreaktionen durchgeführt werden.¹⁰⁵ Beide Tatsachen erschweren den Einsatz von Nucleophilen zur Freisetzung der Carboxy-Funktion.
- 4) Neben der Freisetzung der Carboxy-Funktion muss der zweite Ester am Aziridin-Ring erhalten bleiben.
- 5) Die *N*-Schutzgruppe des Dipeptids soll nicht gleichzeitig entfernt werden.

Die allgemeine Syntheseroute zur Darstellung eines Aziridinylpeptids des Typs I wie **RV122C/CS09** geht von einem *N*-unsubstituierten Aziridin-2,3-dicarboxylat aus, welches mit einem *N*-terminal geschützten und *C*-terminal entschützten Dipeptid *N*-acyliert wird. Die Darstellung des Dipeptids erfolgt mittels üblicher Peptidsynthesemethoden. Für die Darstellung des *N*-unsubstituierten Aziridin-2,3-dicarboxylats sind mehrere Syntheserouten möglich (siehe nächste Seite). Die Carboxy-Funktion wird erst nach der *N*-Acylierung freigesetzt (Abb. 3.1.1.1-1).

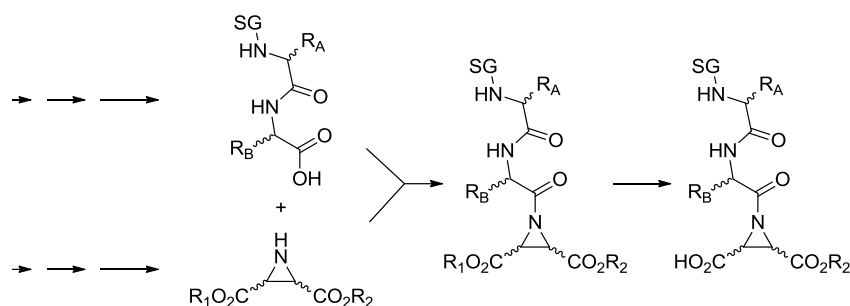
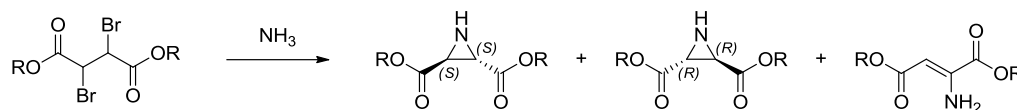


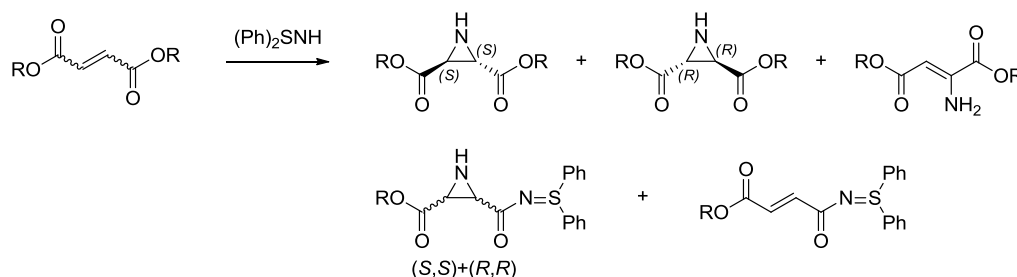
Abb. 3.1.1.1-1: Allgemeine Syntheseroute zur Darstellung eines Aziridinylpeptids des Typs I mit finaler Freisetzung einer Carboxy-Funktion – R_A, R_B = Aminosäure-Reste, R_1 = hydrogenolyse-instabiler Rest, R_2 = hydrogenolyse-stabiler Rest

Eine Möglichkeit, die alle genannten Voraussetzungen erfüllt, ist, einen Benzylester am Aziridin-Ring zu erhalten und diesen im finalen Schritt durch Hydrogenolyse zu entfernen. Die Boc-Schutzgruppe bleibt hierbei erhalten. Entsprechend hergestellte Dicarbonsäuren aus Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylaten des Typs I sind bereits literaturbekannt.⁸⁵ Für den zweiten Ester am Aziridin-Ring muss folglich eine Gruppe gewählt werden, die hydrogenolysestabil ist.

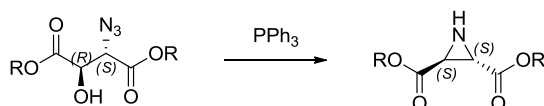
Da Cysteinproteasen die *targets* darstellen, ist ein *trans*-konfigurierter Aziridin-2,3-dicarboxylat-Baustein für die Zielverbindung essenziell. Bisher haben sich nur drei Syntheserouten zum *N*-unsubstituierten *trans*-Baustein als sinnvoll erwiesen, die nicht ein *cis*- und *trans*-Produktgemisch liefern:

1) Cromwell-Synthese: Cyclokondensation von 2,3-Dibromsuccinaten mit Ammoniak^{106,107}

Hauptprodukt der Reaktion ist hier allerdings das Enamin (50-60 %). Das Aziridin-2,3-dicarboxylat entsteht als Nebenprodukt in unter 15 % Ausbeute.¹⁰¹ Dabei wird, unabhängig von der Konfiguration des durch Eliminierung als Zwischenstufe gebildeten Brombut-2-endionats, und damit unabhängig von der Stereoinformation des 2,3-Dibromsuccinats (nach Cardillo *et al.*¹⁰⁷), das racemische *trans*-Aziridin-2,3-dicarboxylat gebildet.¹⁰⁶

2) Michael-Addition: Reaktion von Diphenylsulfimin mit Fumaraten¹⁰⁸ oder Maleaten⁹²

Auch hier ist das Hauptprodukt der Reaktion das Enamin (40-50 %). Unabhängig von der Fumarat-/Maleat-Ausgangsverbindung entsteht racemisch das *trans*-Aziridin-2,3-dicarboxylat (< 35 %).^{91,92,108} Als weitere Nebenprodukte entstehen Addukte des Diphenylsulfimins.⁹¹

3) Staudinger-Reaktion: Ringschluss als Spezialform der Mukaiyama-Redoxkondensation von Triphenylphosphan mit Azidoalkoholen¹⁰⁹

Das Hauptprodukt ist, abhängig von der Größe der Reste am Ester, das stereoselektiv gebildete *trans*-Aziridin-2,3-dicarboxylat (bis 79 % bei R = Et¹¹⁰, bis 38 % bei R = Bn¹¹¹).

Alle Syntheserouten teilen somit das Butandisäure-Gerüst in unterschiedlicher Substitution bzw. Sättigung. Um die gewünschten gemischten Diester zu erhalten, muss in der gewählten Syntheseroute entweder einmal umgeestert, oder von einem Halbestere ausgegangen werden. Im Gegensatz zu anderen symmetrischen Dibenzyl-veresterten, gesättigten Verbindungen,^{z.B.112,113} ist eine einseitige Hydrolyse von Dibenzylfumarat nicht literaturbekannt. Kommerziell erhältliche Halbestere sind mono-Methylhydrogensuccinat, mono-Methylfumarat und mono-Ethylfumarat. Bei diesen Ausgangsstoffen der Syntheserouten 1) und 2) müsste also umgeestert werden, wenn andere als Methyl- bzw. Ethylester erhalten werden sollen (Abb. 3.1.1.1-2).

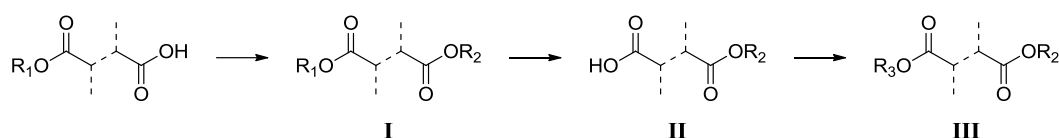


Abb. 3.1.1.1-2: Zusätzliche Stufen zur Umesterung für Syntheserouten 1) und 2) bei kommerziell erhältlichen Halbestern

In Syntheseroute 1) würde im Anschluss an **III** die zweifache α -Bromierung zum 2,3-Dibromsuccinat und darauf der Ringschluss erfolgen. In Syntheseroute 2) würde von **III** direkt der Ringschluss erfolgen. Anders sieht es bei der stereoselektiven Syntheseroute 3) aus. Wie in Abb. 3.1.1.1-3 gezeigt, geht diese Syntheseroute von einer Weinsäure aus, die zum Tartrat **IV** verestert wird, um anschließend über eine Thiooxolan-Zwischenstufe **V** zum Azidoalkohol **VI** umgesetzt zu werden. Der Azidoalkohol **VI** ist danach Edukt für die Darstellung des Aziridin-2,3-dicarboxylats. Für Route 3) sind nur symmetrische Edukte (bzgl. Säure oder Ester der Weinsäuren) kommerziell erhältlich und die meisten zur Darstellung des *trans*-Aziridin-2,3-dicarboxylats benötigten Vorstufen (Weinsäure, Tartrat, Azidoalkohol) besitzen reaktive Gruppen, die bei einer Umesterung Nebenreaktionen verursachen können.

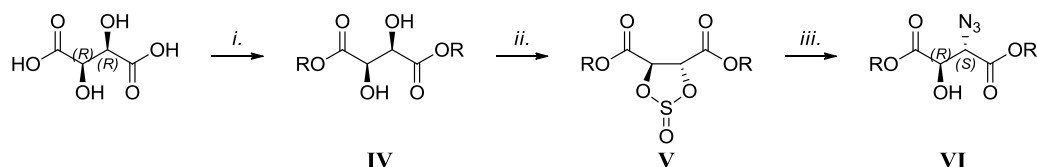


Abb. 3.1.1.1-3: Stereoselektive Synthese des Azidoalkohols am Beispiel der L-(+)-Weinsäure nach Breuning *et al.*¹¹¹ – *i.* 2.5 Äq. Alkohol, *p*-TosOH_{kat}, Benzol, 24 h reflux; *ii.* 1.1 Äq. SOCl₂, DMF_{kat}, DCM, 1 h 0 °C, 2 h RT, 1 h reflux; *iii.* 2.0 Äq. NaN₃, DMF_{abs}, 72 h RT

Daher sind für eine Umesterung, mit Ausnahme der cyclischen Thiooxolan-Stufe, zusätzlich zwei weitere Synthesestufen für die Einführung einer Schutzgruppe der C2- und/oder C3-Substituenten und deren Abspaltung nach Umesterung nötig.

Syntheseroute 3) beinhaltet für die Darstellung eines gemischten Esters die gleichen grundsätzlichen Probleme wie auch Syntheserouten 1) und 2). Da für die eingangs beschriebene gewünschte freie Carboxy-Funktion ein Benzylester benötigt wird, ist es nur sinnvoll, zuerst beidseitig zum Dibenzylester **VII** zu verestern, um dann einseitig zu verseifen (Abb. 3.1.1.1-4).

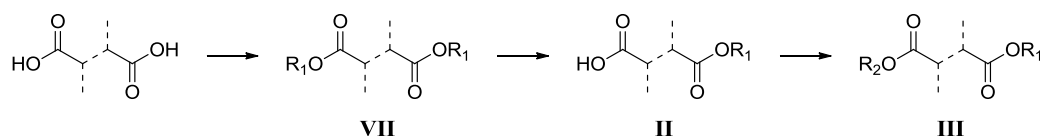


Abb. 3.1.1.1-4: Symmetrische Veresterung mit anschließender einseitiger Hydrolyse und Darstellung eines unsymmetrischen Diesters

Die einzig bekannte einseitige Umesterung zu einem unsymmetrischen Diester wurde auf Stufe des Aziridin-2,3-dicarboxylats durchgeführt (Abb. 3.1.1.1-5).¹¹¹ Die Darstellung bis zum *N*-geschützten Aziridin-2,3-dicarboxylat mit gemischten Estern wird allerdings bereits als sehr verlustreich beschrieben.¹¹¹ Auf diese müsste dann noch die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe folgen, die jedoch durch die bereits angesprochene Instabilität *N*-unsubstituierter wie *N*-substituierter Aziridin-2,3-dicarboxylate erschwert wird.

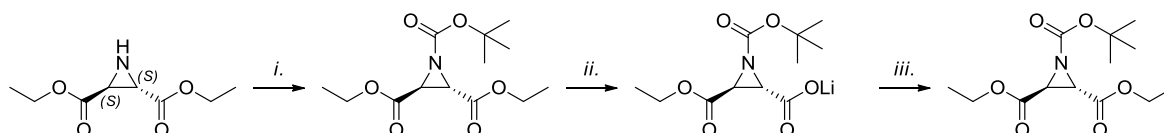


Abb. 3.1.1.1-5: Darstellung eines Aziridin-2,3-dicarboxylats mit gemischten Estern nach Breuning *et al.*¹¹¹ – *i.* 3.0 Äq. (Boc)₂O, 1.0 Äq. DMAP, DCM_{abs}, 2 h 0 °C, 48 h RT; **31 %**; *ii.* 0.95 Äq. LiOH·H₂O, EtOH_{abs}, 1 h 0 °C, 72 h RT; *iii.* 2.0 Äq. Allyliodid, 2.0 Äq. AgNO₃, ACN_{abs}, 12-Krone-4, 48 h RT **44 %**

Weitere Umesterungen innerhalb der Syntheseroute 3) schlugen bereits fehl (auf Stufe des Thiooxolans¹¹⁴), oder sind aufgrund des frühen Einführens des unsymmetrischen, gemischten Diesters (auf Stufe des Tartrats) für die Darstellung vieler verschiedener Zielverbindungen nicht praktikabel und daher auszuschließen. Es verbleibt die Möglichkeit der Umesterung auf der bereits von Haus aus unsymmetrischen Azidoalkohol-Stufe **VI** (Variante 3a).

Zusammenfassend stellen sich die verbleibenden Optionen wie folgt dar:

- Die Variante der Umesterung der Fumarate (Varianten 2a und 2b, siehe Tab. 3.1.1.1-6) ist aufgrund der höheren Ausbeuten an Aziridin und geringeren Anzahl an Stufen im weiteren Reaktionsverlauf der Umesterung auf der Stufe der 2,3-Dibromsuccinate eindeutig vorzuziehen. Hier werden die Aziridin-2,3-dicarboxylate racemisch dargestellt.

- Auf der stereoselektiven Syntheseroute besteht noch die Möglichkeit, von den Azidoalkoholen zu den unsymmetrischen Aziridin-2,3-dicarboxylaten zu gelangen.

Die drei Varianten werden in Tab. 3.1.1.1-6 in ihrem synthetischen Aufwand einander gegenübergestellt: Variante 2a ausgehend von den bereits unsymmetrischen kommerziell erhältlichen Monoester-Fumaraten, Variante 2b der einseitigen Hydrolyse symmetrischer Fumarsäurediester und Variante 3a der Umesterung auf Azidoalkohol-Stufe incl. zweier Schutzgruppen-Stufen.

Tab. 3.1.1.1-6: Vergleich der verbleibenden drei Varianten zur Synthese unsymmetrischer Aziridin-2,3-dicarboxylate in Bezug auf Anzahl der Synthesestufen, verwendete Chemikalien, Ausbeute zum Aziridin, geschätzten synthetischen Aufwand und Stereoselektivität der Aziridin-2,3-dicarboxylat-Synthese

	Variante 2a	Variante 2b	Variante 3a***
	Anzahl Stufen (X) - Y. Stufe innerhalb der Syntheseroute, Produkt, Reagenz		
Ausgangsverbindung	Monoester-Fumarat	Fumarsäure	Weinsäure
Synthese des Aziridins	(2) 3. Fumarat, DCC* 4. Aziridin, DPSI	(2) 3. Fumarat, DCC* 4. Aziridin, DPSI	(4) 1. Tartrat, <i>p</i> -TosOH** 2. Thiooxolan, SOCl ₂ 3. Azidoalkohol, NaN ₃ 8. Aziridin, PPh ₃
Umesterung eines Ester-Rests	(2) 1. Fumarat, DCC* 2. Monoester-Fumarat, LiOH	(2) 1. Fumarat, <i>p</i> -TosOH** 2. Monoester-Fumarat, LiOH	(2) 5. Monoester, LiOH 6. Diester, DCC*
Schutzgruppenchemie	Nein	Nein	(2) 4. SG einführen 7. SG entfernen
notwendige SC-Aufreinigung auf Stufen	1. 3. und 4.	3. und 4.	3. 4. 6. und 8.
Ausbeuten des Ringschluss (für Dibenzylverbindungen)	bis 35% ⁹¹	bis 35% ⁹¹	bis 38% ¹¹¹
Stereoselektivität der Aziridine-Synthese	racemisch	racemisch	stereoselektiv

* = auch aufgrund möglicher Umesterung zu symmetrischen Fumaraten ist eine SC voraussichtl. nötig

** = säurekatalysierte bekannte quantitative Veresterung, keine SC nötig

*** = Syntheseroute kann (ohne Umesterung) bis zur Darstellung des Aziridin-2,3-dicarboxylats ohne SC durchgeführt werden

Alle drei Varianten haben ihre Vor- und Nachteile. Variante 2a wurde bereits im Arbeitskreis durchgeführt.¹¹⁵ Vom synthetischen Aufwand ist Variante 2b den anderen beiden Varianten überlegen. Bei erfolgreicher Hydrolyse ist die Darstellung der Ausgangsverbindung (für Variante 2b: 4-Benzyloxy-4-oxo-(2*E*)-but-2-ensäure) für die Derivatisierung schneller und mit geringerem Aufwand möglich. Deswegen sollten zu Beginn dieser Arbeit zunächst Umesterungsversuche von Dibenzylfumarat (Dibenzyl-(2*E*)-but-2-endoat) durchgeführt werden.

3.1.1.2 Versuche der Synthese von unsymmetrischen But-2-endioaten

Einseitige Verseifung zur 4-Benzyloxy-4-oxo-(2E)-but-2-ensäure mit anschließender Veresterung

Wie bereits in Kap. 3.1.1.1 beschrieben, sollten unsymmetrische Fumarsäurediester über die in Abb. 3.1.1.2-1 dargestellte Syntheseroute hergestellt und mit *S,S*-Diphenylsulfimin zum entsprechenden *trans*-Aziridin-2,3-dicarboxylat umgesetzt werden.

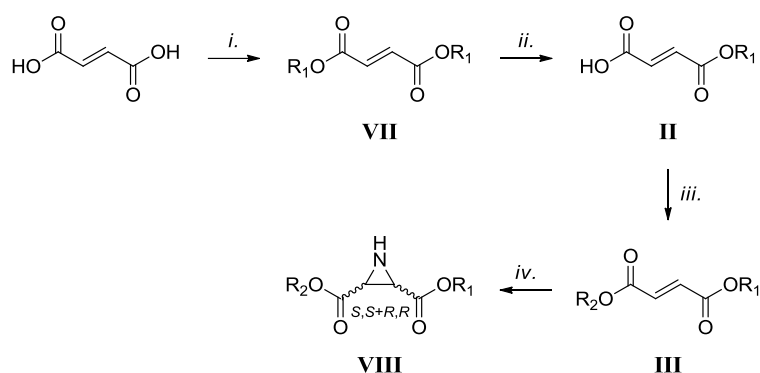


Abb. 3.1.1.2-1: Geplante Syntheseroute zur Darstellung von Aziridin-2,3-dicarboxylaten mit gemischten Estern

R_1 = Benzyl; R_2 = hydrogenolyse-stabiler Rest

i. BnOH, *p*-TosOH*H₂O_{kat}, Toluol, 24 h reflux; *ii.* LiOH; *iii.* ROH, DCC, DMAP, DCM, 1 h 0 °C, 16 h RT; *iv.* DPSI, Toluol, 24 h 80 °C

Die Darstellung von Dibenzyl-(2*E*)-but-2-endioat (**VII**) erfolgte säurekatalysiert durch die Veresterung von Fumarsäure mit Benzylalkohol in 99%iger Ausbeute. Aufbauend auf früheren Erfahrungen¹¹⁵ im Arbeitskreis wurden Versuche der einseitigen Verseifung mit LiOH-Lsg. in THF durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.1.1.2-2 zusammengefasst. Dibenzylfumarat **VII**, gelöst in THF, wurde jeweils bei 0 °C mit zuvor in THF vollständig gelöstem LiOH*H₂O versetzt und 1 h bei 0 °C und X d bei RT gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte nach DC-Kontrolle der Produkte durch Extraktion mit DCM nach Einstellen auf pH = 1 mit HCl. Die Ausbeuten sind nach Trocknung und Entfernung des Lösemittels angegeben.

Tab. 3.1.1.2-2: Zusammenfassung der weiteren Hydrolyseversuche von Dibenzyl-(2*E*)-but-2-endioat (**VII**) zur 4-Benzyloxy-4-oxo-(2*E*)-but-2-ensäure (**II**) mit LiOH – R₁ = Bn

	#	Lsm.	Zeit X [d]	Ausbeute [%]
<p style="text-align: center;"> <chem>R1O-C(=O)-CH=CH-C(=O)-OR1</chem> VII $\xrightarrow[0\text{ }^\circ\text{C, 1 h}]{1.0\text{ } \ddot{\text{A}}\text{q. LiOH}}$ <chem>HO-C(=O)-CH=CH-C(=O)-OR1</chem> II </p>	1	THF	1	3
	2	THF	2	9
	3	THF	5	22
	4	THF	7	17

Die Versuche zeigen eine nur sehr langsame Verseifung und ein mögliches Maximum an Ausbeute zwischen zwei und sieben Tagen. Die niedrigen Ausbeuten waren Grund nach einer weiteren Alternative zur Darstellung der 4-Benzyloxy-4-oxo-but-2-ensäure als Edukt für die Darstellung unsymmetrischer But-2-endioate zu suchen.

4-Benzyloxy-4-oxo-(2*Z*)-but-2-ensäure als Edukt für But-2-endioate mit gemischten Estern

Eine Möglichkeit, eine 4-Benzyloxy-4-oxo-but-2-ensäure herzustellen, ist die Reaktion von Benzylalkohol mit Maleinsäureanhydrid (**IX**) zur 4-Benzyloxy-4-oxo-(2*Z*)-but-2-ensäure (**X**) (Abb. 3.1.1.2-3). Die Darstellung von 4-Benzyloxy-4-oxo-(2*Z*)-but-2-ensäure erfolgte in 99%iger Ausbeute. Im Gegensatz zur Syntheseroute der einseitigen Verseifung wird hier ein Halbester quantitativ bereits in einem Schritt gewonnen.

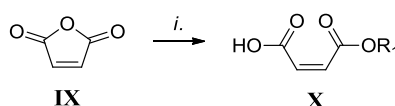


Abb. 3.1.1.2-3: Darstellung von 4-Benzyloxy-4-oxo-(2*Z*)-but-2-ensäure aus Maleinsäureanhydrid

R₁ = Benzyl – *i.* 1.0 Äq. BnOH, 1.1 Äq. NEt₃, 1 h RT

Ausgehend von 4-Benzyloxy-4-oxo-(2*Z*)-but-2-ensäure **X** eröffnet sich wie in Abb. 3.1.1.2-4 gezeigt die neu geplante Syntheseroute B. Sie zeigt im Vergleich zur vorigen Syntheseroute einen noch kürzeren Weg zu Aziridin-2,3-dicarboxylaten mit gemischten Estern.

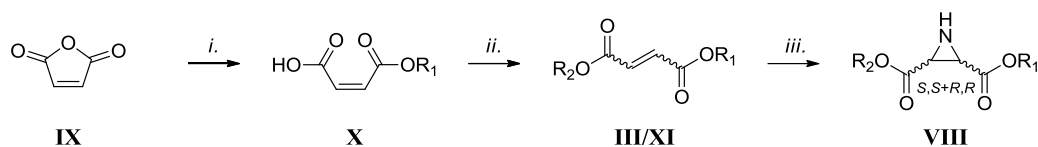


Abb. 3.1.1.2-4: Geplante Syntheseroute zur Darstellung von Aziridin-2,3-dicarboxylaten mit gemischten Estern – R_1 = Benzyl; R_2 = hydrogenolyse-stabiler Rest – *i.* 1.0 Äq. BnOH, 1.1 Äq. NEt_3 , 1 h RT; *ii.* 1.0 Äq. ROH, 1.1 Äq. DCC, 0.4 Äq. DMAP, 1 h 0 °C, 3 h RT; *iii.* DPSI, Toluol, 24 h 80 °C

Die Verbindungen **X** sind, analog zur Maleinsäure, sehr stabil in ihrer (*Z*)-Konfiguration, da für die *cis-trans*-Isomerisierung der Doppelbindung, analog zur Isomerisierung der Maleinsäure, eine relativ hohe Energie benötigt wird (~260 kJ/mol für Maleinsäure). Dafür ist Licht im ultravioletten Bereich nötig. Eine, theoretische ebenfalls mögliche, Isomerisierung durch Energiezufuhr durch Erhitzen führt zu Maleinsäureanhydrid.¹¹⁶ Anders sieht es bei den Diestern aus. Hier wurde in Abb. 3.1.1.2-4 bereits **III/XI** als Bezeichnung gewählt, um zu verdeutlichen, dass sich Maleinsäurediester bekanntermaßen leicht in die thermodynamisch stabileren Fumarsäurediester umlagern.^{117–121} Bei der Steglich-Veresterung *ii.* mit Alkohol und Base (siehe auch Kap. 3.1.1.3) liegen für die Isomerisierung gerade passende Bedingungen vor.

3.1.1.3 Synthese von unsymmetrischen But-2-endionaten

Wie bereits in Kap. 3.1.1.2, Abb. 3.1.1.2-4 gezeigt, sollte eine Derivatisierung ausgehend von (*2Z*)-4-Benzylester-but-2-ensäure (**X**) erfolgen. Hierzu sollten unsymmetrische But-2-endioate mittels Steglich-Veresterung dargestellt werden. Mechanistisch verläuft die Veresterung von Säuren durch DCC und DMAP wie folgt ab (Abb. 3.1.1.3-1): Initial erfolgt die Aktivierung der Carbonsäure (**1**) mittels DCC zum Intermediat *O*-Acylisoharnstoff (**2**), welcher in seiner Reaktivität mit einem Säurechlorid vergleichbar ist. Das Intermediat **2** reagiert unter Katalyse von DMAP über das *N*-Acylpyridiniumion sehr schnell zum Säureanhydrid **3**. Das Anhydrid **3** wird unter erneuter Katalyse mit DMAP vom eingesetzten Alkohol nucleophil angegriffen und so der entsprechende Ester **4** ausgebildet. Eine direkte Reaktion des *O*-Acylisoharnstoffs, bzw. *N*-Acylpyridiniumions mit dem Alkohol ist ebenfalls möglich, aber von der Reaktionsgeschwindigkeit deutlich benachteiligt.^{122,123}

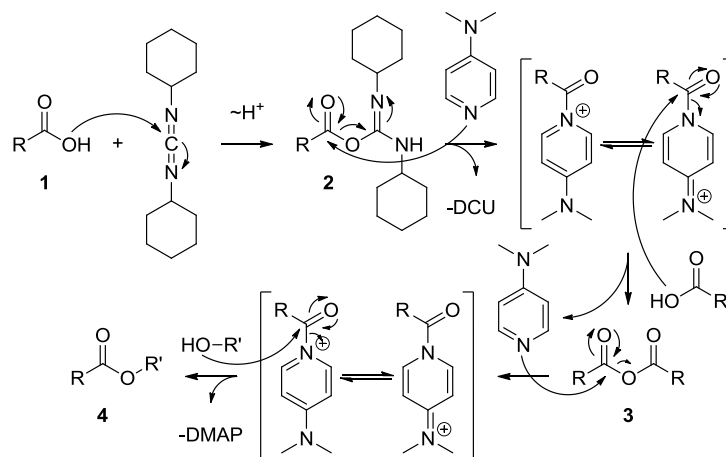


Abb. 3.1.1.3-1: Mechanismus der Steglich-Veresterung: DMAP katalysierte Veresterung von Säuren mittels DCC – als Nebenprodukt entsteht *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff (DCU)

DMAP fungiert in der Reaktion somit als Acyltransferreagenz. Als Nebenprodukt entsteht *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff, der aus der Reaktion in DCM ausfällt.¹²² Neben den beschriebenen deutlich schnellen Reaktionspfaden findet außerdem auch ein langsamer [1,3]-Acylshift statt, der zum entsprechenden unreaktiven Acylisoharnstoff führt (Abb. 3.1.1.3-2).¹²⁴

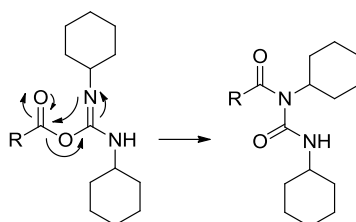


Abb. 3.1.1.3-2: [1,3]-Acylshift als Nebenreaktion des *O*-Acylisoharnstoff

Eine erste Testreaktion (Abb. 3.1.1.3-3) zeigte bei der Reaktionskontrolle mittels ¹H-NMR-Spektroskopie (Abb. 3.1.1.3-4), wie in Kap. 3.1.1.2 bereits thematisiert, neben den typischen Peaks des Edukts **X** auch entsprechende Peaks der beiden möglichen *cis/trans*-isomeren Produkte **III** und **XI**.

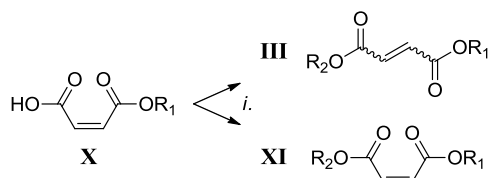


Abb. 3.1.1.3-3: Steglich-Testreaktion zur Synthese der *cis/trans*-isomeren Produkte **III** und **XI** – R_1 = Benzyl; R_2 = Cyclohexylmethyl – *i.* 1.0 Äq. ROH, 1.1 Äq. DCC, 0.4 Äq. DMAP, 1 h 0 °C, 3 h RT, ¹H-NMR-Reaktionskontrolle

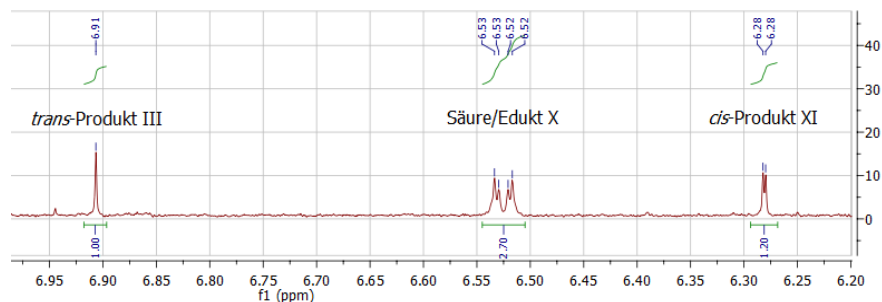


Abb. 3.1.1.3-4: ^1H -NMR-Reaktionskontrolle der Synthese der *cis/trans*-isomeren Produkte **III** und **XI**, Ausschnitt der $\text{CH}=\text{CH}$ -Gruppen: *trans*-Produkt **III**, links, ~ 6.91 ppm, *cis*-Edukt, mittig, ~ 6.55 ppm, *cis*-Produkt **XI**, rechts, 6.26 ppm

Nach vollständiger Umsetzung der Edukte (16 h, DC-Kontrolle) konnten 16 % *trans*- und 21 % *cis*-Produkt isoliert werden. Möglich macht dies der Einsatz des Steglich-Katalysators DMAP, der entscheidend für die effiziente Bildung von Estern ist. Analog Roush *et al.* wird hier eine reversible Michael-Addition des Acylierungs-Katalysators DMAP an das *cis*-Produkt vermutet, welches durch Rotation um die ehemalige Doppelbindungsachse in das thermodynamisch günstigere *trans*-Produkt übergeht (Abb. 3.1.1.3-5).¹²⁵ Dabei ist nach Christensen *et al.* neben DMAP auch eine Protonenquelle für die Isomerisierung nötig.¹²⁶

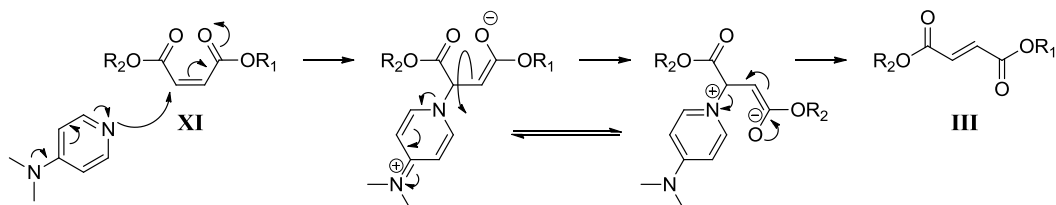
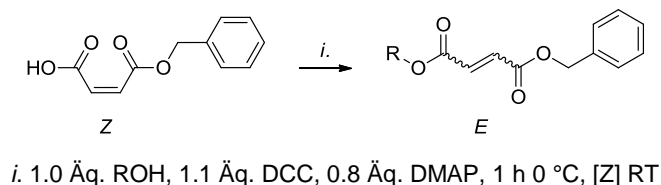


Abb. 3.1.1.3-5: Mögliche DMAP-katalysierte Isomerisierung von Maleaten zu Fumaraten

Dieser Umstand ließ sich nun insofern ausnutzen, dass bei höherer Konzentration an DMAP und verlängerter Reaktionszeit über die vollständige Umsetzung der Edukte (DC-Kontrolle) hinaus nur die *trans*-Produkte erhalten wurden. Tabelle 3.1.1.3-6 fasst die dargestellten unsymmetrischen Fumarate und weitere Reaktionsdetails zusammen.

Tab. 3.1.1.3-6: Synthetisierte unsymmetrische Fumarate mit Reaktionsdauer [Z], Ausbeuten, R_f -Werten und $^1\text{H-NMR}$ Verschiebungen der Protonen der jeweiligen Doppelbindung nach der Steglich-Veresterung



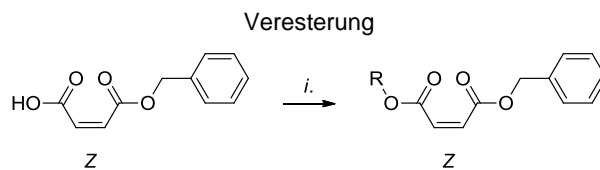
R =	Rkt-Dauer [Z]	Ausbeute [%]	R_f [Lsm]	$^1\text{H-NMR}$ CH=CH [ppm]
Naphthalin	48 h	25	0.30 DCM1:1Pe	7.13 s
Phenyl	48 h	38	0.74 DCM	7.08 s
Furan-2-ylmethyl	72 h	35	0.81 DCM	6.92, 6.89 je d
2-Phenylethyl	14 d	39	0.44 Pe9:1EA	6.90, 6.84 je d
3-Phenylpropyl	14 d	52	0.75 DCM	6.91, 6.86 je d
Cyclohexylmethyl	14 d	55	0.56 Pe4:1EA	6.90 s
dito*	5 d	27	dito	dito
<i>tert</i> -Butyl	21 d	54	0.75 DCM	6.80 s
Benzylamid**	21 d	29	0.79 Pe2:1EA	6.94, 6.89 je d

* aus (2*E*)-4-Benzoyloxy-4-oxo-but-2-ensäure (Kap. 3.1.1.2) als Vergleichssubstanz mit 0.1 Äq. DMAP hergestellt

** aus 4-Benzylamino-4-oxo-(2*Z*)-but-2-ensäure (analog dem Mono-Ester aus Kap. 3.1.1.2 Abb. 3.1.1.2-3) als Edukt hergestellt

Wurden die Äquivalente an DMAP reduziert, die Reaktionen dauerhaft gekühlt und die Reaktionszeiten kurz gehalten, konnten entsprechende *cis*-Produkte erhalten werden. Optimierungsversuche, in denen DMAP als nucleophile Base durch die Hünig-Base (Diisopropylethylamin) als nicht-nucleophile Base ausgetauscht wurde, führten nicht zu *cis*-Produkten. Tabelle 3.1.1.3-7 fasst die dargestellten unsymmetrischen Maleate und weitere Reaktionsdetails zusammen.

Tab. 3.1.1.3-7: Synthetisierte unsymmetrische Maleate mit Reaktionsdauer [Y]/[Z], Ausbeuten, R_f-Werten in Laufmitteln und ¹H-NMR Verschiebungen der Protonen der jeweiligen Doppelbindung nach der Steglich-



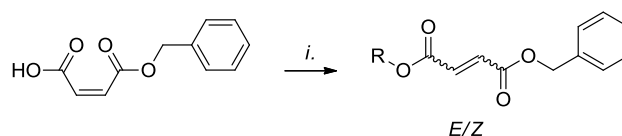
i. 1.0 Äq. ROH, 1.1 Äq. DCC, 0.1 Äq. DMAP, [Y] 0 °C, [Z] ges. Rkt-Dauer

R =	E/Z- Isomer	0 °C [Y]	Rkt-Dauer [Z]	Aus- beute [%]	R _f [Lsm]	¹ H-NMR CH=CH [ppm]
Ethyl	<i>cis</i>	16 h	16 h	42	0.47 Pe4:1EA	6.26 s
Naphthalin-2-ylmethyl	<i>cis</i>	22 h	22 h	52	0.35 Pe4:1EA	6.32 s
Pyridin-4-ylmethyl	<i>trans</i> *	24 h	24 h	27	0.51 DCM9:1MeOH	6.96 s
Cyclohexylmethyl	<i>cis</i>	30 h	30 h	31	0.90 Pe2:1EA	6.27 s
Benzyl	<i>cis</i>	48 h	48 h	36	0.71 Pe2:1EA	6.29 s
2-Phenylethyl	<i>cis</i>	48 h	48 h	50	0.37 Pe4:1EA	6.18, 6.14 je d

* trotz *cis*-Methode *trans*-Produkt – wahrscheinlich Isomerisierung durch 4-Pyridinmethanol analog zu DMAP

Tabelle 3.1.1.3-8 zeigt die Gesamtübersicht für den Vergleich aller dargestellten unsymmetrischen (2*Z*)+(2*E*)-But-2-endioate.

Tab. 3.1.1.3-8: Synthetisierte unsymmetrische Fumarate und Maleate mit Äquivalenten DMAP [X], Reaktionsdauer [Y]/[Z], Ausbeuten, R_f-Werten in Laufmitteln und ¹H-NMR Verschiebungen der Protonen der jeweiligen Doppelbindung nach der Steglich-Veresterung



i. 1.0 Äq. ROH, 1.1 Äq. DCC, [X] Äq. DMAP, [Y] 0 °C, [Z] ges. Rkt-Dauer

R =	E/Z-Isomer	Äq. DMAP [X]	0 °C [Y] h	Rkt-Dauer [Z]	Ausbeute [%]	R _f [Lsm]	¹ H-NMR CH=CH [ppm]
Ethyl	<i>trans</i> *	0.8	1	18 h	71	0.70 Pe4:1EA	6.89 s
dito	<i>cis</i>	0.1	16	16 h	42	0.47 Pe4:1EA	6.26 s
<i>tert</i> -Butyl	<i>trans</i>	0.8	1	19 d	54	0.75 DCM	6.80 s
Cyclohexylmethyl	<i>trans</i>	0.8	1	14 d	55	0.56 Pe4:1EA	6.90 s
dito	<i>cis</i>	0.1	30	30 h	31	0.90 Pe2:1EA	6.27 s
Phenyl	<i>trans</i>	0.8	1	48 h	38	0.74 DCM	7.08 s
Benzyl	<i>cis</i>	0.1	48	48 h	36	0.71 Pe2:1EA	6.29 s
Naphthalin-2-yl	<i>trans</i>	0.8	1	72 h	25	0.30 DCM1:1Pe	7.13 s
Naphthalin-2-ylmethyl	<i>cis</i>	0.1	22	22 h	52	0.35 Pe4:1EA	6.32 s
2-Phenylethyl	<i>trans</i>	0.8	1	14 d	39	0.44 Pe9:1EA	6.90, 6.84 je d
dito	<i>cis</i>	0.1	48	48 h	50	0.37 Pe4:1EA	6.18, 6.14 je d
3-Phenylpropyl	<i>trans</i>	0.8	1	14 d	52	0.75 DCM	6.91, 6.86 je d
Furan-2-ylmethyl	<i>trans</i>	0.8	1	72 h	35	0.81 DCM	6.92, 6.89 je d
Pyridin-4-ylmethyl	<i>trans</i> **	0.1	24	24 h	27	0.51 DCM9:1MeOH	6.96 s
Benzylamid	<i>trans</i> ***	0.8	1	7 d	29	0.79 Pe2:1EA	6.94, 6.89 je d

* aus kommerziell erhältlichem Monoethylfumarat hergestellt

** trotz *cis*-Methode *trans*-Produkt – mglw. Isomerisierung durch 4-Pyridinmethanol analog zu DMAP

*** aus 4-Benzylamino-4-oxo-(2*Z*)-but-2-ensäure (analog dem Mono-Ester aus Kap. 3.1.1.2 Abb. 3.1.1.2-3) als Edukt hergestellt

In den NMR-Spektren der dargestellten But-2-endoate lässt sich zum einen erkennen, dass für (*E*)-But-2-endoate die Protonen der Doppelbindung bei ~6.9 ppm zu finden sind, wenn nicht das π -System erweitert ist (für Phenyl 7.08 ppm, für Naphthalin 7.13 ppm). Für die (*2Z*)-But-2-endoate hingegen sind die Protonen hochfeldverschoben zu niedrigeren ppm-Werten und liegen bei ~6.3 ppm. Außerdem sind erwartete vicinale Kopplungen unabhängig von der (*E*)-/(*Z*)-Isomerisierung nicht zwingend zu finden. Dies ist erst bei größerer Kettenlänge oder Heteroaromaten der Fall. Weiterhin zeigen die *trans*-Verbindungen im Vergleich zu den *cis*-Verbindungen einen größeren R_f -Wert.

Über diese Syntheseroute wurden unterschiedlichste unsymmetrische But-2-endoate hergestellt, die dann zu unsymmetrischen racemischen *trans*-Aziridin-2,3-dicarboxylaten umgesetzt werden sollten (Abb. 3.1.1.3-9). Im Hinblick auf die abschließende Hydrogenolyse des Benzylesters nach *N*-Acylierung des Aziridin-2,3-dicarboxylats wurden bereits Reste gewählt, die:

- die Größe und die Eigenschaften des Benzylesters imitieren (z.B. Cyclohexylmethyl als gesättigtes oder Benzylamid als *N*-Analogon)
- als gesättigter Rest weniger Raum einnehmen und als *prodrug* fungieren können (Ethyl oder sperriger sind (*tert*-Butyl))
- die eine andere Kettenlänge aufweisen (Phenyl, 2-Phenylethyl, 3-Phenylpropyl)
- als aromatischer Rest mehr Raum einnehmen (Naphthalin-2-yl) oder
- eine orthogonale Schutzgruppe darstellen (Naphthalin-2-ylmethyl¹²⁷ und Pyridin-4-ylmethyl¹²⁸) und bei denen, im Gegensatz zu den zuvor genannten Estern, der Benzylester als zweite Estergruppe erhalten bleibt.

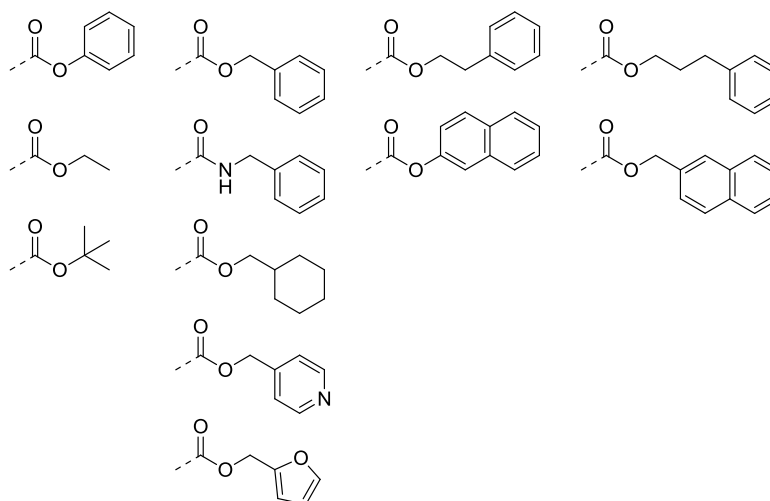


Abb. 3.1.1.3-9: Übersicht der Ester für die unsymmetrischen But-2-endoate

3.1.1.4 Synthese von symmetrischen (2*E*)-But-2-endionaten

Wie in Kap. 3.1.1.1 bereits erwähnt, stellt die Synthese von symmetrischen Diestern keine Herausforderung dar. Nach Syntheseroute 2) (Kap. 3.1.1.1) muss nur ein anderes Fumarat eingesetzt werden. Die Synthese der symmetrischen (2*E*)-But-2-endionate erfolgte säurekatalysiert, wie in Abb. 3.1.1.4-1 dargestellt.

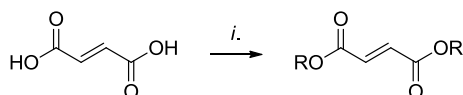


Abb. 3.1.1.4-1: Säurekatalysierte Darstellung symmetrischer (2*E*)-But-2-endionate –
i. 2.5 Äq. Alkohol, *p*-TosOH_{kat}, Benzol, 24 h reflux

Tabelle 3.1.1.4-2 zeigt die Gesamtübersicht der dargestellten symmetrischen (2*E*)-But-2-endionate.

Tab. 3.1.1.4-2: Synthetisierte symmetrische (2*E*)-But-2-endionate mit Ausbeuten, *R_f*-Werten in Laufmitteln und ¹H-NMR-Verschiebungen der Protonen der jeweiligen Doppelbindung

R =	Ausbeute [%]	<i>R_f</i> [Lsm]	¹H-NMR <i>CH=CH</i> [ppm]
Cyclohexylmethyl	99	0.73 DCM	6.85 s
Benzyl	99	0.70 DCM	6.93 s
2-Phenylethyl	96	0.83 DCM	6.81 s
3-Phenylpropyl	99	0.76 DCM	6.76 s
Benzylamid*	15	0.47 EA	6.13 s

* 1.0 Äq. Fumarsäure, 2.5 Äq. Benzylamin, 2.0 Äq. DCC, 0.4 Äq. DMAP, 1 h 0 °C, 72 h RT

Wie auch bei den unsymmetrischen Fumaraten wurde darauf geachtet, Analoga herzustellen, die die Größe und die Eigenschaften des Benzylesters imitieren (Cyclohexylmethyl als gesättigtes und Benzylamid als *N*-Analogon), oder bei denen die Kettenlänge variiert (2-Phenylethyl, 3-Phenylpropyl).

3.1.1.5 Synthese neuer *trans*-konfigurierter Aziridin-2,3-dicarboxylate

Die Synthese der neuen *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylate erfolgte nach der Syntheseroute 3 (Kap. 3.1.1.1) durch die Reaktion der Fumarate/Maleate mit Diphenylsulfimin. Bei dieser Michael-Addition entstehen ausschließlich (*S,S*)+(*R,R*)-Aziridin-2,3-dicarboxylate in Ausbeuten < 35 %.^{91,92,108} Als Hauptprodukt wird aufgrund der thermischen Instabilität des gebildeten Aziridins **B** (Abb. 3.1.1.5-1), aber auch aufgrund der hohen Acidität des α -Protons und des dadurch ausgebildeten Tautomers **T1**, das, im Vergleich zum Aziridin **B**, thermodynamisch stabilere Enamin **A** gebildet. Die gewünschten Produkte **B** werden über das Tautomer **T2a** gebildet.¹²⁹ Da in der Reaktion keine *cis*-Verbindungen **C** der Aziridine durch Michael-Addition von DPSI an Maleate gebildet werden,^{92,129} muss das analog **T2a** gebildete Rotamer **T2b** folglich aufgrund der sterischen Hinderung ohne Ringschlussreaktion irreversibel zum thermodynamisch stabileren Tautomer/Rotamer **T1/T2a** weiter reagieren.

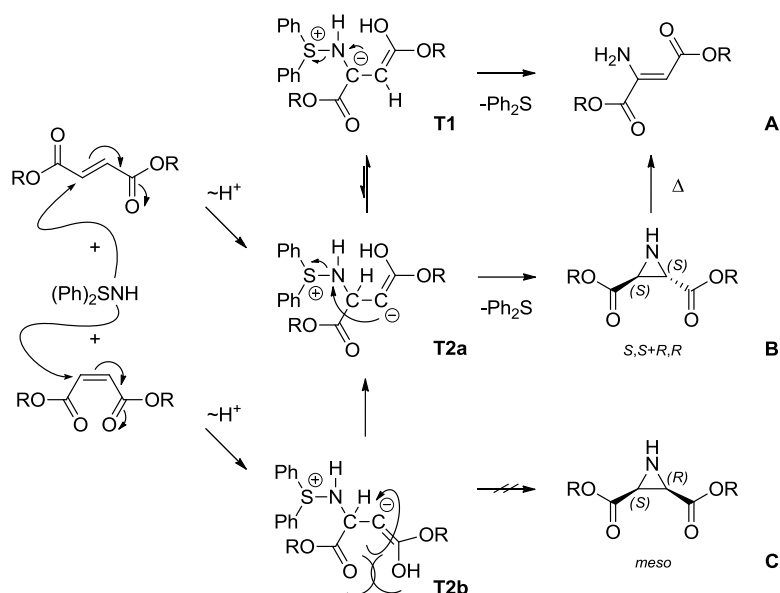


Abb. 3.1.1.5-1: Mechanismus der Michael-Addition von DPSI am Beispiel von symmetrischen Fumaraten/Maleaten mit den Tautomeren T1 und T2 als Vorstufen der gebildeten Produkte A und B

Die Synthese der racemischen *trans*-Aziridin-2,3-dicarboxylate erfolgte durch Michael-Addition mit Diphenylsulfimin wie in Abb. 3.1.1.5-2 dargestellt.

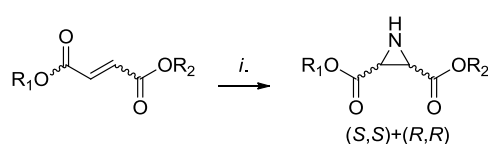


Abb. 3.1.1.5-2: Darstellung von *trans*-Aziridin-2,3-dicarboxylaten durch Michael-Addition von DPSI an Fumarate/Maleate – *i.* 1.2 Äq. DPSI, 3 ml Toluol / mmol DPSI, 24 h 80 °C

Tabelle 3.1.1.5-3 zeigt die Übersicht aller dargestellten unsymmetrischen und symmetrischen *trans*-Aziridin-2,3-dicarboxylate.

Tab. 3.1.1.5-3: Synthetisierte *trans*-Aziridin-2,3-dicarboxylate unter Angabe der Konfiguration des jeweiligen Edukts mit Ausbeuten, R_f-Werten in Laufmitteln und ¹H-NMR Verschiebungen der Protonen am Aziridin-Ring

R ₁	R ₂	(<i>E</i>)-/(<i>Z</i>)-Edukt	Ausbeute [%]	R _f [Lsm]	¹ H-NMR Azi-CH [ppm]
Benzyl	Ethyl	<i>trans</i>	14	0.14 Pe4:1EA	3.02-2.79 m
Benzyl	<i>tert</i> -Butyl	<i>trans</i>	14	0.36 Pe4:1EA	2.85, 2.80 je d
Benzyl	Cyclohexylmethyl	<i>trans</i>	56	0.55 Pe3:1EA	2.90-2.76 m
Benzyl	Phenyl	<i>trans</i>	- *	-	-
Benzyl	2-Phenylethyl	<i>trans</i>	19	0.50 Pe2:1EA	2.91-2.82 m
Benzyl	3-Phenylpropyl	<i>trans</i>	17	0.43 Cy2:1EA	2.79 s
Benzyl	Naphthalin-2-yl	<i>trans</i>	- *	-	-
Benzyl	Naphthalin-2-ylmethyl	<i>cis</i>	10	0.50 Pe2:1EA	2.88 s
Benzyl	Furan-2-ylmethyl	<i>trans</i>	- **	-	-
Benzyl	Pyridin-4-ylmethyl	<i>trans</i>	- *	-	-
Benzyl	Benzylamid	<i>trans</i>	- ***	-	-
Cyclohexylmethyl	Cyclohexylmethyl	<i>trans</i>	18	0.56 Pe4:1EA	2.85 s
Benzyl	Benzyl	<i>trans</i>	68	0.10 Cy4:1EA	2.95 s
2-Phenylethyl	2-Phenylethyl	<i>trans</i>	18	0.29 Pe2:1EA	2.98 s
3-Phenylpropyl	3-Phenylpropyl	<i>trans</i>	9	0.47 Pe2:1EA	2.89 s
Benzylamid	Benzylamid	<i>trans</i>	- ***	-	-

* das ¹H-NMR-Spektrum des Rohproduktes zeigte die typischen Azi-CH Peaks bei ~2.9 ppm, es konnten aber nur Aziridin-DPSI-Addukte isoliert werden

** das Reaktionsgemisch polymerisierte beim Erhitzen

*** das ¹H-NMR-Spektrum des Rohproduktes zeigte keine typischen Azi-CH Peaks bei ~2.9 ppm – Hauptprodukte waren Ninhydrin-aktive Verbindungen mit sehr niedrigen R_f-Werten im Vergleich zu ihren Edukten

Wie der Tabelle 3.1.1.5-3 zu entnehmen ist, konnten über die Michael-Addition mit DPSI nicht aus allen But-2-endoaten die entsprechenden racemischen *trans*-Aziridin-2,3-dicarboxylate hergestellt werden. Die erzielten Ausbeuten der erfolgreichen Umsetzungen liegen bis auf zwei positive Ausnahmen im erwarteten Bereich von unter 35 %. Als einziger, leichter Trend lassen sich schlechtere Ausbeuten bei größeren bzw. kettenverlängerten Resten (Cyclohexylmethyl/Benzyl → 2-Phenylethyl → 3-Phenylpropyl → Naphthalin-2-ylmethyl) finden. Die Derivate mit Phenyl- und Naphthalin-2-yl-Rest gehen bei der Reaktion mit DPSI,

offensichtlich aufgrund ihrer besseren Abgangsgruppen-Eigenschaften, deutlich eher die Substitution des Esters, als die konkurrierende Michael-Addition ein. Bei den Derivaten mit Benzylamid-Struktur können nur die anderen elektronischen Gegebenheiten die Unterschiede der Reaktion im Vergleich mit den Estern erklären.

Von allen fehlgeschlagenen Versuchen ist das Derivat mit 4-Benzoyloxy-4-oxo-*N*-Benzyl-(2*E*)-but-2-enamid als Edukt das mit Abstand Interessanteste. Hier ist es möglich, nach der finalen Hydrogenolyse, neben dem freigesetzten Carboxylat mit dem Benzylamid, eine *N*-analoge Gruppe des ursprünglichen Benzylesters zu erhalten. Daher sollte für die Darstellung des racemischen *trans*-Aziridin-2,3-dicarboxylats die Syntheseroute 1) der 2,3-Dibromsuccinate (siehe Kap. 3.1.1.1) als Alternative für die gescheiterte Syntheseroute 2) der Fumarate durchgeführt werden. Der erste Schritt, die Bromierung der Doppelbindung, erfolgte in 81%iger Ausbeute (Abb. 3.1.1.5-4).

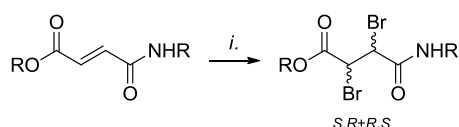


Abb. 3.1.1.5-4: Darstellung von (2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-1-Benzylamid-4-benzylester-2,3-dibrombutan – R = Benzyl
i. 1.1 Äq. Brom, DCM, 16 h RT

Ausgehend vom so hergestellten (2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-1-Benzylamid-4-benzylester-2,3-dibrombutan, sollte nun der racemische *trans*-3-Benzylcarbamoyl-aziridin-2-carboxybenzylester mittels Cromwell-Synthese hergestellt werden. Dies erschien deswegen möglich, da für Dieserter bekannt ist, dass, unabhängig von der Konfiguration der durch Eliminierung als Zwischenstufe gebildeten 2-Bromobut-2-endoate, und damit unabhängig von der Konfiguration der 2,3-Dibromsuccinat-Edukte, ausschließlich das racemische *trans*-Aziridin-2,3-dicarboxylat gebildet wird (Abb. 3.1.1.5-5).^{106,107} Bei der Reaktion der 2,3-Dibromsuccinate mit Ammoniak (bzw. aus Triethylamin:Ammoniumchlorid 3:1 *in situ* generiertem Ammoniak) werden zuerst durch Eliminierung die entsprechenden 2-Bromomaleate (aus den Fumaraten) bzw. 2-Bromofumarate (aus den Maleaten) gebildet. Durch den Angriff von Ammoniak an die Doppelbindung werden anschließend die entsprechenden Rotamere **R1** bzw. **R2** der Enolat-Zwischenstufe gebildet. Wie beim bereits beschriebenen Mechanismus der Michael-Addition mit DPSI, ist auch bei der 1,4-Addition von Ammoniak ein gebildetes Rotamer (**R1**) sterisch so ungünstig, dass die Reaktion über das günstigere Rotamer (**R2**) zum racemischen *trans*-Produkt und dem entsprechenden *trans*-Enamin abläuft.¹⁰⁶

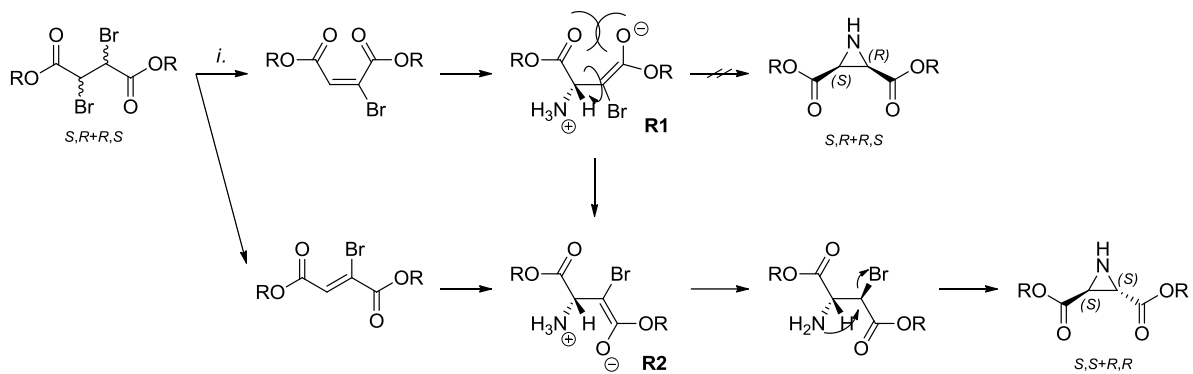


Abb. 3.1.1.5-5: Bekannte Syntheseroute zur Darstellung von *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten aus 2,3-Dibromsuccinaten – *i.* 1.5 Äq. NH_4Cl , 4.5 Äq. NEt_3 , DMSO, 6 h 45 °C

Versuche, (2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-3-Benzylcarbamoyl-aziridin-2-carboxybenzylester über die beschriebene Cromwell-Synthese aus (2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-1-Benzylamid-4-benzylester-2,3-dibrombutan darzustellen (Abb. 3.1.1.5.-6), lieferten keine Hinweise auf gebildetes Produkt.

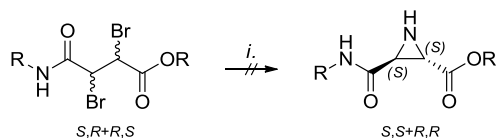


Abb. 3.1.1.5-5: Versuchte Darstellung von (2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-3-Benzylcarbamoyl-aziridin-2-carboxybenzylester aus (2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-1-Benzylamid-4-benzylester-2,3-dibrombutan mittels Cromwell-Synthese, das Produkt wurde nicht erhalten. – *i.* 1.5 Äq. NH_4Cl , 4.5 Äq. NEt_3 , DMSO, 6 h 45 °C

3.1.2 Variation am *N*-Terminus: Erhöhung der Hydrophilie

3.1.2.1 Problemstellung

Laut dem postulierten Dockingmodus von **RV122C**^{85,96,(unveröffentlichte Ergebnisse)} und unveröffentlichten Arbeiten mit **RV134C**, ist, neben einem Benzylester, auch die Boc-Schutzgruppe nicht essenziell für die Bindung an das Enzym. Eine Möglichkeit, die Hydrophilie dieser Inhibitor-Klasse zu erhöhen, bietet daher die Abspaltung der *N*-terminalen Schutzgruppe, bei der eine Verbindung mit freiem Amin entsteht, die im leicht sauren Milieu protoniert vorliegt und damit für eine bessere Wasserlöslichkeit sorgen sollte. Wie für die Freisetzung einer Carboxy-Funktion, deren Einschränkungen in Kap. 3.1.1.1 thematisiert wurden, gibt es auch für eine Freisetzung des *N*-terminalen Amins einige Punkte zu beachten:

- 1) Die Freisetzung der Amin-Funktion kann erst nach der Kupplung mit dem Dipeptid erfolgen. Grund ist die deutlich größere Reaktivität des primären Amins im Vergleich mit dem Stickstoff des Aziridins gegenüber *N*-Acylierungen.
- 2) Analog der Freisetzung der Carboxy-Funktion muss die Freisetzung der Amin-Funktion selektiv und mild erfolgen. Problematisch ist hier wieder die, bereits in Kap. 3.1.1.1 angesprochene, Instabilität des *N*-substituierten Aziridins in wässrig saurem bzw. basischem Milieu, welche einer Hydrolyse einer *N*-terminalen Schutzgruppe entgegensteht.
- 3) Die Abspaltung mit Nucleophilen ist auch hier problematisch. Der Aziridin-Ring muss unversehrt und beide Ester müssen erhalten bleiben.

Erste Versuche zur Freisetzung des *N*-terminalen Amins sollten ausgehend vom diastereomeren Inhibitorgemisch **RV122C/CS09** erfolgen. Denkbar ist hier zum einen die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels TFA in wasserfreiem DCM_{abs}, wobei das Produkt als TFA-Salz entstehen würde. Daneben ist die Abspaltung durch *in situ* generiertes HCl aus TMS-Cl/Phenol in wasserfreiem DCM_{abs} eine mögliche Alternative. Das Produkt entstünde als HCl-Salz (Abb. 3.1.2.1-1).

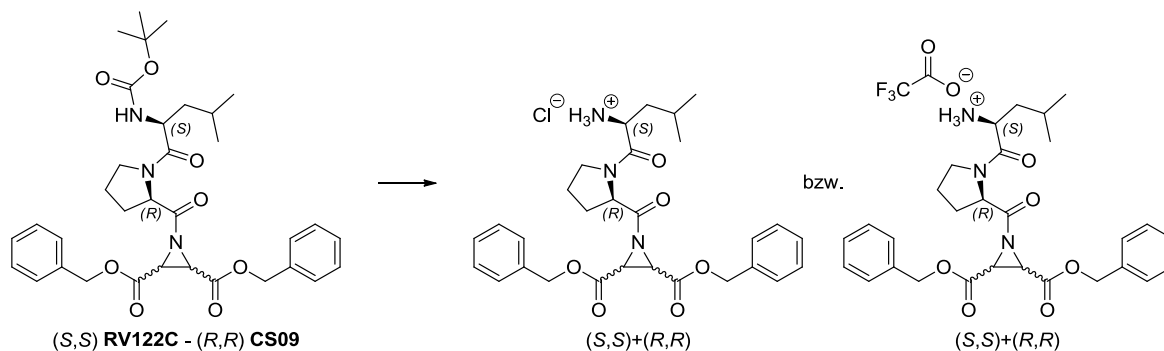


Abb. 3.1.2.1-1: Geplante Darstellung der **RV122C/CS09**-entsprechenden Verbindungen mit freiem Amin als HCl/TFA-Salz

Eine weitere alternative Darstellung eines Inhibitors mit freiem *N*-terminalen Amin kann durch Nutzung der für einen Benzylester am Aziridin bereits bewährten⁸⁶ Hydrogenolyse erreicht werden. Im Gegensatz zur in Kap. 3.1.1.1 thematisierten Hydrogenolyse der Carboxy-Schutzgruppe wird hier die Amino-Schutzgruppe abgespalten. Dementsprechend müssen die ursprünglichen Benzylester durch hydrogenolysestabile Ester am Aziridin-2,3-dicarboxylat ausgetauscht werden. Ein bereits verfügbarer *warhead* dafür ist das $(2S,3S)+(2R,3R)$ -Bis(cyclohexylmethyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat. Für den *N*-Terminus wird die Cbz-Schutzgruppe gewählt.¹³⁰ Im Gegensatz zu den erstgenannten Alternativen wird hier nach der Abspaltung der Schutzgruppe durch Hydrogenolyse kein Salz gebildet, sondern es liegt das freie Amin vor (Abb. 3.1.2.1-2).

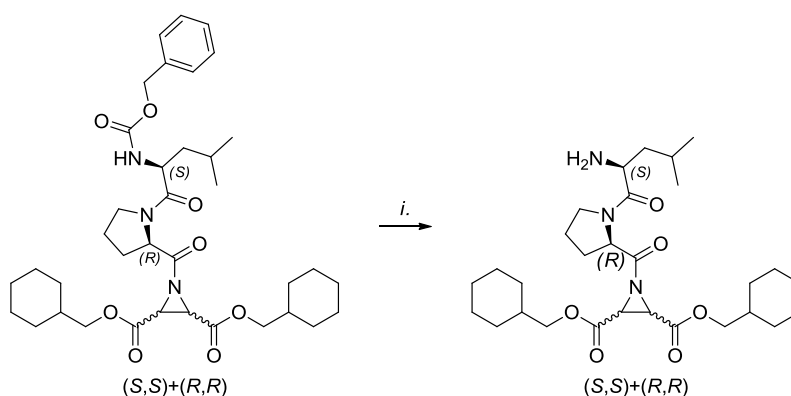


Abb. 3.1.2.1-2: Geplante Darstellung eines Inhibitors mit freiem Amin durch hydrogenolytische Abspaltung der *N*-terminalen Cbz-Schutzgruppe unter Beibehaltung der hydrogenolyse-stabilen Cyclohexylmethylester –
i. 103 mg/mmol Pd/C, MeOH, 1 h 5 Bar H₂

Um die Hydrophilie zu erhöhen besteht, neben der Abspaltung der Schutzgruppe, weiterhin die Möglichkeit schon während der Dipeptidsynthese die hydrophobe Boc-Schutzgruppe durch eine hydrophilere Schutzgruppe auszutauschen. Die neue Schutzgruppe darf jedoch nicht durch die für die Peptidsynthese üblichen Reaktionen abgespalten werden. Alle gängi-

gen Schutzgruppen (Fmoc, Cbz, Acetamid, Phthalimid, Benzylamin, Triphenylmethylamin, Benzylidenamin und *p*-Toluolsulfonamid) erfüllen allerdings die Anforderungen bezüglich der Hydrophilie nicht. Möglich ist aber die Nutzung der kommerziell erhältlichen 2-(2-Methoxyethoxy)essigsäure (GlycAc-OH) als Schutzgruppe. Die Stabilität sollte vergleichbar mit der eines Acetamids und damit ausreichend für die geplante Synthese sein (Abb. 3.1.2.1-3).

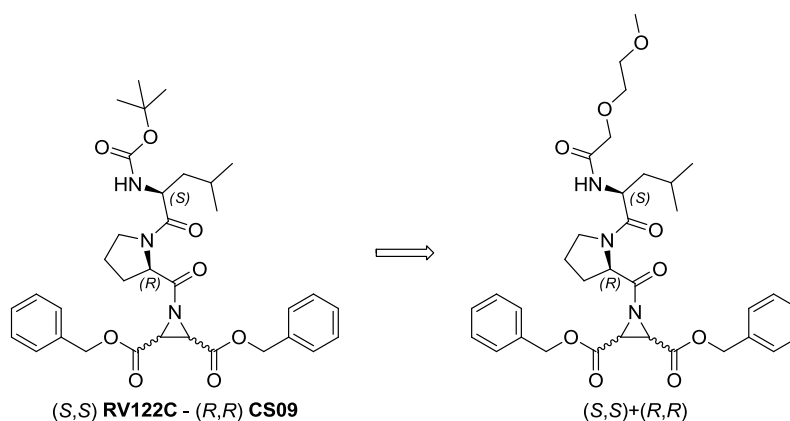


Abb. 3.1.2.1-3: Geplante Substitution der Boc-Schutzgruppe durch die 2-(2-Methoxyethoxy)acetyl-Schutzgruppe

Für die ersten beiden Varianten muss folglich analog Kap. 3.1.1.1 Abb. 3.1.1.1-1 zuerst das Dipeptid *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-(*R*)-prolin dargestellt und mit dem (2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylat verknüpft werden, bevor Versuche der Entschützung des *N*-Terminus durchgeführt werden können. Für die Variante der Substitution der Boc- bzw. Cbz- Schutzgruppe wird das zur Kupplung benötigte Dipeptid analog, aber mit variiertem Schutzgruppe aufgebaut, um dann mit dem passenden (2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-Dicyclohexylaziridin-2,3-dicarboxylat verknüpft zu werden.

3.1.2.2 Synthese der Dipeptide

Der Aufbau der benötigten Dipeptide erfolgte über die Kupplung mit DCC/HOBt. Der *N*-Terminus war entweder über die Boc-, Cbz- oder die GlycAc-Schutzgruppe, der *C*-Terminus als Methyl- oder Benzylester geschützt. Nach der Kupplung wurde der Benzylester hydrolytisch mit Wasserstoff über Palladium-Kohle als Katalysator abgespalten, oder, im Falle des Methylesters, mit LiOH verseift.

Die Kupplung mit DCC/HOBt verläuft vergleichbar mit der in Kap. 3.1.1.3 beschriebenen Steglich-Veresterung mit DCC/DMAP (Abb. 3.1.2.2-1). Zunächst erfolgt nach Angriff der Säure **1** an DCC die Bildung des DCC-Addukts *O*-Acylisoharnstoff (**2**), gefolgt vom nucleophilen Angriff von HOBt zum 1-Hydroxybenzotriazolester (**3**). Bei der Reaktion von **3** mit dem

Nucleophil zum Produkt **4** tritt, im Vergleich zur Reaktion von **2**, deutlich weniger Racemisierung auf.¹³¹

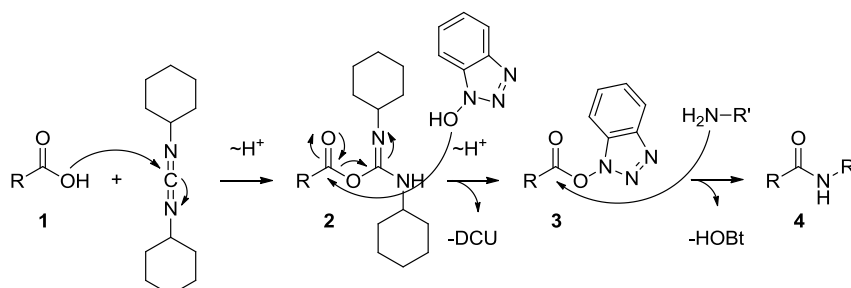


Abb. 3.1.2.2-1: Mechanismus der Peptidkupplung mittels DCC/HOBt – als Nebenprodukt entsteht *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff (DCU)

Die Racemisierung während der Kupplungsreaktion ist eine Folge der Acidität der α -Position. Durch die Ausbildung eines Oxazol-Intermediats und Deprotonierung geht die Stereoinformation verloren. Nach der Öffnung des Oxazol-Intermediats durch den Aktivator (DCC) oder die freie Aminogruppe, wird das racemische Produkt gebildet (Abb. 3.1.2.2-2).¹³²

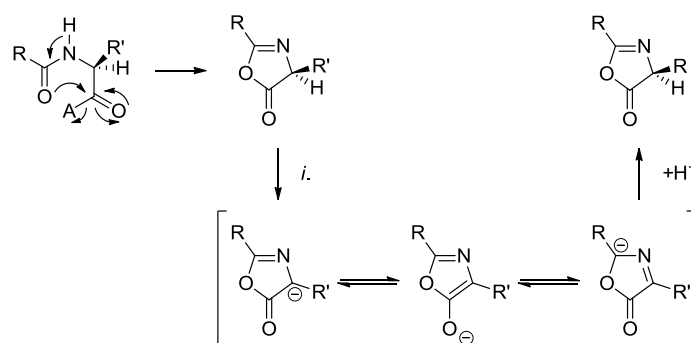


Abb. 3.1.2.2-2: Mechanismus der basenkatalysierten Racemisierung über ein Oxazol – A = Aktivator, R/R' = Aminosäureseitenketten - *i*. Base

Neben der Wahl von HOBt als Aktivator, welches die Racemisierung unterdrückt und die Reaktion beschleunigt, sollten nicht-nucleophile Basen wie DIEA oder NMM verwendet werden.¹³² Diese sollten zusätzlich nur über eine geringe Basenstärke verfügen, um das Gleichgewicht nicht zu sehr auf die Seite der deprotonierten Spezies zu verschieben.

Für die im Folgenden beschriebene Darstellung der Dipeptide wird, zur besseren Übersichtlichkeit, der Dreibuchstabencode für die Dipeptide, Aminosäuren und Schutzgruppen verwendet (siehe Kap. 12. Abkürzungsverzeichnis).

Darstellung von Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-OBn

Die Synthese erfolgte aus kommerziell erhältlichem Boc-(S)-Leu-OH und (R)-Pro-OBn * *p*-TosOH. (R)-Pro-OBn * *p*-TosOH wurde aus (R)-Prolin und Benzylalkohol mit *para*-Toluolsulfonsäure als Säurekatalysator mittels einer Dean-Stark-Apparatur in 75%iger Ausbeute hergestellt (Abb. 3.1.2.2-3).^{133,134}

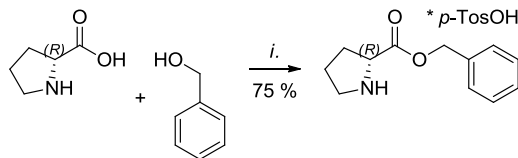


Abb. 3.1.2.2-3: Säurekatalysierte Darstellung von (R)-Pro-OBn aus (R)-Prolin und Benzylalkohol – *i.* 3.9 Äq. BnOH, 1.02 Äq. *para*-Toluolsulfonsäure*H₂O, Toluol, 18 h reflux

Darstellung von Cbz-(S)-Leu-(R)-Pro-OMe

Wie in Kap. 3.1.2.1 beschrieben soll die *N*-terminale Cbz-Schutzgruppe vom Tripeptid hydrogenolytisch abgespalten werden. Deswegen kann nach der Dipeptidsynthese die Abspaltung der *C*-terminalen Schutzgruppe nicht hydrogenolytisch erfolgen, weswegen eine Alternative zur Benzylester-Schutzgruppe gewählt werden muss. Der Methylester und dessen Verseifung erfüllt diese Voraussetzung.

Zur Synthese wurde Cbz-(S)-Leu-OH mit (R)-Pro-OMe * HCl gekoppelt. Cbz-(S)-Leu-OH wurde aus (S)-Leucin und Benzylchloroformiat in Na₂CO₃-Lsg. in 98%iger Ausbeute hergestellt (Abb. 3.1.2.2-4). (R)-Pro-OMe * HCl wurde aus (R)-Prolin und Thionylchlorid in Methanol in 99%iger Ausbeute gewonnen (Abb. 3.1.2.2-5).¹³⁵

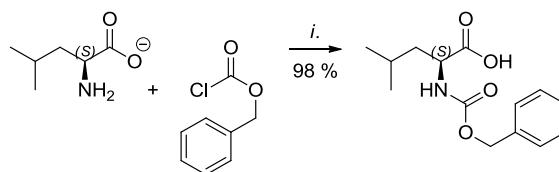


Abb. 3.1.2.2-4: Darstellung von Cbz-(S)-Leu-OH aus (S)-Leu und Benzylchloroformiat – *i.* 3 Äq. 1.5 N Na₂CO₃-Lsg., 1.1 Äq. Benzylchloroformiat, 2 h 0 °C, 18 h RT

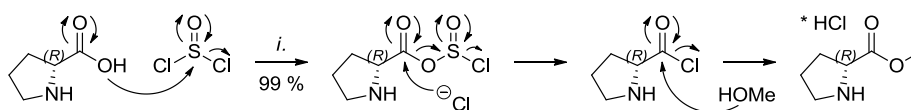


Abb. 3.1.2.2-5: Darstellung von (R)-Pro-OMe * HCl aus (R)-Prolin und Methanol mittels Thionylchlorid – *i.* 1.3 Äq. Thionylchlorid, Methanol, 0 °C, 18 h RT

Darstellung von GlycAc-(S)-Leu-(R)-Pro-OBn

Das Dipeptid wurde aus dem bereits beschriebenen (R)-Pro-OBn und GlycAc-(S)-Leu-OH aufgebaut. Zur Einführung der GlycAc-Schutzgruppe wurde (S)-Leucin zunächst zu (S)-Leu-OBn * *p*-TosOH in 99%iger Ausbeute umgesetzt. Die Einführung der GlycAc-Schutzgruppe erfolgte mittels DCC/NMM in 60%iger Ausbeute. Nach hydrogenolytischer Abspaltung des Benzylesters mit Wasserstoff über Palladium-Kohle als Katalysator wurde GlycAc-(S)-Leu-OH in 99%iger Ausbeute gewonnen (Abb. 3.1.2.2-6).

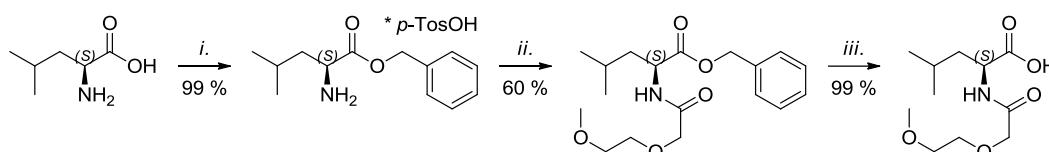


Abb. 3.1.2.2-6: Darstellung von GlycAc-(S)-Leu-OH ausgehend von (S)-Leucin – *i.* 3.9 Äq. BnOH, 1.02 Äq. *para*-Toluolsulfonsäure*H₂O, Toluol, 18 h reflux; *ii.* 1.0 Äq. 2-(2-Methoxyethoxy)essigsäure, 2.1 Äq. NMM, 1.05 Äq. DCC, THF, 1 h 0 °C, 24 h RT; *iii.* 103 mg/mmol Pd/C, MeOH, 1 h 5 Bar H₂

Die Kupplung der jeweils C- bzw. N-terminal geschützten Aminosäuren zu den entsprechenden Dipeptiden erfolgte wie in Abb. 3.1.2.2-7 dargestellt. Die Ausbeuten sind in Tab. 3.1.2.2-8 aufgeführt.

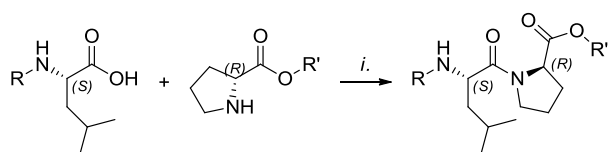


Abb. 3.1.2.2-7: DCC/HOBt vermittelte Peptidkupplung – R = N-terminale Schutzgruppe; R' = C-terminale Schutzgruppe – *i.* 2.0 Äq. NMM, 1.05 Äq. DCC, 1.0 Äq. HOBt, THF, 1 h 0 °C, 24 h RT

Tab. 3.1.2.2-8: Übersicht dargestellter Dipeptide mit Ausbeuten und Epimerenverhältnissen (bestimmt über ¹H-/¹³C-NMR)

Lab. Nr.	Dipeptid	Ausbeute	Epim.-verhältnis
PF125	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-OBn	59 %	1:0.2
PF198	Cbz-(S)-Leu-(R)-Pro-OMe	40 %	1:0.3
PF310	GlycAc-(S)-Leu-(R)-Pro-OBn	21 %	1:0.4

Die zur Kupplung an die *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylate nötigen C-terminal entschützten Dipeptide wurden, wie in Abb. 3.1.2.2-9 gezeigt, entweder über Hydrogenolyse der Benzylester oder über die Verseifung des Methylesters dargestellt. Die entsprechenden Ausbeuten sind in Tab. 3.1.2.2-10 wiedergegeben.

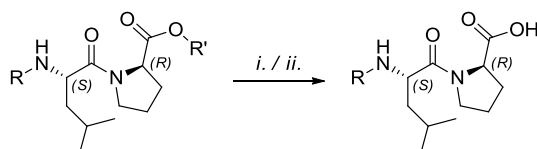


Abb. 3.1.2.2-9: Abspaltung der C-terminalen Schutzgruppe der Dipeptide – R = N-terminale Schutzgruppe; R' = Benzyl, *i.* 103 mg/mmol Pd/C, MeOH, 1 h 5 Bar H₂ – R' = Methyl, *ii.* 1.1 Äq. 1 M LiOH-Lsg., H₂O/MeOH [1:1], 1 h 0 °C, 18 h RT

Tab. 3.1.2.2-10: Übersicht dargestellter C-terminal entschützter Dipeptide mit Methode und Ausbeute

Lab. Nr.	Dipeptid	Methode	Ausbeute	Epim.-Verhältnis
PF068	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-OH	Pd/C H ₂	84 %	1:0.4
PF203	Cbz-(S)-Leu-(R)-Pro-OH	1 M LiOH	95 %	1:0.4
PF379	GlycAc-(S)-Leu-(R)-Pro-OH	Pd/C H ₂	99 %	1:0.6

3.1.3 Darstellung der Tripeptide

Die Darstellung der Aziridinylpeptide des Typs I erfolgte durch Fragmentkupplung der entsprechenden Dipeptide aus Kap. 3.1.2.2 an die jeweiligen *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylate aus Kap. 3.1.1.5 mittels des Kupplungsreagenz PPA.

Bei dieser Kupplung bildet das Propylphosphonsäureanhydrid nach Angriff der Säurefunktion des Dipeptids **1** das PPA-Addukt **2**, welches die aktivierte Spezies darstellt. Durch nucleophilen Angriff des Stickstoffs des Aziridin-2,3-dicarboxylats wird dieser zum Produkt **3** *N*-acyliert (Abb. 3.1.3-1).

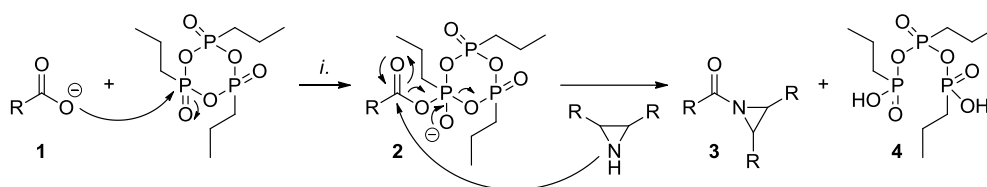


Abb. 3.1.3-1: Mechanismus der *N*-Acylierung mittels PPA – *i.* Base

Die Verwendung von PPA als Kopplungsreagenz ist zum einen vorteilhaft, da die aus PPA entstehende Propylphosphonsäure **4** wasserlöslich ist und so leicht durch wässrige Extraktion entfernt werden kann.¹³⁶ Zum anderen ist PPA als Kopplungsreagenz aufgrund der höheren Reaktivität des gebildeten Addukts anderen gängigen Kopplungsreagenzien, die symmetrische Anhydride bilden, überlegen.^{101,102} Diese erhöhte Reaktivität ist für die *N*-Acylierung am Aziridin-Ring nötig, da sich die Nucleophilie des Stickstoffatoms von der anderen, acyclischer wie cyclischer, Stickstoffverbindungen stark unterscheidet. Der Stickstoff am Aziridin-Ring ist deutlich weniger nucleophil. Dieser Umstand lässt sich nur durch eine höhere Reaktivität der aktivierten Spezies ausgleichen.

Der Grund für die geringere Nucleophilie liegt in der Geometrie des Aziridinrings. Im Gegensatz zum optimalen Bindungswinkel der sp^3 -Hybridisierung von 109.5° findet man im Dreiring nur 60° . Neben der resultierenden Ringspannung führt dies dazu, dass die beteiligten Ringatome eher sp^2 -hybridisiert sind, was zum einen zu mehr p-Charakter in den Einfachbindungen und zum anderen zu mehr s-Charakter des freien Elektronenpaares am Stickstoff führt.¹¹⁶ Durch den größeren s-Charakter werden die Elektronen des freien Elektronenpaares, relativ zur sp^3 -Hybridisierung betrachtet, auf ein energetisch niedrigeres, besser stabilisiertes, Hybridorbital abgesenkt. Dieses ist deutlich interaktionsträger und damit auch deutlich weniger nucleophil. Dieser Effekt wird im Falle der Aziridin-2,3-dicarboxylate durch die elektronenziehenden Gruppen an C2 und C3 noch weiter verstärkt.

Experimentelle Bestätigung für mehr sp^2 - als sp^3 -Charakter am Aziridin findet sich in der geringeren Basizität,¹¹⁶ der geringen Bindungslänge zwischen den Ringatomen¹³⁷ und in der verlangsamten Inversion *N*-substituierter Aziridine¹¹⁶. Bei *N*-acylierten Aziridinen kann zudem ein pyramidal, und nicht wie bei Amiden planar, angeordneter Stickstoff gefunden und durch IR-Spektroskopie bestätigt werden.¹¹⁶ Dies ist auch der Grund für die in Kap. 3.1.1.1 erwähnte Instabilität gegenüber Säuren, da eine Protonierung das *N*-acylierte Aziridin noch weiter aktiviert und einen Angriff vieler Nucleophile zur Ringöffnung ermöglicht.¹⁰⁵

Die Synthese aller *N*-acylierten Aziridin-2,3-dicarboxylate erfolgte durch die Kupplung der jeweiligen Dipeptide an die entsprechenden Aziridin-2,3-dicarboxylate (Abb. 3.1.3-2). Zur Verbesserung der Ausbeute wurde die Reaktionsdauer variiert (Tab. 3.1.3-3, nächste Seite). Die Strukturen der in Tab. 3.1.3-3 genannten Inhibitoren sind im Formelregister (Kap. 11) aufgelistet.

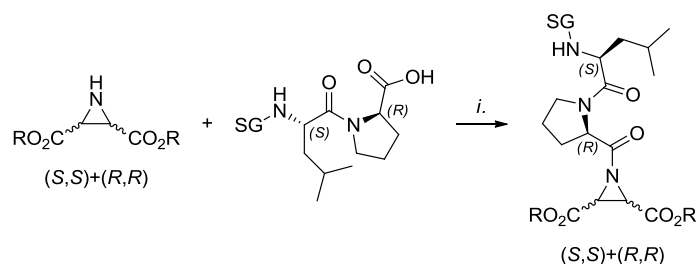


Abb. 3.1.3-2: Darstellung der Aziridinylpeptide aus Aziridin-2,3-dicarboxylaten und Dipeptiden – $i.$ 1.2 Äq. Dipeptid, 3.0 Äq. PPA, EA, 1 h 0 °C, X h RT – R = Ester-Reste; SG = Schutzgruppe

Tab. 3.1.3-3: Synthetisierte *N*-acylierte Aziridin-2,3-dicarboxylate mit Reaktionsdauer, Ausbeuten und Diastereomeren-Verhältnissen nach Aufreinigung durch HPLC – Reste in üblicher Abkürzung bzw. als Kette plus Rest z.B.

OMeCy = Cyclohexylmethyl oder OMeNaph = Naphthalin-2-ylmethyl

Lab. Nr.	Verbindung	Rkt-Dauer	Ausbeute	Diast.*-Verhältnis
PF180	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn) ₂	24 h	58 %	1:1
PF253	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OMeCy)	24 h	13 %	1:1:0.3
PF257	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OEtPh) ₂	48 h	31 %	1:0.75
PF258	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OMeCy) ₂	24 h	22 %	1:0.3
PF270	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OEt)	72 h	15 %	1:0.9
PF272	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OEtPh)	48 h	43 %	1:1:1:0.6
PF284	Cbz-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OMeCy) ₂	24 h	15 %	1:1
PF289	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OtBu)	48 h	26 %	1:1
PF294	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OMeNaph)	48 h	23 %	1:1
PF317	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OPropPh)	48 h	24 %	1:1
PF326**	GlycAc-(S)-Ile-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn) ₂	24 h	5 %	1:1:0.6
PF362	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OPropPh) ₂	72 h	35 %	1:1
PF381	GlycAc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn) ₂	96 h	7 %	1:0.6

* Bis zu vier Isomere durch *N*-Acylierung von racemischen *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten mit epimerisierten Dipeptiden

** aus Kap. 3.2.3.2, für die Übersicht bereits hier mit aufgeführt

Die Reaktionsdauer hat nicht in allen Fällen einen Einfluss auf die Ausbeute. Bei den erzielten Ausbeuten zwischen 5 % und 58 % liegt der Durchschnitt bei 24 %. Prinzipiell scheinen aber kurze (24 h) Reaktionszeiten für symmetrische und etwas längere (48 h) für unsymmetrische Aziridin-2,3-dicarboxylate die etwas besseren Ausbeuten zu liefern.

Mit dieser Bibliothek wurden ausgehend von **CS09** durch schrittweise Modifikation Derivate erhalten,

- bei denen die Schutzgruppen variieren (**PF381**),
- die als Prodrug fungieren können (**PF270**),
- die als spätere Halbester ein gesättigtes Analogon darstellen (**PF253**),
- bei denen außerdem die C-Kette verlängert wurde (**PF257** und **PF362**),
- wovon Letztere auch das Bindeglied z.B. zu den unsymmetrischen Halbestervorläufern **PF272** und **PF317** sind (Abb. 3.1.3-6).

Außerdem wurde ein offenkettiges **RV122C/CS09**-Analogon aus Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-OH und (S)-Asp(OBn)₂ hergestellt (**PF128**, Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S)-Asp(OBn)₂, Abb. 3.1.3-4). Die Darstellung von (S)-Asp(OBn)₂ * *p*-TosOH erfolgte analog der in Kap. 3.1.2.2 beschriebenen, säurekatalysierten Veresterung des (R)-Prolins zu (R)-Pro-OBn * *p*-TosOH. Das Produkt konnte in 74%iger Ausbeute erhalten werden. Die Kupplung zum Tripeptid erfolgte ebenfalls analog der in Kap. 3.1.2.2 beschriebenen, DCC/HOBt vermittelten Peptidkupplung in 56%iger Ausbeute (Tab. 3.1.3-5).

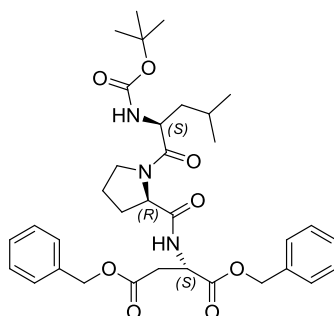


Abb. 3.1.3-4: Tripeptid **PF128** (Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S)-Asp(OBn)₂) als offenkettiges **RV122C/CS09**-Analogon

Tab. 3.1.3-5: Tripeptid Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S)-Asp(OBn)₂, Methode und Ausbeute

Lab. Nr.	Verbindung	Methode	Ausbeute	Epim.-Verhältnis
PF128	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S)-Asp(OBn) ₂	DCC/HOBt	56 %	1:0.2

Die Abbildung 3.1.3-6 fasst die dargestellten Verbindungen noch einmal zusammen:

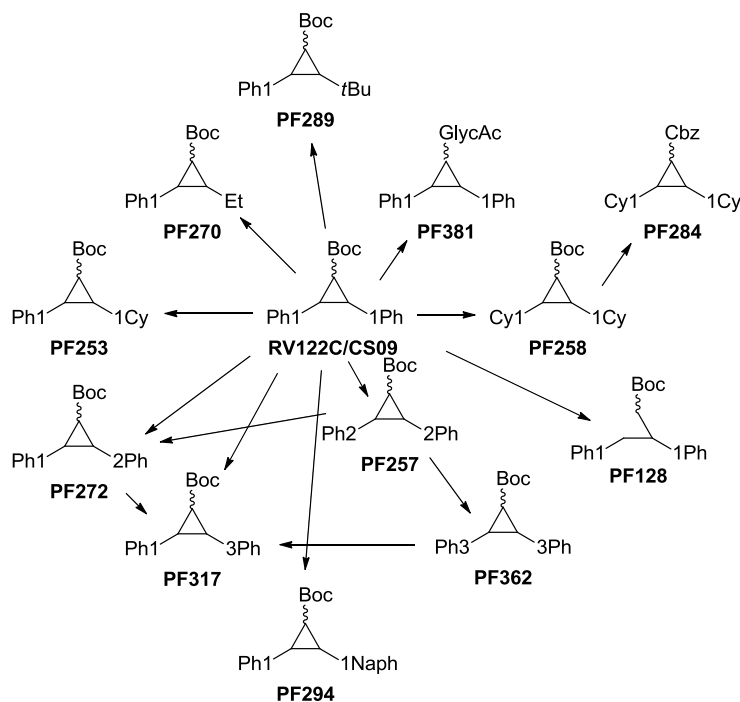


Abb. 3.1.3-6: Piktografische Übersicht der Variationen, ausgehend von **CS09** – Neben der Schutzgruppe in üblicher Abkürzung wird das Dipeptid als Wellenlinie und das Aziridin-2,3-dicarboxylat als Dreieck angegeben (Ausnahme: offenkettiges (S)-Asp bei **PF128**). Die Reste in 2- und 3-Position sind als Gruppe oder als Zahl plus Rest angegeben, wobei die Zahl für die Kettenlänge (CH₂)_x steht (z.B. 3Ph = 3-Phenylpropyl bzw. 1Naph = Naphthalin-2-ylmethyl).

3.1.4 Freisetzung der hydrophilen Gruppen

3.1.4.1 3-Carbonylaziridin-2-carbonsäure-basierte Inhibitoren

Aus den in Kap. 3.1.3 beschriebenen unsymmetrischen Tripeptiden sollten nach ihrer erfolgreichen Synthese durch Hydrogenolyse die entsprechenden Derivate mit freier Carboxy-Funktion erhalten werden (Abb. 3.1.4-1). Die Strukturen der in Tab. 3.1.4-2 genannten Inhibitoren sind im Formelregister (Kap. 11) aufgelistet.

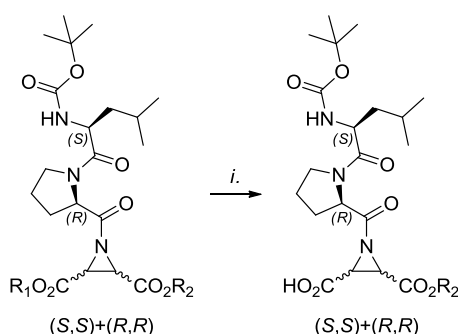


Abb. 3.1.4-1: Hydrogenolytische Darstellung der 3-Carbonylaziridin-2-carbonsäure-basierten Inhibitoren aus unsymmetrischen Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Inhibitoren mit Benzylester – R₁ = Benzyl, R₂ = hydrogenolyse-stabiler Rest – *i.* 103 mg/mmol Pd/C, MeOH, 30 min 5 Bar H₂

Tab. 3.1.4-2: Synthetisierte 3-Carbonylaziridin-2-carbonsäure-basierten Inhibitoren mit Ausbeuten

Lab. Nr.	Verbindung	Ausbeute	Diast.-Verhältnis
PF345	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OH)(OMeCy)	74 %	1:1:0.3
PF349	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OH)(OEt)	85 %	1:1:0.6
PF350	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OH)(OEtPh)	95 %	1:1:0.7:0.3
PF382	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OH)(OtBu)	72 %	1:1
PF400	Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OH)(OPrPh)	98 %	1:1

Auf diese Weise konnten Inhibitoren gewonnen werden, die neben der freien Carboxy-Funktion Ester tragen, die:

- weniger Raum einnehmen als ein Benzylester (**PF349**),
- sperriger sind (**PF382**),
- statt des aromatischen Benzylesters eine gesättigte Gruppe tragen (**PF345**) oder
- bei denen die Kettenlänge des Benzylrests um CH₂-Einheiten verlängert wurde (**PF350** und **PF400**).

Damit erweitert sich das in Kap. 3.1.3 gezeigte Piktogramm wie folgt:

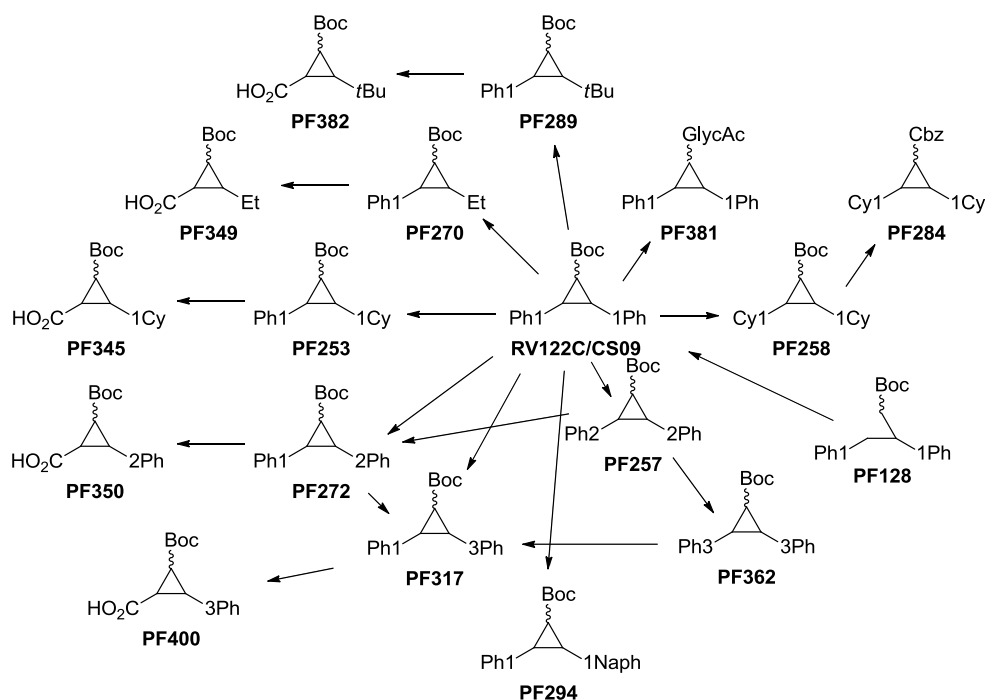


Abb. 3.1.4-3: Piktografische Übersicht der schrittweisen Variation, ausgehend von **CS09** – Neben der Schutzgruppe in üblicher Abkürzung wird das Dipeptid als Wellenlinie und das Aziridin-2,3-dicarboxylat als Dreieck angegeben (Ausnahme: offenkettiges (S)-Asp bei **PF128**). Die Reste in 2- und 3-Position sind als Gruppe oder als Zahl plus Rest angegeben, wobei die Zahl für die Kettenlänge $(\text{CH}_2)_x$ steht (z.B. 3Ph = 3-Phenylpropyl bzw. 1Naph = Naphthalin-2-ylmethyl).

3.1.4.2 Versuche der Darstellung eines freien Amins am *N*-Terminus

Wie in Kap. 3.1.2.1 beschrieben, sollte nach der erfolgreichen Darstellung der Tripeptide versucht werden, die *N*-terminale Schutzgruppe zu entfernen, um so eine Verbindung mit freier Amin-Funktion darzustellen.

Für die in Kap. 3.1.2.1 beschriebenen Varianten der säurekatalysierten Boc-Entschützung wurde das Diastereomerenpaar **RV122C/CS09 = PF180** hergestellt.

Die Boc-Schutzgruppe sollte durch Einsatz von TFA_{abs} in wasserfreiem DCM_{abs} abgespalten werden. Dazu wurden 1.0 Äq. frisch destilliertes und über Molsieb getrocknetes TFA unter Argon eingesetzt. Wie in Abb. 3.1.4.2-1 beschrieben, sollte das Produkt als TFA-Salz entstehen.

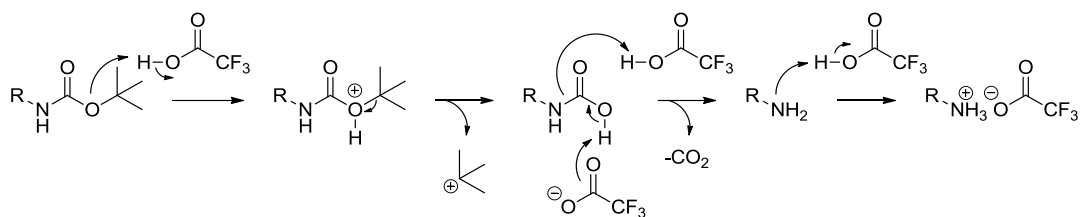
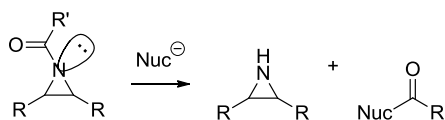


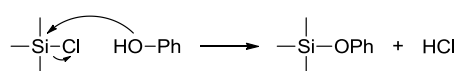
Abb. 3.1.4.2-1: Mechanismus der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mittels TFA

Die DC-Kontrolle zeigte bereits nach 5 min kein Edukt mehr, allerdings konnte Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylat als Zersetzungsprodukt nachgewiesen werden.

Im stark sauren Milieu wird offensichtlich das *N*-acylierte Aziridin durch Protonierung aktiviert und durch den Angriff beliebiger Nucleophile, z.B. Restwasser, die Abspaltung des Aziridins als Abgangsgruppe bewirkt (Abb. 3.1.4.2-3).¹³⁸

Abb. 3.1.4.2-3: Substitution des *N*-acylierten Aziridins durch Nucleophile

Eine weitere Variante der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe ist, HCl *in situ* aus TMS-Cl und Phenol herzustellen. Durch den nucleophilen Angriff des Phenols an Trimethylsilylchlorid wird 1 Äq. Chlorwasserstoff *in situ* generiert (Abb. 3.1.4.2-4), mit welchem sich die Boc-Schutzgruppe abspalten lässt.^{139,140} Der Nachteil dieser Variante liegt im direkten Einsatz eines Nucleophils.

Abb. 3.1.4.2-4: *in situ* Darstellung von HCl aus TMS-Cl und Phenol

Aufgrund des Einsatzes von Phenol als Nucleophil wurde das Tripeptid erst nach 5 min und vollständiger Auflösung des Phenols zu einer Lösung aus 1.0 Äq. TMS-Cl und 1.0 Äq. Phenol in DCM_{abs} gegeben. Die DC-Kontrolle nach 5 min zeigte allerdings, analog der ersten Variante, das Aziridin-2,3-dicarboxylat-Buchstück als Produkt der Reaktion. Daher wurde auf weitere Versuche verzichtet.

Eine Alternative der Synthese eines Tripeptids mit freiem *N*-Terminus geht vom Derivat **PF284** aus. Mit der Struktur Cbz-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*S,S*)+(*R,R*)-Azi(OMeCy)₂ besitzt sie hydrogenolyse-instabile *N*- und hydrogenolyse-stabile *C*-terminale Schutzgruppen. Die Versuche zur Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe erfolgten analog der in Kap. 3.1.2.2 beschriebenen Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen (Abb. 3.1.4.2-5).

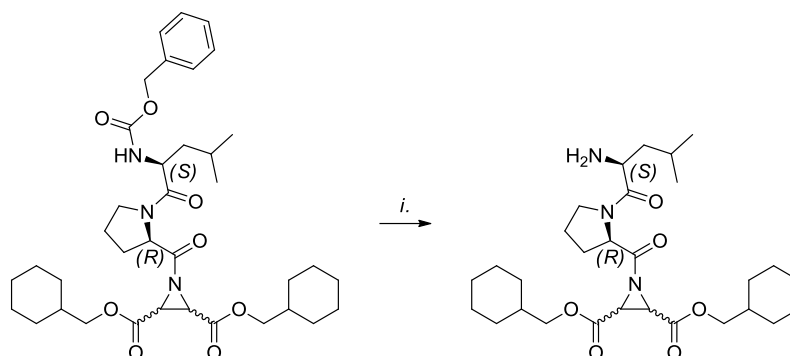


Abb. 3.1.4.2-5: Geplante Darstellung eines Inhibitors mit freiem Amin durch hydrogenolytische Abspaltung der *N*-terminalen Cbz-Schutzgruppe unter Beibehalt der hydrogenolyse-stabilen Cyclohexylmethylester –
i. 103 mg/mmol Pd/C, MeOH, 1 h 5 Bar H₂

Die DC-Kontrolle zeigte wiederum das *N*-unsubstituierte Aziridin-Bruchstück. Die ¹H-NMR-spektroskopische Analyse untermauert die beschriebenen Beobachtungen noch weiter (Abb. 3.1.4.2-6).

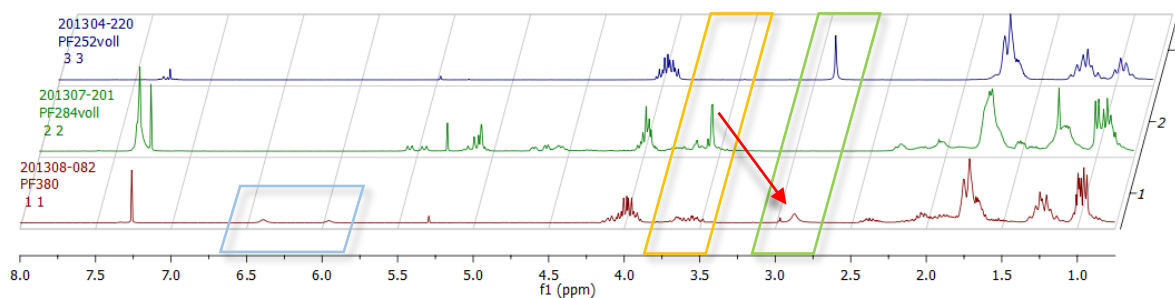


Abb. 3.1.4.2-6: Überlagerungen der ¹H-NMR-Spektren der versuchten Darstellung eines Inhibitors mit freiem Amin (Reaktionslösung, rot), der Tripeptid-Vorstufe (**PF284voll**, grün) und der Aziridin-Vorstufe (**PF252voll**, blau)

Entscheidend für die Interpretation ist der Verlust der für die *N*-acylierten Aziridine typischen Azi-CH Peaks bei ~3.5 ppm (Abb. 3.1.4.2-6, oranger Kasten, **PF284voll** grünes Spektrum) und außerdem das Entstehen der für die *N*-unsubstituierten Aziridine typischen Azi-CH Peaks bei ~2.9 ppm (Abb. 3.1.4.2-6, grüner Kasten, **PF380** rotes Spektrum). Diese sind auch im Edukt (Abb. 3.1.4.2-6, grüner Kasten, **PF252voll** blaues Spektrum) vorhanden. Eine Möglichkeit, wie die Spaltung des Aziridins erfolgen könnte, ist eine intermolekulare Reaktion zwischen dem freien Amin eines Moleküls und dem Aziridid eines anderen Moleküls. Eine andere Möglichkeit wäre neben dem intermolekularen Angriff auch ein nach den Baldwin-Regeln bevorzugter intramolekularer 6-exo-trig Angriff. So könnte das entstehende freie Amin des Leucins nucleophil am Prolin unter Ringschluss und Abspaltung des *N*-unsubstituierten Aziridins reagieren (Abb. 3.1.4.2-7).

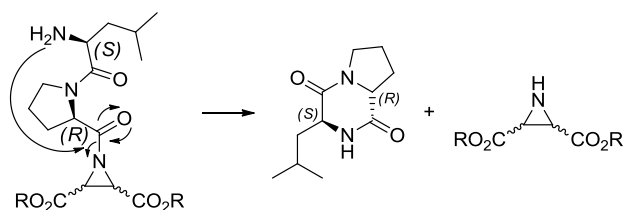


Abb. 3.1.4.2-7: Möglicher intramolekularer Ringschluss unter Abspaltung des *N*-unsubstituierten Aziridins vom Peptid – R = Cyclohexylmethyl

Der intramolekulare Ringschluss steht im Einklang zu den im Reaktionsgemisch entstehenden NH -Protonenpeaks bei ~ 6.4 und ~ 6.0 ppm (Abb. 3.1.4.2-6, oben, blauer Kasten, **PF380** rotes Spektrum). Das Intensitätsverhältnis dieser beiden Peaks entspricht demjenigen der Peaks des für die Darstellung von **PF284** als Epimerengemisch eingesetzten Dipeptids **PF203** (Cbz-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OH) mit 1:0.45. Die unterschiedliche chemische Verschiebung dieser Peaks lässt sich durch die unterschiedliche Umgebung und damit unterschiedliche Abschirmung der jeweiligen NH -Protonen in der Sesselkonformation erklären (Abb. 3.1.4.2-8).

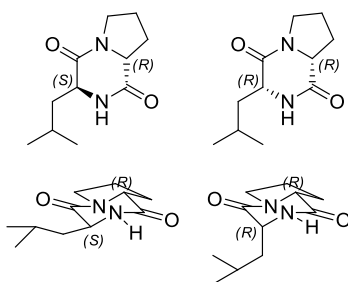


Abb. 3.1.4.2-8: Durch Ringschluss wahrscheinlich gebildete epimere cyclische Dipeptide mit zugehöriger Sesselkonformation

Zusammenfassend liegt der Schluss nahe, dass eine Abspaltung der *N*-terminalen Schutzgruppe unter Beibehalt des *N*-acylierten Aziridins zunächst möglich scheint. Das entstehende Produkt mit freier Aminfunktion zersetzt sich jedoch im Anschluss.

3.2 Zweiter Teil: Dockinggestütztes Design und Synthese

3.2.1 Molekulares Docking

3.2.1.1 AutoDock Vina

Unter molekularem Docking versteht man Berechnungsverfahren, mit denen versucht wird, nicht-kovalente Bindungen zwischen einem Makromolekül (Rezeptor) und einem *small molecule* (Ligand), vorherzusagen. Dabei wird von Röntgenstrukturen, Strukturen aus Molekulardynamik-Simulationen oder Homologiemodellen ausgegangen. Die Vorhersage der Bindungen von *small molecules* an Proteine ist dabei von besonderer praktischer Bedeutung, da dieses das Screening virtueller Bibliotheken von arzneistoffähnlichen Molekülen ermöglicht, um so *lead compounds* für die weitere Arzneistoffentwicklung zu erhalten. Außerdem lässt sich das Docking für die Vorhersage der Bindungskonformation von bekannten Inhibitoren verwenden, wenn die Kristallstrukturen nicht verfügbar sind. Dabei bewegt man sich immer im Spannungsfeld zwischen der Maximierung der Genauigkeit der Vorhersagen und der Minimierung der Rechenintensivität bzw. -dauer.¹⁴¹

Im Spektrum der Modellierungsansätze für die Rezeptor-Ligand-Bindung zeigt die Reihe

- 1) Molekulardynamik mit explizitem Lösungsmittel
- 2) Molekulardynamik mit Molekularmechanik mit impliziten Lösungsmitteln und
- 3) Molekulares Docking

somit einen steigenden Verzicht auf Genauigkeit zur Reduzierung der Rechendauer. Beispiele für Annahmen, die in diesen Modellierungsansätzen gemacht werden, sind z.B. die Wahl eines bestimmten Protonierungszustands und einer bestimmten Ladungsverteilung in den Molekülen, die sich auch während ihres ungebundenen bzw. gebundenen Status nicht verändern. Außerdem nimmt das Docking in der Regel den Großteil oder gar den gesamten Rezeptor als starr an, bezogen sowohl auf die Bindungen als auch auf die Winkel. Deutlich seltener wird ein ausgewählter Satz von kovalenten Bindungen mit freier Drehbarkeit (aktiv drehbare Bindungen) im Rezeptor zugelassen. Während sich die Molekulardynamik direkt mit Energien (bzw. in der Chemie als Kraftfelder bezeichnet) beschäftigt, ist das Docking alleine an der Wiedergabe der chemischen Potentiale interessiert, die die Präferenz der Bindungskonformation und damit die freie Energie der Bindung widerspiegeln. Dockingprogramme verwenden normalerweise eine sog. *scoring function*, deren Werte mit den chemischen Standardpotentialen des Systems korrelieren.¹⁴¹

Da das Docking zur gängigen Praxis der modernen Arzneimittelforschung zählt, steht auch eine Vielzahl an Programmen wie beispielsweise DOCK, FlexX, Gold, AutoDock und AutoDock Vina zur Verfügung. Dabei ist AutoDock Vina¹⁴¹ hervorzuheben, da es zu den wenigen Docking-Programmen zählt, die für akademische wie industrielle Zwecke frei verfügbar sind.

AutoDock Vina arbeitet dabei, wie andere Programme auch mit einer empirisch gewichteten *scoring function* und einem globalen Optimierungsalgorithmus. Der Unterschied zu anderen Programmen liegt in der Gradientbasierten lokalen Suche und der *scoring function*, die auf das Einbeziehen von hydrophoben Wechselwirkungen (van-der-Waals-Kräfte), Wasserstoffbrückenbindungen und Torsions-Strafen limitiert ist. Zusätzlich ist AutoDock Vina darauf hin optimiert wesentlich schneller zu arbeiten und erreicht trotzdem im Vergleich mit AutoDock die bessere Genauigkeit bei der Vorhersage von Protein-Ligand-Komplexen.¹⁴²

Das Docking kann in zwei Schritte unterteilt werden: Zunächst werden die Liganden in die aktive Stelle der Proteinstruktur platziert um den Ort, die Orientierung und Konformation (bzw. Bindungspose) vorherzusagen. Im zweiten Schritt wird der Energiegewinn, der durch Bindung zwischen Liganden und Protein zustande kommt, berechnet. Dabei ist die Genauigkeit der so berechneten *scoring function* abhängig von der Genauigkeit der vorhergesagten Bindungspose. Eine weitere Limitierung des virtuellen Screenings liegt darin, dass signifikant unterschiedliche Bindungsposen ein identisches *scoring* zeigen können und es nicht möglich ist die korrekte Bindungspose herauszufinden. Diese falsch-positiven Bindungsposen führen zu Vorhersagen falscher Affinitäten und reduzieren damit die Trefferquote, wenn die Ergebnisse dafür genutzt werden sollen, um neue Liganden durch virtuelles Screening zu finden. Der Kauf oder die Synthese dieser falsch-positiven Liganden ist natürlich besonders in kleinen Laborumgebungen mit begrenzten Ressourcen fatal. Außerdem stellt die Vorhersage der Affinität eines Liganden in ein Protein eine Herausforderung dar. AutoDock Vina zeigte hierbei, wie bereits erwähnt, eine mindestens genauso gute Leistung wie AutoDock bei gleichzeitig geringerer Rechenzeit.¹⁴³

Die Designphilosophie von AutoDock Vina ist, die Benutzung auch ohne Kenntnis von Implementierungsdetails, ohne Optimierung obskurer Suchparameter und ohne die Kenntnis fortgeschrittener Algebra (hamiltonsche Quaternionen/Hamilton-Zahlen) zu ermöglichen. Außerdem müssen die Ergebnisse nicht vom Benutzer zusammengefasst werden. Es werden nur die Strukturen der Moleküle, die gedockt werden sollen, und der Suchraum um die Bindungsstelle benötigt. Wichtig für die Benutzung ist nur das Bewusstsein, dass der Dockingalgorithmus der Suche nicht-deterministisch ist. Das bedeutet, dass der Dockingalgorithmus das Rezeptor-Ligand-Paar mit der objektiv korrekten Konformation, auch wenn es zum Minimum der *scoring function* passt, manchmal nicht direkt findet.¹⁴⁴

AutoDock Vina ist daher ein relativ einfach zu bedienendes und nur geringe Ressourcen benötigendes Tool, um bereits durchgeführte Arbeiten im Nachhinein zu analysieren und zu verifizieren. Außerdem ermöglicht es zukünftige Arbeit und Überlegungen des Inhibitor-Designs und der -optimierung von computertechnischer Seite aus vor der Synthese zu überprüfen, zu unterstützen und zu vereinfachen.

Dazu sollte AutoDock Vina zuerst auf seine Eignung für die Vorhersage der Bindungsmodi für Cysteinproteaseinhibitoren der Papainfamilie hin überprüft werden. Im Anschluss sollten die bereits dargestellten Aziridinylpeptide aus Kap. 3.1.3 in Enzyme gedockt werden, um die in das Design gesteckten Überlegungen zu verifizieren. Außerdem sollten mögliche Trends für den Vergleich mit den Testergebnissen der Inhibitoren herausgearbeitet werden. Als Letztes sollten nach ihrer Synthese und Testung Teile der Inhibitorbibliothek der **CS-Reihe**⁹⁸ auf auftretende Trends hin analysiert werden.

3.2.1.2 Methodenverifizierung mittels literaturbekannter Kristallstrukturen

Im ersten Schritt sollte die Eignung von AutoDock Vina für die Dockingaufgabe hin überprüft werden. Dazu wurden in der PDB-Datenbank^{34–37} veröffentlichte Kristallstrukturen gesucht, die die in Kap. 1.6.2 genannten Cysteinproteaseinhibitoren beinhalten. Für Papain konnten die Inhibitoren **E64c** (1PPP¹⁴⁵) und **CLIK-148** (1CVZ¹⁴⁶), für Cathepsin-B(-ähnliche) Enzyme **CA030** (in hum. Cathepsin-B, 1CSB¹⁴⁷), **E64c** (bovines Cathepsin-B, 1ITO¹⁴⁸), **CA074** (T. brucei Cathepsin-B, 3HHI⁶⁹) und **CA074Me** (bovines Cathepsin-B, 2DC9^{unveröffentlicht}) gefunden werden. Für humanes Cathepsin-L wurden die Inhibitoren mit der PDB-Bezeichnung **424** (2YJC²⁹), **OPT** (3BC3¹⁴⁹), **NOW** (3HHA¹⁵⁰) und **IOX** (3OF9⁴¹) ausgewählt.

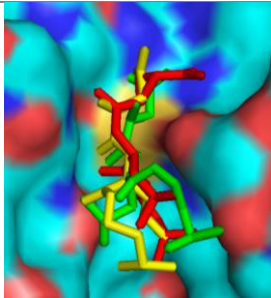
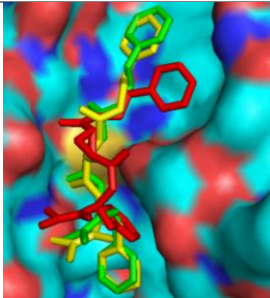
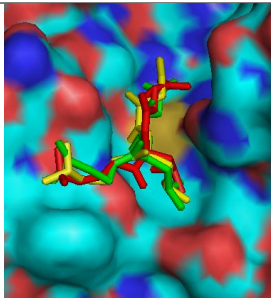
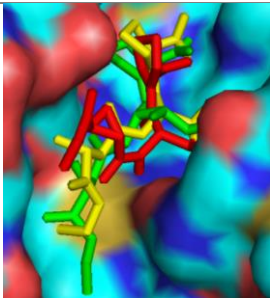
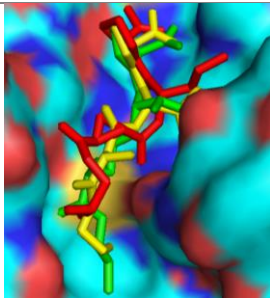
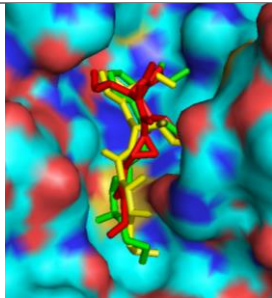
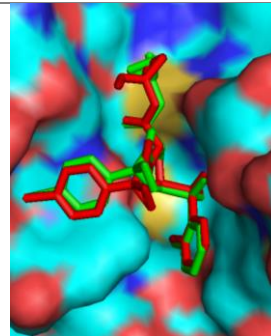
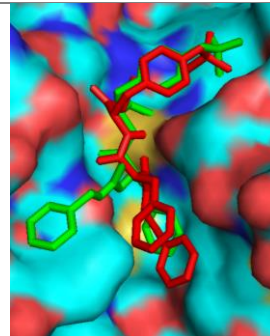
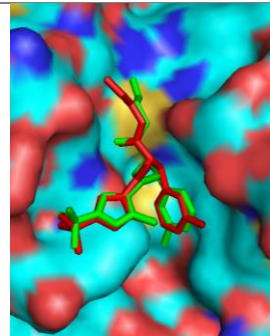
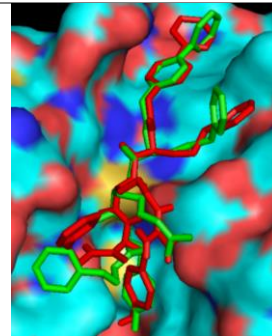
Die Strukturen der Enzyme wurden zuerst mit Pymol 1.3³⁸ vorbereitet: Wassermoleküle, Protonen, Inhibitoren und andere Heteroatome werden entfernt, die Enzymdaten daraufhin in AutoDock Tools 1.5.4¹⁵¹ geladen und schließlich Protonen an Heteroatomen, sowie Gasteiger-Ladungen (partielle Atomladungen nach Gasteiger und Marsili)¹⁵² hinzugefügt. Die aktiv drehbaren Bindungen wurden bei Null belassen und der Protonierungsgrad des aktiven Zentrums kontrolliert. Die Grid-Box wurde auf das katalytische Zentrum zentriert und beinhaltete je nach Größe des Inhibitors alle Aminosäurereste in einer Box der Größe zw. x, y, z = 12-26 Grid-Punkte bei einem Abstand der Grid-Punkte von 1 Å.

Die Liganden wurden entweder der PDB-Datenbank entnommen (Zustand nach nucleophilem Angriff), oder die Strukturen in der ChemBio 3D Ultra 13.0 Suite¹⁵³ generiert und über MMFF94¹⁵⁴ bis zu einem RMS-Gradient = 0.010 (*root mean square*, Quadratisches Mittel) energieminiert. Die anschließende Aufarbeitung erfolgte wieder in AutoDock Tools. Polare Protonen, Gasteiger-Ladungen und aktiv drehbare Bindungen wurden hinzugefügt und die Protonierungsgrade manuell dem angenommenen physiologischen pH-Milieu angepasst: Carbonsäuren z.B. wurden deprotoniert.

Nach erfolgreichem Docking wurden die erhaltenen Posen mit denjenigen der veröffentlichten Kristallstrukturen der PDB-Datenbank verglichen. Für eine gute Übereinstimmung wurde neben der AutoDock Vina eigenen Reihenfolge der *scoring function* der Abstand zwischen

dem Cys-Thiolat und den möglichen elektrophilen Zentren für einen nucleophilen Angriff zur Bewertung hinzugezogen (Tab. 3.2.1.2-1).

Tab. 3.2.1.2-1: Überlagerungen der Strukturen der jeweiligen kovalent gebundenen Liganden der Kristallstrukturen (grün), der Dockingpose der Struktur des Inhibitors nach nucleophilem Angriff und Ringöffnung aber ohne kovalente Bindung (gelb) und der Dockingpose des ursprünglichen Liganden (rot) im jeweiligen Enzym unter Angabe der entsprechenden Pose relativ zu den 9 Bindungsposen des Dockings (z.B. 4/9 bedeutet Pose 4 von 9) und Angabe der berechneten Affinität (in kcal/mol) des roten Liganden

Papain			
E-64c	CLIK-148		
			
Posen 4/9 (gelb) 1/9 (rot) -5.4 kcal/mol	Posen 6/9 (gelb) 6/9 (rot) -6.5 kcal/mol		
Cathepsin-B			
E-64c	CA030	CA074	CA074Me
			
Posen 3/9 (gelb) 4/9 (rot) -5.0 kcal/mol	Posen 1/9 (gelb) 3/9 (rot) -6.7 kcal/mol	Posen 2/9 (gelb) 3/9 (rot) -6.5 kcal/mol	Posen 2/9 (gelb) 7/9 (rot) -5.8 kcal/mol
Cathepsin-L			
424	IOX	NOW	OPT
			
Pose 3/9 (rot) -7.1 kcal/mol	Pose 6/9 (rot) -6.2 kcal/mol	Pose 1/9 (rot) -6.8 kcal/mol	Pose 3/9 (rot) -8.8 kcal/mol

In den meisten Dockingrechnungen konnte eine sehr ähnliche Dockingpose des Liganden nach nucleophiler Reaktion und Ringöffnung aber ohne kovalente Bindung (gelb) im Vergleich mit der originalen Kristallstruktur mit kovalenter Bindung (grün) gefunden werden. In den meisten Fällen war dies bereits eine der ersten der neun ausgegebenen Dockingposen, und damit eine der laut Berechnung energetisch günstigsten Dockinglösungen. Die Unterschiede zwischen den Strukturen der Inhibitoren vor der kovalenten Reaktion mit dem Enzym (rot) und den Kristallstrukturen (grün) fallen, aufgrund

- der noch anstehenden nucleophilen Reaktion,
- der weiteren Annäherung an das Enzymgerüst durch Ausbildung einer kovalenten Bindung, und
- der damit eingehenden Struktur- und Geometrieänderung,

im Vergleich mit den Strukturen nach nucleophiler Reaktion (gelb) naturgemäß deutlich größer aus. Trotzdem finden sich jeweils unter den ersten neun Dockingposen sehr ähnliche Bindungsmodi, die die jeweilige Lage in den Bindungstaschen vor der Reaktion sehr treffend wiedergeben.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass AutoDock Vina für die Vorhersage der Bindungsmodi für Cysteinproteaseinhibitoren der Papainfamilie geeignet ist.

3.2.1.3 Verifizierung der Variationen des ersten Zyklus

3.2.1.3.1 Vorbereitung und Analyse der Leitstrukturen

Wie bereits in Kap. 1.6.1 erwähnt, sind keine Kristallstrukturen von *Leishmania*-Proteasen der Gruppen CPA, CPB und CPC bekannt. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit kann aber Cruzain (1ME4⁶⁶) als verwandtes Modellenzym für ein Docking zu Hilfe genommen werden.^{65,74} Die Vorbereitung von Cruzain erfolgte analog Kap. 3.2.1.2. Die Grid-Box wurde auf das katalytische Zentrum zentriert (center_x = 3.6, _y = 11.8, _z = 8.9) und für die Box-Größe wurden je nach Größe des Liganden x, z = 10-22, y = 10-14 Grid-Punkte mit einem Abstand von 1 Å zueinander gewählt. Durch diese Ausdehnung wurde sichergestellt, dass, je nach Bindungsmodus der **RV122C/CS09**-Derivate (anti-Substrat oder Substrat-ähnlich: entgegengesetzter bzw. paralleler Verlauf der peptischen bzw. peptid-ähnlichen Grundstruktur des Inhibitors und der Substratbindespalte des Enzyms) und jeweiliger Größe der Reste der Ester, die S₁-, S₂-, S₁'- und S₂'-Bindungstaschen adressiert werden konnten.

Die Liganden wurden ebenfalls analog Kap. 3.2.1.2 vorbereitet, wobei zusätzlich am Aziridin der Stickstoff als sp³-hybridisiert (N3) definiert und die pyramidale Geometrie der CON-Azi-Teilstruktur kontrolliert bzw. mit C_{Azi1}C_{Azi2}N_{Azi}C_{Pro} bzw. C_{Azi2}C_{Azi1}N_{Azi}C_{Pro} 109.5° definiert wurde.⁹⁶ Planare Strukturen für das Aziridid wurden aufgrund ihrer energetischen Benachteiligung

gung ausgeschlossen. Zusätzlich wurde die $C_{\text{Pro}}-N_{\text{Azi}}$ -Achse für die Rotation freigegeben. Da die synthetisierten Verbindungen als Diastereomere mit *trans*-Konfiguration am Aziridin-Ring vorliegen, wurden jeweils entsprechende (*S,S*)+(*R,R*)-konfigurierte Liganden aufgebaut. AutoDock Vina berücksichtigt im globalen Optimierungsalgorithmus neben anderen Parametern nur frei drehbare Bindungen, und kann somit die Inversion am Aziridin nicht mitsimulieren. Für symmetrische Verbindungen wird diese Inversion durch die Drehung der $C_{\text{Pro}}-N_{\text{Azi}}$ -Achse abgedeckt, für unsymmetrische hingegen nicht (Abb. 3.2.1.3.1-1). Daher wurden für unsymmetrische Liganden zwei zusätzliche pyramidale Geometrien ($+109.5^\circ$, -109.5°) aufgebaut. Insgesamt wurden also zwei/vier Geometrien für einen symmetrischen/unsymmetrischen Ligand generiert.

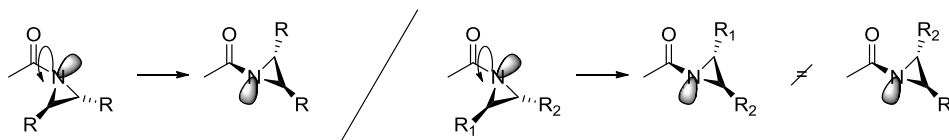
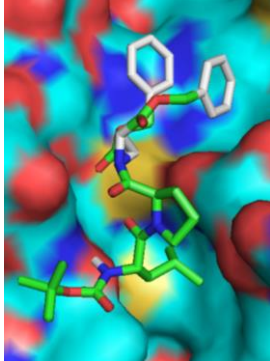
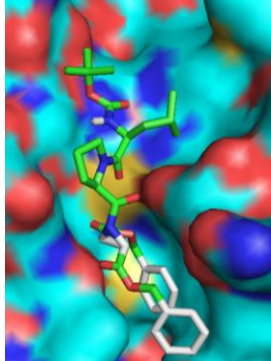
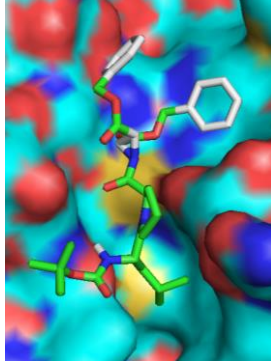
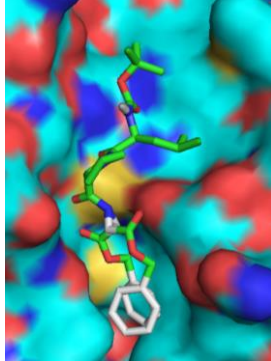


Abb. 3.2.1.3.1-1: Inversion am Stickstoff durch Drehung der C-N-Bindung führt bei symmetrischen Diestern zur gleichen Verbindung, nicht aber bei unsymmetrischen Estern

Als Erstes sollten die Diastereomere **RV122C/CS09** auf ihre Bindungsmodi hin untersucht werden (Tab. 3.2.1.3.1-2). Als Kriterien wurden die energetisch günstigste Pose und der geringste Abstand des Cys-Thiolats zu den Azi-CHs herangezogen.

Dabei konnten die in Kap. 1.6.3 beschriebenen, zwei möglichen Bindungsmodi wiedergefunden werden: ein anti-Substrat-ähnlicher und ein Substrat-ähnlicher Bindungsmodus. Wie bei den Dockingexperimenten⁹⁶ in FlexX scheint jeweils ein Benzylester eine S_1 -/ S_1 -Bindungstasche zu adressieren. Der andere Benzylester und die Boc-Schutzgruppe scheinen weiterhin nicht essenziell für die Affinität zu sein. Außerdem wird, je nach Bindungsmodus, die andere S_1 -/ S_1 -Bindungstasche vom Leucin-Rest adressiert. **CS09** zeigt im Vergleich mit **RV122C** dabei die höheren Affinitäten und den geringeren Abstand für den anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus. Für den Substrat-ähnlichen Bindungsmodus zeigt **RV122C** hingegen den geringeren Abstand.

Tab. 3.2.1.3.1-2: Anti-Substrat- (Typ A) und Substrat-ähnliche (Typ S) Bindungsmodi von **CS09** und **RV122C** unter Angabe der niedrigeren Distanz des Cys-Thiolats zum jeweiligen Azi-CH (in Å) und Angabe der Affinität (in kcal/mol)

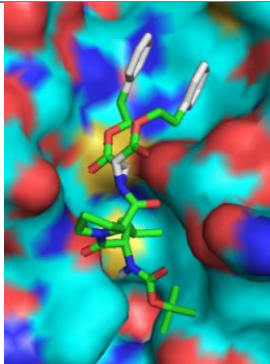
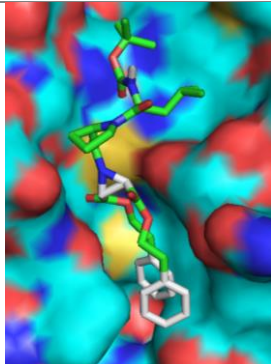
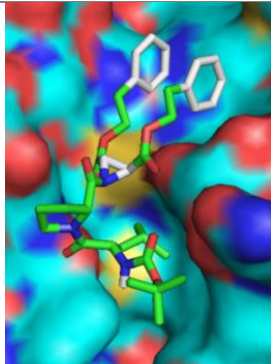
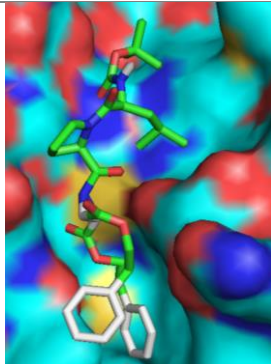
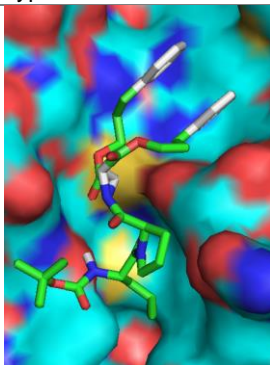
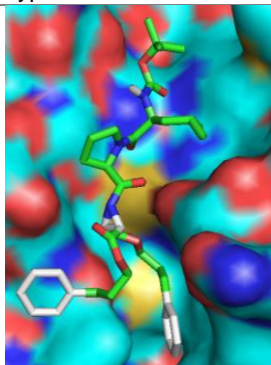
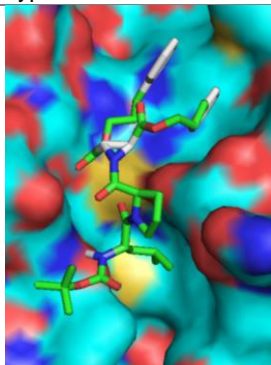
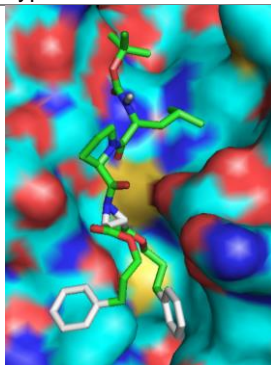
CS09 (R,R)		RV122C (S,S)	
Typ A	Typ S	Typ A	Typ S
			
4.6 Å	5.6 Å	4.6 Å	4.0 Å
-7.0 kcal/mol	-6.2 kcal/mol	-6.0 kcal/mol	-5.8 kcal/mol

3.2.1.3.2 Analyse der Aziridin-2,3-dicarboxylate

Die Docking-Ergebnisse mit den Derivaten der Leitstrukturen wurden nun hinsichtlich der beiden möglichen Bindungsmodi aus Kap. 3.2.1.3.1 untersucht. Dabei wurden explizit nur Bindungsmodi berücksichtigt, die den Leucin-Rest in der S_1/S_1 -Bindungstasche zeigen. Die Bindungsmodi, in denen der Leucin-Rest und die Boc-Schutzgruppe vertauscht vorliegen, wurden, aufgrund dessen, dass die Boc-Schutzgruppe laut den Ergebnissen der Enzymassays nicht essenziell für die Hemmwirkung ist (siehe Kap. 1.6.3), ignoriert.

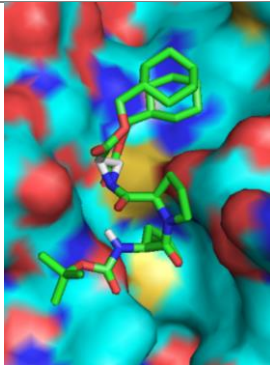
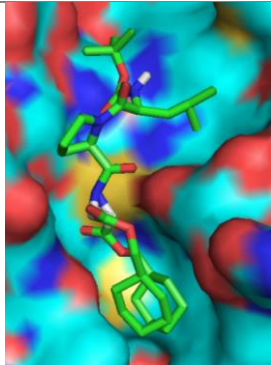
Zuerst wurden die kettenverlängerten Derivate **PF257** und **PF362** untersucht. Auch hier konnten ähnliche Bindungsmodi gefunden werden (Tab. 3.2.1.3.2-1). Als Trend lässt sich erkennen, dass ganz allgemein die Affinität bei Verlängerung der C-Kette zu den Bis(2-Phenylethyl)estern **PF257** steigt, unabhängig vom Bindungsmodus. Bei Verlängerung der C-Kette um eine weitere CH_2 -Gruppe zu den Bis(3-Phenylpropyl)estern **PF362** scheint diese für einen anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus energetisch ungünstiger im Vergleich zu **PF257**, während dies bei einem Substrat-ähnlichen Bindungsmodus nicht der Fall ist.

Tab. 3.2.1.3.2-1: Anti-Substrat- (Typ A) und Substrat-ähnliche (Typ S) Bindungsmodi von **PF257** und **PF362** unter Angabe der niedrigeren Distanz des Cys-Thiolats zum jeweiligen Azi-CH (in Å) und der entsprechenden Affinität (in kcal/mol)

PF257-(R,R)		PF257-(S,S)	
Typ A	Typ S	Typ A	Typ S
			
5.1 Å	4.9 Å	5.4 Å	4.3 Å
-6.7 kcal/mol	-6.9 kcal/mol	-6.3 kcal/mol	-6.8 kcal/mol
PF362-(R,R)		PF362-(S,S)	
Typ A	Typ S	Typ A	Typ S
			
5.2 Å	5.2 Å	6.5 Å	4.7 Å
-5.8 kcal/mol	-6.9 kcal/mol	-5.7 kcal/mol	-6.4 kcal/mol

Bei der Untersuchung des Derivats **PF258** (Tab. 3.2.1.3.2-2), welches anstatt der Phenyl-Reste Cyclohexyl-Reste trägt, zeigt sich ein etwas anderes Bild. Entgegen der Erwartung konnte jeweils einer der möglichen Bindungsmodi nicht gefunden werden. Im Vergleich mit dem Diastereomerenpaar **PF180** lässt sich jedoch ableiten, dass die Cyclohexyl-Reste in der S_1 -Bindungstasche ungünstiger, die Ester in der S_1 -Bindungstasche ähnlich günstig wie die Phenyl-Reste sind.

Tab. 3.2.1.3.2-2: Anti-Substrat- (Typ A) und Substrat-ähnlicher (Typ S) Bindungsmodus von **PF258** unter Angabe der niedrigeren Distanz des Cys-Thiolats zum jeweiligen Azi-CH (in Å) und der entsprechenden Affinität (in kcal/mol). Bei „-“ konnte keine entsprechende Pose im Docking gefunden werden.

PF258-(<i>R,R</i>)		PF258-(<i>S,S</i>)	
Typ A	Typ S	Typ A	Typ S
			
5.0 Å	- Å	- Å	4.6 Å
-5.3 kcal/mol	- kcal/mol	- kcal/mol	-6.8 kcal/mol

Damit lassen die aus dem Docking errechneten Affinitäten für die symmetrischen Derivate folgende Reihe in den Enzymassays erwarten:

- bei Vorliegen eines Substrat-ähnlichen Bindungsmodus:
OBn < OPrPh < OMeCy < OEtPh, und
- bei Vorliegen eines anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus:
OMeCy < OPrPh < OBn ~ OEtPh.

(Legende der Abkürzungen siehe Kap. 12. und Tab. 3.2.1.3.2-3, nächste Seite)

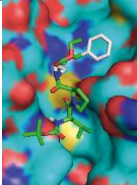
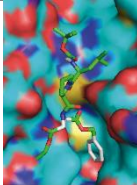
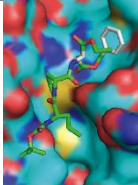
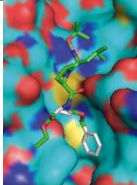
Bei unsymmetrischen Diestern sind prinzipiell vier mögliche Bindungsposen zu unterscheiden: a) anti-Substrat- oder b) Substrat-ähnlich, c) und d) welcher der beiden Ester in die S₁- bzw. S₁'-Tasche dirigiert wird. Da die Liganden als Diastereomere hergestellt wurden, ergeben sich somit insgesamt acht denkbare Bindungsposen. Die unsymmetrischen Derivate der **PF**-Reihe sollten im Folgenden auf die im Docking auftretenden, günstigeren Posen hin untersucht werden. Die Übersicht der gefundenen Dockingposen ist in Tabelle 3.2.1.3.2-3 systematisch zusammengefasst.

Es fällt auf, dass in beiden Bindungsmodi in den energetisch niedriger liegenden, günstigeren Posen jeweils bevorzugt nur einer der beiden beteiligten Ester in die S₁- bzw. S₁'-Bindungstasche dirigiert wird. Dieser ist im direkten Vergleich der energetisch günstigere, und das meist für beide Bindungstaschen. So finden sich z.B. beim Ethyl-Derivat **PF270** nur Bindungsmodi mit dem Phenyl-, nicht aber mit dem Ethyl-Rest in einer der beiden Bindungstaschen. Allerdings wird dies je nach Bindungsmodus durch die im jeweiligen Fall ungünstigere Konfigurationen am Aziridin-Ring insofern erschwert, als der eigentlich bevorzugte Rest nur in einer energetisch ungünstigeren Geometrie in die Bindungstasche dirigiert werden kann. Das ist z.B. beim *tert*-Butyl-Derivat **PF289** im Substrat-ähnlichen Bindungsmodus gut

zu erkennen: Der Benzyl-Rest ist für die S_1 -Bindungstasche eindeutig bevorzugt und passt in der (S,S)-Konfiguration deutlich besser in diese, während der sperrige *tert*-Butyl-Rest in der (R,R)-Konfiguration ein tieferes Eindringen des Benzyl-Rests in die S_1 -Bindungstasche und damit eine bessere Stabilisierung verhindert. In Zahlen schlägt sich dies in einem deutlich höheren Abstand des Cystein-Rests zum näher gelegenen Aziridin-CH und in einer geringeren Affinität nieder. Dies ist für den Substrat-ähnlichen Bindungsmodus bei den Derivaten **PF270**, **PF289**, **PF253** und **PF317** der Fall. Innerhalb einer Konfiguration und eines Bindungsmodus lässt sich, wie z.B. bei **PF253**-(S,S) im Substrat-ähnlichen Bindungsmodus, zudem im direkten Vergleich zweier Posen (und damit zweier Ester) über die berechnete Affinität der für die jeweilige Bindungstasche bevorzugte Ester herausfinden. Hier: OBn < OMeCy.

Insgesamt zeigt sich, dass für einen Substrat-ähnlichen Bindungsmodus die (S,S)-Konfiguration am Aziridin-Ring die energetisch günstigere und damit die im Docking bevorzugte Konfiguration ist. Im Gegensatz dazu ist für den anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus die (R,R)-Konfiguration am Aziridin-Ring die günstigere. Im Vergleich zwischen beiden Bindungsmodi reagiert der anti-Substrat-ähnliche außerdem deutlich weniger sensitiv auf eine Konfigurationsänderung am Aziridin-Ring. Hier zeigen beide Konfigurationen eher sehr ähnliche Affinitäten, z.B. bei **PF272** und **PF317**.

Tab. 3.2.1.3.2-3: Systematische Einteilung und Auflistung der acht denkbaren Bindungsmodi der Derivate **PF270**, **PF289**, **PF253**, **PF272**, **PF317** und **PF294**. Die Einteilung erfolgt nach Konfiguration ((R,R) bzw. (S,S)), Bindungsmodus (anti-Substrat- (Typ A) bzw. Substrat-ähnlich (Typ S)), nach den von den Estern adressierten Bindungstaschen (S_1 - bzw. $S_{1'}$ -) und durch den entsprechenden Rest. Carboxylat-Reste sind als Gruppe oder als Zahl plus Rest angegeben, wobei die Zahl für die Kettenlänge $(CH_2)_x$ steht (z.B. 3Ph = 3-Phenylpropyl bzw. 1Naph = Naphthalin-2-ylmethyl). Angegeben wird die niedrigere Distanz des Cys-Thiolats zum jeweiligen Azi-CH (in Å) und die entsprechende Affinität (in kcal/mol). Bei „-“ konnte keine entsprechende Pose im Docking gefunden werden.

PF270							
(R,R) - Typ A		(R,R) - Typ S		(S,S) - Typ A		(S,S) - Typ S	
$S_{1'}$ - Bn	$S_{1'}$ - Et	S_1 - Bn	S_1 - Et	$S_{1'}$ - Bn	$S_{1'}$ - Et	S_1 - Bn	S_1 - Et
	-		-		-		-
5.2 Å	- Å	5.2 Å	- Å	5.8 Å	- Å	5.9 Å	- Å
-6.3 kcal/mol	- kcal/mol	-6.4 kcal/mol	- kcal/mol	-4.9 kcal/mol	- kcal/mol	-6.8 kcal/mol	- kcal/mol

PF289							
(R,R) - Typ A		(R,R) - Typ S		(S,S) - Typ A		(S,S) - Typ S	
S _{1'} - Bn	S _{1'} - tBu	S ₁ - Bn	S ₁ - tBu	S _{1'} - Bn	S _{1'} - tBu	S ₁ - Bn	S ₁ - tBu
	-		-	-			-
5.3 Å	- Å	5.4 Å	- Å	- Å	6.2 Å	4.2 Å	- Å
-6.5 kcal/mol	- kcal/mol	-5.9 kcal/mol	- kcal/mol	- kcal/mol	-6.1 kcal/mol	-6.9 kcal/mol	- kcal/mol
PF253							
(R,R) - Typ A		(R,R) - Typ S		(S,S) - Typ A		(S,S) - Typ S	
S _{1'} - Bn	S _{1'} - 1Cy	S ₁ - Bn	S ₁ - 1Cy	S _{1'} - Bn	S _{1'} - 1Cy	S ₁ - Bn	S ₁ - 1Cy
	-			-			
4.9 Å	- Å	5.4 Å	4.4 Å	- Å	6.5 Å	4.5 Å	4.5 Å
-5.7 kcal/mol	- kcal/mol	-5.9 kcal/mol	-5.9 kcal/mol	- kcal/mol	-6.1 kcal/mol	-6.1 kcal/mol	-6.7 kcal/mol
PF272							
(R,R) - Typ A		(R,R) - Typ S		(S,S) - Typ A		(S,S) - Typ S	
S _{1'} - Bn	S _{1'} - 2Ph	S ₁ - Bn	S ₁ - 2Ph	S _{1'} - Bn	S _{1'} - 2Ph	S ₁ - Bn	S ₁ - 2Ph
			-	-		-	
5.0 Å	4.9 Å	6.0 Å	- Å	- Å	6.4 Å	- Å	4.3 Å
-6.0 kcal/mol	-6.8 kcal/mol	-6.8 kcal/mol	- kcal/mol	- kcal/mol	-6.6 kcal/mol	- kcal/mol	-7.0 kcal/mol
PF317							
(R,R) - Typ A		(R,R) - Typ S		(S,S) - Typ A		(S,S) - Typ S	
S _{1'} - Bn	S _{1'} - 3Ph	S ₁ - Bn	S ₁ - 3Ph	S _{1'} - Bn	S _{1'} - 3Ph	S ₁ - Bn	S ₁ - 3Ph
		-					
4.7 Å	4.9 Å	- Å	5.5 Å	7.0 Å	7.3 Å	4.0 Å	4.2 Å
-7.2 kcal/mol	-6.9 kcal/mol	- kcal/mol	-6.7 kcal/mol	-6.7 kcal/mol	-7.0 kcal/mol	-7.1 kcal/mol	-7.5 kcal/mol
PF294							
(R,R) - Typ A		(R,R) - Typ S		(S,S) - Typ A		(S,S) - Typ S	
S _{1'} - Bn	S _{1'} - 1Naph	S ₁ - Bn	S ₁ - 1Naph	S _{1'} - Bn	S _{1'} - 1Naph	S ₁ - Bn	S ₁ - 1Naph
-							
- Å	5.1 Å	5.5 Å	5.5 Å	7.2 Å	5.4 Å	4.9 Å	4.3 Å
- kcal/mol	-6.0 kcal/mol	-6.8 kcal/mol	-8.0 kcal/mol	-7.0 kcal/mol	-6.5 kcal/mol	-7.2 kcal/mol	-7.3 kcal/mol

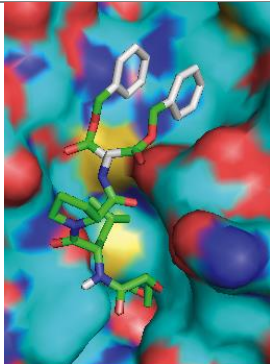
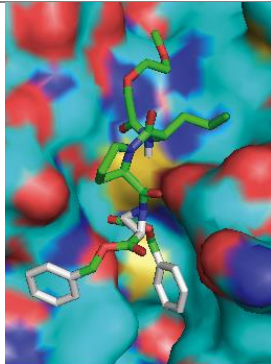
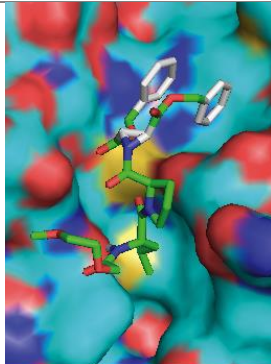
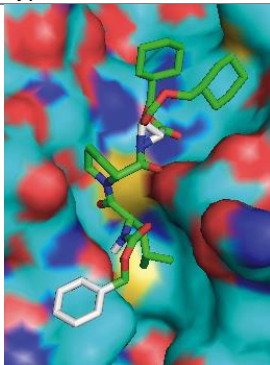
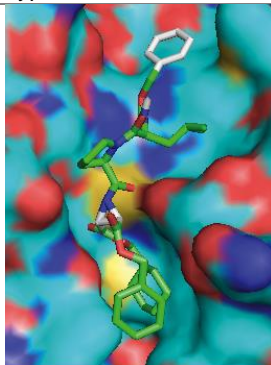
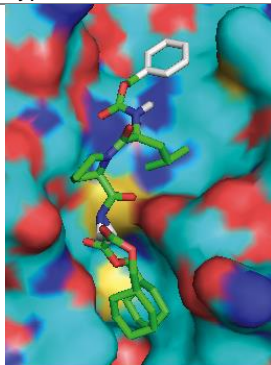
Da in beiden Bindungsmodi meist ein Ester der bevorzugte für die Bindung an das Enzym ist, lassen sich für die Ergebnisse der Enzymtests aus den aus dem Docking errechneten Affinitäten folgende Reihen erwarten:

- bei Vorliegen eines Substrat-ähnlichen Bindungsmodus:
OEt, O^tBu, OMeCy < OBn < OEtPh, OPrPh, OMeNaph, und
- bei Vorliegen eines anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus:
OEt, O^tBu, OMeCy, OPrPh, OMeNaph < OBn < OEtPh.

Findet sich in den Ergebnissen der Enzymtests an Cruzain z.B. eine stetige Verbesserung der Hemmung bei Verlängerung der C-Kette, spricht das folglich für einen Substrat-ähnlichen Bindungsmodus.

Bei den Derivaten mit veränderter Schutzgruppe **PF381** (GlycAc) und **PF284** (Cbz) sind, im Vergleich mit ihren Analoga mit Boc-Schutzgruppe, aufgrund der veränderten Lipophilie niedrigere (GlycAc, hydrophiler) bzw. höhere (Cbz, lipophiler) Affinitäten zu erwarten. Diese resultieren aus den tendenziell schlechteren bzw. besseren Wechselwirkungen mit den eher hydrophoben Aminosäureresten. Im Docking zeigen sich zumindest für **PF284** die gleichen Befunde wie zuvor (Tab. 3.2.1.3.2-4). Die bevorzugte Konfiguration ist (*S,S*) für den Substrat-ähnlichen, (*R,R*) für den anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus. Von den berechneten absoluten Affinitäten ist der Substrat-ähnliche dem anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus auch bei diesem Vergleich überlegen.

Tab. 3.2.1.3.2-4: Anti-Substrat- (Typ A) und Substrat-ähnliche (Typ S) Bindungsmodi der Derivate **PF381** und **PF284** unter Angabe der niedrigeren Distanz des Cys-Thiolats zum jeweiligen Azi-CH (in Å) und der entsprechenden Affinität (in kcal/mol). Bei „-“ konnte keine entsprechende Pose im Docking gefunden werden.

PF381-(R,R)		PF381-(S,S)	
Typ A	Typ S	Typ A	Typ S
			-
5.1 Å	4.7 Å	6.2 Å	- Å
-5.7 kcal/mol	-5.8 kcal/mol	-6.5 kcal/mol	- kcal/mol
PF284-(R,R)		PF284-(S,S)	
Typ A	Typ S	Typ A	Typ S
		-	
5.4 Å	5.1 Å	- Å	4.4 Å
-6.0 kcal/mol	-6.8 kcal/mol	- kcal/mol	-7.5 kcal/mol

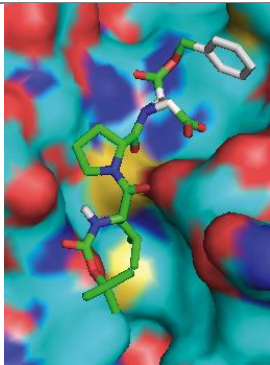
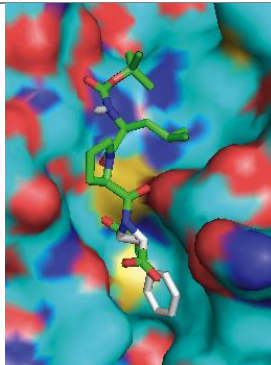
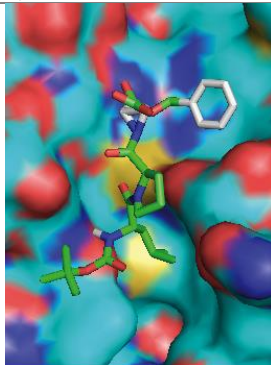
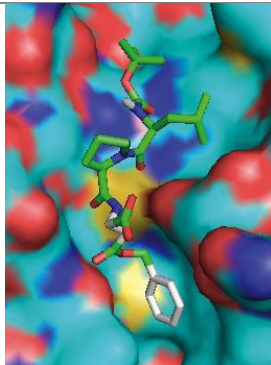
Das Derivat **PF381** (GlycAc-Schutzgruppe) wurde als besser wasserlösliches Derivat von **RV122C/CS09** dargestellt. Die berechnete niedrigere Affinität im Docking sollte sich daher in Relation zur erhöhten Löslichkeit im Enzymassay nicht wirklich auswirken. Anders sieht es für **PF284** für einen Substrat-ähnlichen Bindungsmodus aus. Hier scheint durch das Einführen der Cbz-Schutzgruppe das Erreichen der S₂-Bindungstasche mit dem Phenyl-Rest der Cbz-Gruppe möglich. Dies sollte sich, wie bei den Liganden **OPT** und **CLIK-148** (siehe Kap. 3.2.1.2) positiv auf die Affinität auswirken. Im Vergleich zwischen **PF258** (Boc-Schutzgruppe) und **PF284** (Cbz-Schutzgruppe) sollte für diesen Fall das Derivat mit Cbz-Schutzgruppe die niedrigeren Hemmkonstanten zeigen.

3.2.1.3.3 Analyse der 3-Carbonylaziridin-2-carbonsäuren (Halbester)

Nach den Aziridin-2,3-dicarboxylaten sollten die 3-Carbonylaziridin-2-carbonsäuren analysiert werden. Da die freie Carboxy-Funktion zur Verbesserung der Affinität durch ionische Wechselwirkung mit dem positiv geladenen Imidazolium-Kation des Histidin-Restes im katalytischen Zentrum eingeführt wurde, wird für die günstigen Dockingposen ein geringer Abstand zwischen diesen beiden Ladungsträgern erwartet. Für eine erste Untersuchung wurde das 3-Benzoyloxycarbonylaziridin-2-carbonsäure-Derivat von **RV122C/CS09 trans-Bn-H** (Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OH)) gewählt. Im Gegensatz zu den synthetisch realisierten Derivaten mit anderen Estern, weist **trans-Bn-H** als Halbester nur eine Veränderung in der Struktur im Vergleich zum Diester auf.

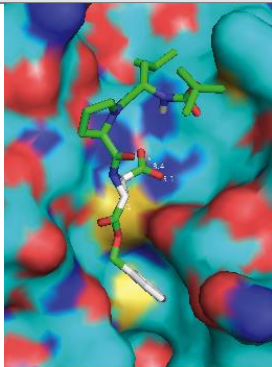
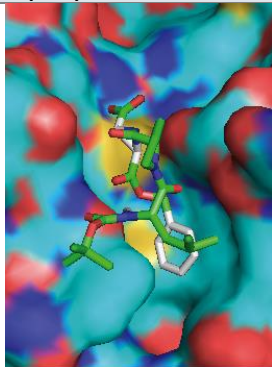
Im Docking zeigt sich auch für diesen Halbester ein bekanntes Bild. Die Leucin- bzw. Benzyl-Reste werden in die S_1 - bzw. S_1' -Bindungstaschen dirigiert (Tab. 3.2.1.3.3-1). Allerdings kann weder für die (S,S)- noch für die (R,R)-Konfiguration, weder für den Substrat-ähnlichen noch für den anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus, eine Dockingpose mit geringem Abstand zwischen der Carboxy-Funktion und dem Imidazolium-Ring des Histidins gefunden werden.

Tab. 3.2.1.3.3-1: Anti-Substrat- (Typ A) und Substrat-ähnliche (Typ S) Bindungsmodi von **trans-Bn-H** unter Angabe der niedrigeren Distanz des Cys-Thiolats zum jeweiligen Azi-CH, der niedrigeren Distanz der Carboxy-Funktion zum protonierten Imidazol des Histidins (Abstand der Schweratome in Å) und der entsprechenden Affinität (in kcal/mol)

trans-Bn-H-(R,R)		trans-Bn-H-(S,S)	
Typ A	Typ S	Typ A	Typ S
			
Cys ⁻ 5.3 Å – His ⁺ 6.6 Å -5.3 kcal/mol	Cys ⁻ 5.5 Å – His ⁺ 9.9 Å -6.7 kcal/mol	Cys ⁻ 5.7 Å – His ⁺ 8.6 Å -6.7 kcal/mol	Cys ⁻ 4.9 Å – His ⁺ 8.3 Å -6.9 kcal/mol

Bindungsmodi, die einen geringen Abstand der Carbonsäure zum Histidin-Rest und gleichzeitig einen geringen Abstand zwischen Cys-Thiolat und den Azi-CHs aufweisen, sind zu finden, allerdings mit ganz anderen Geometrien und Ausrichtungen im Enzym (Tab. 3.2.1.3.3-2). Die zugehörigen Affinitäten sind tendenziell geringer als die Affinitäten der Bindungsmodi ohne geringen Abstand der Carboxy-Funktion zum Histidin. Bei Vorliegen dieser ionischen Wechselwirkung ist folglich keine energetisch vergleichbar günstige Bindungspose möglich. Dies zeigt sich schließlich in den deutlich abweichenden Geometrien und Ausrichtungen im Enzym.

Tab. 3.2.1.3.3-2: Bindungsmodi von **trans-Bn-H** mit geringen Abständen zum Cystein und Histidin (Abstand der Schweratome in Å) und der entsprechenden Affinität (in kcal/mol)

trans-Bn-H-(R,R)	
	
Cys ⁻ 4.1 Å – His ⁺ 3.1 Å	Cys ⁻ 4.1 Å – His ⁺ 5.5 Å
-6.1 kcal/mol	-6.3 kcal/mol

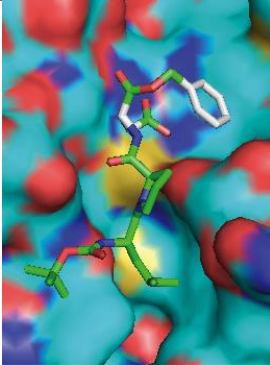
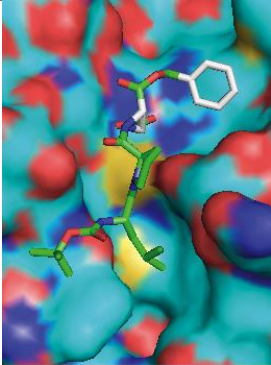
Auch wenn durch die ionische Wechselwirkung die Inhibitoren nicht direkt in die richtige Position für den nucleophilen Angriff „gezogen“ werden, heißt das nicht, dass keine Hemmung zu erwarten wäre. Die Affinität zum katalytischen Zentrum und damit die Ausbildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes sollten auf jeden Fall verbessert werden und sich in kleineren K_i -Werten (siehe Kap. 4.1.3) zeigen. Für den zweiten Schritt des nucleophilen Angriffs muss dann diese ionische Bindung wieder gelöst werden, was sich in einer geringeren Reaktionsgeschwindigkeit für den nucleophilen Angriff und damit kleineren k_i -Werten (siehe Kap. 4.1.3, Enzymkinetik der irreversiblen Hemmung) niederschlagen sollte.

Für den Substrat-ähnlichen Bindungsmodus zeigen die Rechnungen, dass eine Änderung der Konfiguration am Aziridin-Ring zu keiner Verbesserung führen kann, wenn man nur die Distanz zwischen den Substituenten am Aziridin-Ring und dem Imidazol-Ring des Histidins heranzieht. Dagegen sollte es bei Vorliegen eines anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus durch Änderung von der *trans*- zur *cis*-Konfiguration am Aziridin-Ring, möglich sein, mit beiden Resten die sehr große S_1 -Bindungstasche zu erreichen.

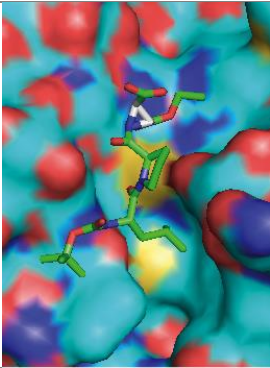

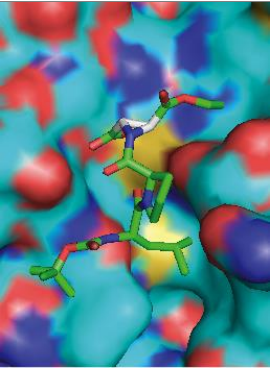
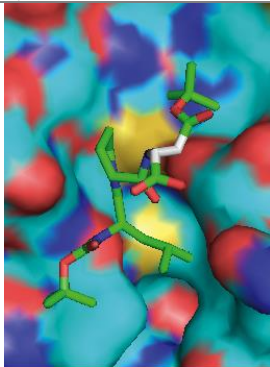
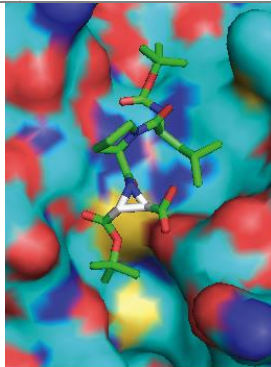
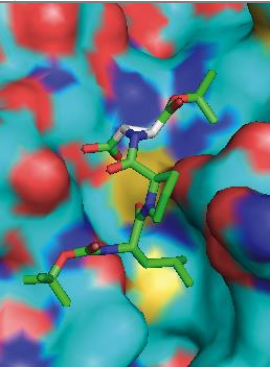
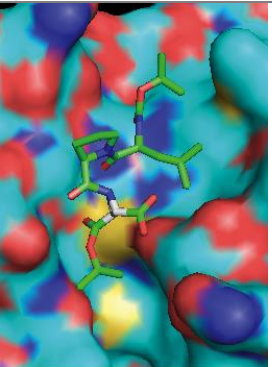
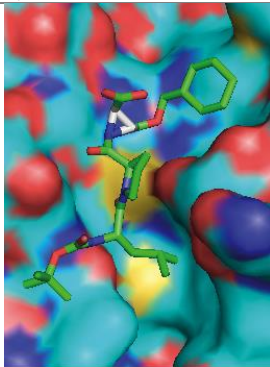
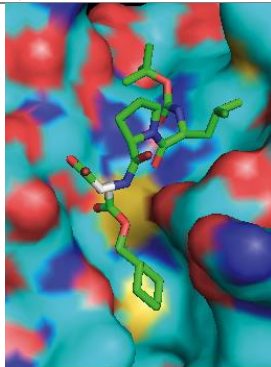
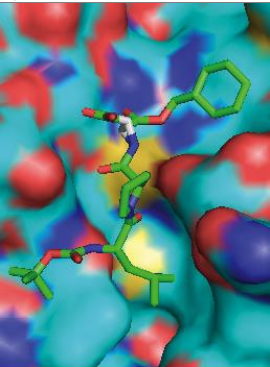
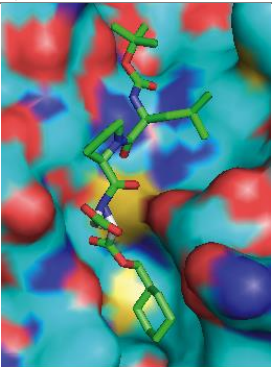
Für die entsprechenden *cis*-konfigurierten Liganden ***cis*-Bn-H** (Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*S,R*)+(*R,S*)-Azi(OBn)(OH)) zeigen die Rechnungen, dass durch die Konfigurationsänderung nur anti-Substrat-ähnliche Bindungsmodi auftreten. Darunter finden sich zwei Bindungsmodi, je einer für jedes Diastereomer, die alle drei Voraussetzungen erfüllen: einen anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus, geringe Abstände zwischen Cystein und Azi-CH sowie gleichzeitig einen geringen Abstand zwischen Carboxy-Funktion und Histidinium-Rest (Tab. 3.2.1.3.3-3). Im Vergleich beider Bindungsmodi der *cis*-Halbester aus Tab. 3.2.1.3.3-3 mit den *trans*-Halbestern aus Tab. 3.2.1.3.3-1 sind die *cis*-Halbester den *trans*-Halbestern von der berechneten Affinität her unterlegen. Trotzdem stellt sich die Frage ob – ein anti-Substrat-ähnlicher Bindungsmodus vorausgesetzt – *cis*-Halbester in Enzymassays den *trans*-Halbestern nicht überlegen sein sollten. Zumindest scheint ein Lösen der ionischen Bindung bei den *cis*-Halbestern für anti-Substrat-ähnliche Bindungsmodi nicht nötig, was sich positiv auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_i auswirken sollte.

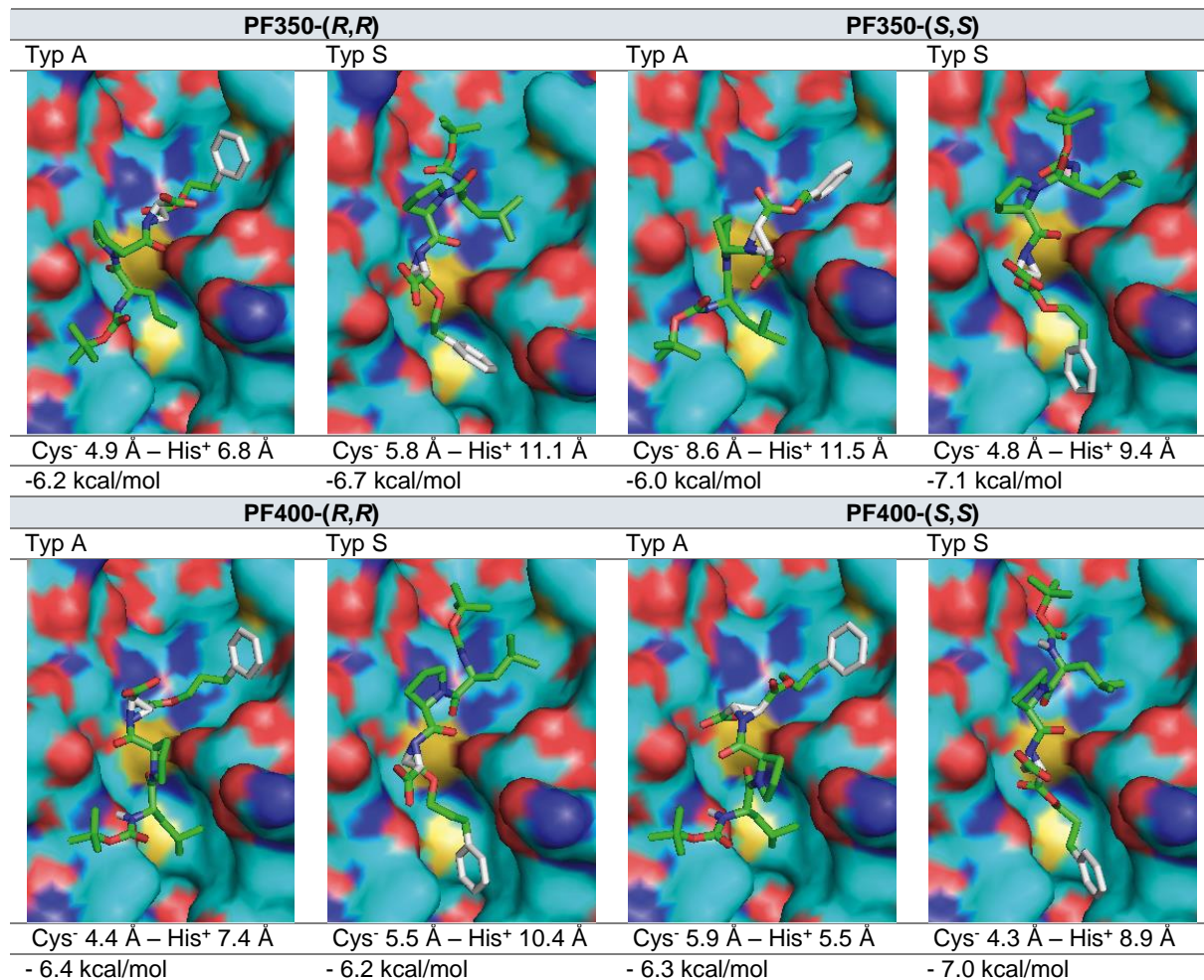
Für die synthetisierten *trans*-konfigurierten 3-Carbonylaziridin-2-carbonsäure-Derivate ergibt sich laut den Rechnungen das gleiche Bild wie für den Halbester ***trans*-Bn-H** beschrieben. Da aber, wie bei den symmetrischen Diestern, nur ein Ester an der Bindung zum Enzym beteiligt ist, lässt sich in Anlehnung an die symmetrischen Liganden erwarten, dass die Ethyl-, *tert*-Butyl- und Cyclohexylmethyl-Derivate eine geringere Hemmung als die 2-Phenylethyl- und 3-Phenylpropyl-Derivate zeigen sollten. Im Docking zeigen sich, von **PF382** abgesehen, die bereits mehrfach beschriebenen Trends (Tab. 3.2.1.3.3-4). Bei **PF382** hingegen scheint der *tert*-Butyl-Rest sterisch so anspruchsvoll, dass sich die Trends umkehren. Bei diesem Derivat ist die (*S,S*)-Konfiguration nun für den anti-Substrat-ähnlichen, die (*R,R*)-Konfiguration für den Substrat-ähnlichen Bindungsmodus die günstigere.

Tab. 3.2.1.3.3-3: anti-Substrat-ähnliche Bindungsmodi von ***cis*-Bn-H** mit geringen Abständen zum Cystein und Histidin (Abstand der Schweratome in Å) und der entsprechenden Affinität (in kcal/mol)

<i>cis</i>-Bn-H	
<i>cis</i>-(<i>R</i>)-Bn-(<i>S</i>)-H	<i>cis</i>-(<i>S</i>)-Bn-(<i>R</i>)-H
	
Cys ⁻ 4.1 Å – His ⁺ 3.3 Å -6.2 kcal/mol	Cys ⁻ 4.9 Å – His ⁺ 3.1 Å -6.2 kcal/mol

Tab. 3.2.1.3.3-4: Anti-Substrat- (Typ A) und Substrat-ähnliche (Typ S) Bindungsmodi der Derivate **PF349**, **PF382**, **PF345**, **PF350** und **PF400** unter Angabe der niedrigeren Distanz des Cys-Thiolats zum jeweiligen Azi-CH, der niedrigeren Distanz der Carboxy-Funktion zum protonierten Imidazol des Histidins (Abstand der Schweratome in Å) und der entsprechenden Affinität (in kcal/mol). Bei „-“ konnte keine entsprechende Pose im Docking gefunden werden.

PF349-(R,R)		PF349-(S,S)	
Typ A	Typ S	Typ A	Typ S
			
Cys ⁻ 4.5 Å – His ⁺ 7.2 Å -5.7 kcal/mol	Cys ⁻ - Å – His ⁺ - Å - kcal/mol	Cys ⁻ 5.7 Å – His ⁺ 5.6 Å -5.3 kcal/mol	Cys ⁻ 4.2 Å – His ⁺ 8.6 Å -5.5 kcal/mol
PF382-(R,R)		PF382-(S,S)	
Typ A	Typ S	Typ A	Typ S
			
Cys ⁻ 7.7 Å – His ⁺ 9.7 Å -5.0 kcal/mol	Cys ⁻ 5.8 Å – His ⁺ 7.5 Å -5.5 kcal/mol	Cys ⁻ 5.5 Å – His ⁺ 5.9 Å -5.8 kcal/mol	Cys ⁻ 4.7 Å – His ⁺ 7.0 Å -5.0 kcal/mol
PF345-(R,R)		PF345-(S,S)	
Typ A 152C	Typ S	Typ A	Typ S
			
Cys ⁻ 4.6 Å – His ⁺ 7.1 Å -6.3 kcal/mol	Cys ⁻ 4.9 Å – His ⁺ 9.4 Å -5.9 kcal/mol	Cys ⁻ 4.4 Å – His ⁺ 8.7 Å -5.9 kcal/mol	Cys ⁻ 4.3 Å – His ⁺ 8.8 Å -6.8 kcal/mol



Die aus dem Docking errechneten Affinitäten lassen für die Ergebnisse der Enzymtests folgende Reihen erwarten:

- bei Vorliegen eines Substrat-ähnlichen Bindungsmodus:
OtBu < OEt < OMeCy < OPrPh < OEtPh, und
- bei Vorliegen eines anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus:
OtBu < OEt < OMeCy ~ OEtPh < OPrPh.

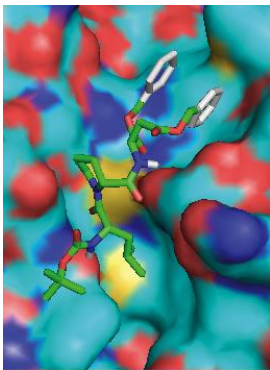
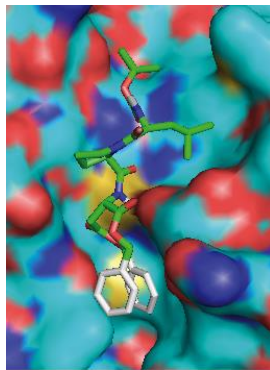
Zuletzt wurde das offenkettige Analogon **PF128** mittels Docking untersucht (Tab. 3.2.1.3.3-5). **PF128** besitzt dabei mit der Struktur (Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S)-Asp(OBn)₂ mehr Ähnlichkeit zur (S,S)-konfigurierten Leitstruktur **RV122C** als zu **CS09**. Da **PF128** aber eine deutlich erhöhte Flexibilität aufweist, sollten die Unterschiede in den Affinitäten zwischen dem offenkettigen Derivat und den beiden Diastereomeren geringer ausfallen als bei den unflexiblen *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten.

Im Vergleich mit den Leitstrukturen lässt

sich aufgrund der berechneten Affinität für den Substrat-ähnlichen Bindungsmodus folgern, dass **PF128** im Vergleich mit **RV122C** eine deutlich bessere Hemmung zeigen sollte. Sollte ein anti-Substrat-ähnlicher Bindungsmodus vorliegen, ist eine geringere Hemmung zu erwarten. Grund hierfür ist die Spannung im Aziridin-Ring und die damit eingehende geometrische Veränderung. Im anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus ermöglicht die pyramidale Struktur des Aziridins ein besseres Einpassen in den *active site cleft*, was für das planare Amid nicht möglich ist. Im Substrat-ähnlichen Bindungsmodus verhält sich dies genau umgekehrt. Hier erscheint die pyramidale Struktur im Vergleich eher hinderlich für eine gute Passform.

Voraussetzung für die Vorhersage der zu erwartenden Aktivität der offenkettigen Verbindung in den Enzymassays ist jedoch, dass der Aziridin-*warhead* wider Erwarten nicht essenziell für die Hemmwirkung ist. Für die Enzymassays wird daher für **PF128** keine Aktivität erwartet, was ein weiteres Indiz für den postulierten nucleophilen Angriff des Cys-Thiolats an 2- bzw. 3-Position des Aziridin-2,3-dicarboxylat wäre (siehe auch Kap. 1.6.1 und 1.6.3).

Tab. 3.2.1.3.3-5: Anti-Substrat- (Typ A) und Substrat-ähnlicher (Typ S) Bindungsmodus des offenkettigen Derivats **PF128** mit Abstand zw. Cys-Thiolats und C_αHN des (S)-Asp (in Å) und der entsprechenden Affinität (in kcal/mol)

PF128	
Typ A	Typ S
	
Cys- 6.1 Å -5.8 kcal/mol	Cys- 5.0 Å -6.7 kcal/mol

3.2.1.3.4 Zusammenfassung der Docking-Ergebnisse der beiden möglichen Bindungsmodi

Betrachtet man für beide Bindungsmodi nur die jeweilig bevorzugte Konfiguration lassen sich die Ergebnisse, unter Angabe der berechneten Affinitäten und Trends (symbolisiert durch Pfeile), wie folgt grafisch zusammenfassen (Abb. 3.2.1.3.4-1).

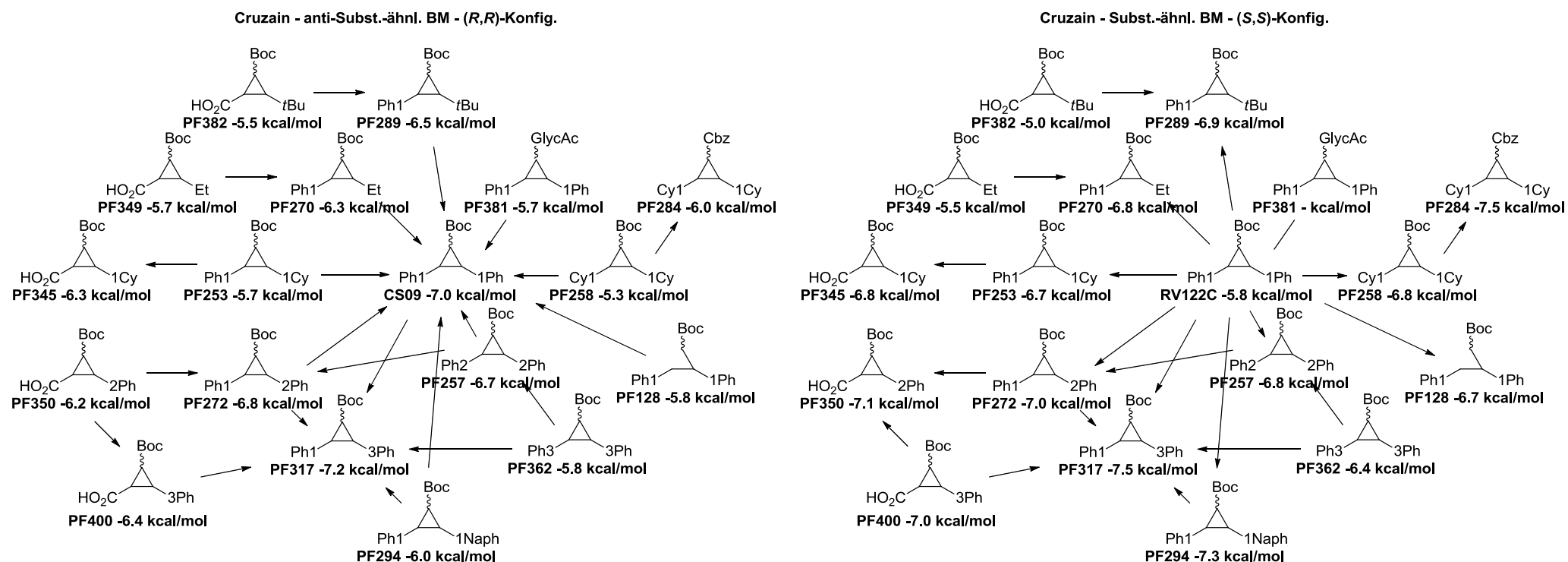


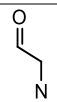
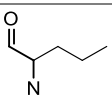
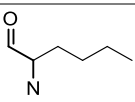
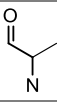
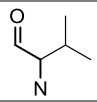
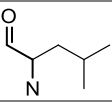
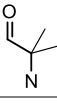
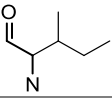
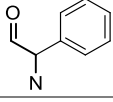
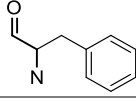
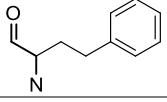
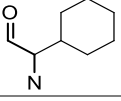
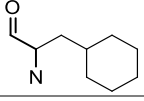
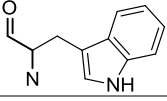
Abb. 3.2.1.3.4-1: Vergleich der Ergebnisse des anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus (BM) an Cruzain für Verbindungen mit (R,R)-Konfiguration (links) mit den Ergebnissen des Substrat-ähnlichen Bindungsmodus für Verbindungen mit (S,S)-Konfiguration (rechts) am Aziridin (bzw. (S)-Asp bei **PF128**) mit Angabe der berechneten Affinitäten (in kcal/mol, bei „-“ konnte keine entsprechende Pose im Docking gefunden werden). Neben der Schutzgruppe in üblicher Abkürzung wird das Dipeptid als Wellenlinie und das Aziridin-2,3-dicarboxylat als Dreieck angegeben (Ausnahme: offenkettiges (S)-Asp bei **PF128**). Die Reste in 2- und 3-Position sind als Gruppe oder als Zahl plus Rest angegeben, wobei die Zahl für die Kettenlänge (CH₂)_x steht (z.B. 3Ph = 3-Phenylpropyl bzw. 1Naph = Naphthalin-2-ylmethyl). Die Pfeile markieren Trends und deuten jeweils eine Verbesserung der Ergebnisse durch die Strukturvariation an (z.B. **PF257** mit geringerer Affinität als **CS09** für einen anti-Substrat-ähnlichen, links, bzw. mit größerer Affinität für einen Substrat-ähnlichen Bindungsmodus, rechts).

Es fällt auf, dass für den Substrat-ähnlichen Bindungsmodus jede Veränderung von **RV122C** (bis auf **PF381**) eine Verbesserung darstellt. Liegt dagegen ein anti-Substrat-ähnlicher Bindungsmodus vor, sollte es mit **PF317** nur ein Derivat geben, welches Cruzain besser inhibiert als **CS09**. Im Vergleich beider Bindungsmodi sind besonders **PF253**, **PF284** und **PF294** hervorzuheben. Hier unterscheiden sich die jeweils berechneten Affinitäten sehr deutlich. Grund hierfür sind bei den Aziridin-2,3-dicarboxylat-Derivaten die, je nach Ausrichtung im Enzym, unterschiedlichen Wechselwirkungen der Reste (Naphthalin-2-ylmethyl- bzw. Cyclohexylmethylester mit der S_1 - oder S_1' -Bindungstasche, Cbz-Schutzgruppe mit der Enzymoberfläche oder S_2 -Bindungstasche) und damit sehr stark unterschiedliche Stabilisierung in einem Substrat-ähnlichen bzw. Destabilisierung in einem anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus. Die genannten drei Derivate eignen sich somit als K.O.-Kandidaten für eine Unterscheidung zwischen den beiden Bindungsmodi.

3.2.1.4 Analyse der Enzymassaytrends der **CS**-Reihe mittels AutoDock Vina

Die **CS**-Reihe⁹⁸ baut auf der in Kap. 1.6.4 beschriebenen Substanzbibliothek auf, die das Ziel hatte, Konstitutionsisomere von **RV122C** durch Austausch von Leucin und Prolin sowie Stereoisomere durch die Variation der (*S,S*)- zur (*R,R*)-Konfiguration am Aziridin-Ring zu erzeugen. In der erweiterten Bibliothek sollte u.a. der offenkettige Aminosäure-Rest des (*S*)-Leucins variiert werden. Die folgende Tabelle 3.2.1.4-1 listet einen Ausschnitt dieser Variationen systematisch auf. Alle gezeigten Derivate zeigen keine Aktivität gegenüber Cruzain, wobei **CS27**, **CS31**, **CS32** und **CS33** darüber hinaus selektiv innerhalb der Cathepsin-L-ähnlichen Proteasen der Papain-Familie gegenüber LmCPB2.8 sind.

Tab. 3.2.1.4-1: Ausschnitt der erweiterten **CS**-Reihe⁹⁸. Variation des (S)-Leucins mit anderen offenkettigen (S)-konfigurierten Aminosäuren (Caa) mit K_i -Werten der Enzymassays an LmCPB2.8 in μM – ni = no inhibition – Allg. Struktur: Boc-(S)-Caa-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn)₂

Caa	Struktur	K_i	Caa	Struktur	K_i	Caa	Struktur	K_i	Caa	Struktur	K_i
Gly		ni				Nva		ni	Nle		2.8
	CS20						CS26			CS27*	
Ala		25.4	Val		4.3	Leu		3.8			
	CS23			CS24			CS09				
Aib		ni				Ile		ni			
	CS22						CS25				
			Phg		10.3	Phe		1.7	hPhe		1.5
				CS30			CS31*			CS32*	
			Chg		ni	Cha		ni	Trp		2.7
				CS28			CS29			CS33*	

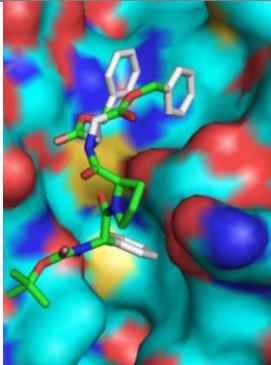
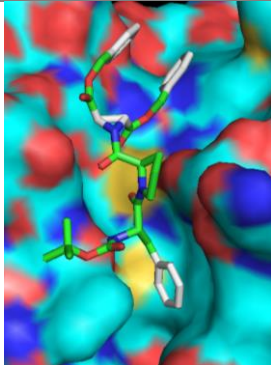
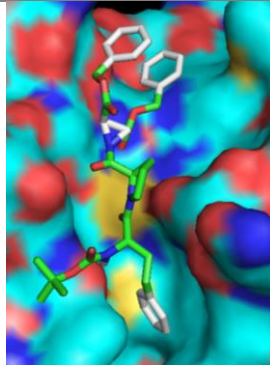
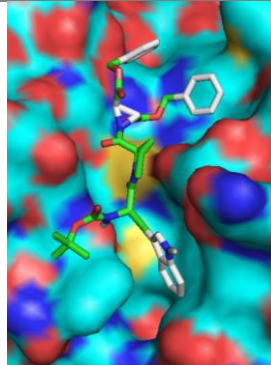
* Verbindung ist selektiv innerhalb der Cathepsin-L-ähnlichen Proteasen der Papain-Familie gegenüber LmCPB2.8

Auffällig ist, dass sterisch anspruchsvolle, aromatische Reste anstelle des Leucins die Affinität und Selektivität zum Enzym LmCPB2.8 verbessern. Kleine und gesättigte Reste hingegen zeigen keine Hemmung. Die Reihe **CS30** (Phenylglycine), **CS31** (Phenylalanine), **CS32** (homo-Phenylalanine) und **CS33** (Tryptophan) zeigt dies sehr anschaulich und sollte im Docking im Vergleich mit **CS28** (Cyclohexylglycine) und **CS29** (Cyclohexylalanine) weiter untersucht werden.

Die fünf Liganden haben alle die allg. Struktur Boc-(S)-Caa-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn)₂ gemeinsam, so dass nur je ein Ligand aufgebaut werden musste. Der Aufbau und das Docking in Cruzain erfolgten analog, wie in Kap. 3.2.1.3.1 beschrieben.

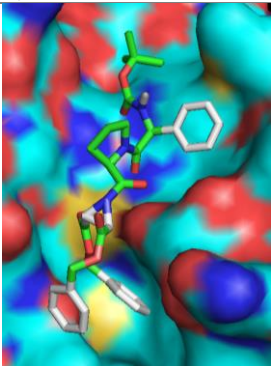
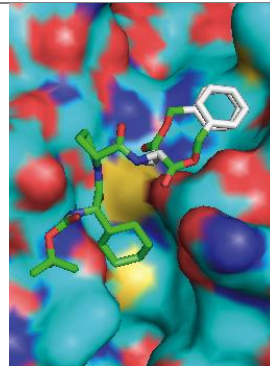
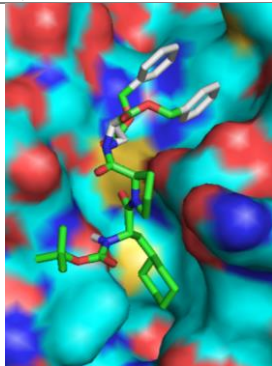
Bei der Auswertung der Dockingrechnungen kann ein eindeutiger Trend festgestellt werden. Zum einen finden sich unter den besten Dockingposen, mit einer Ausnahme für **CS30**, nur anti-Substrat-ähnliche Bindungsmodi. Zum anderen passen die Affinitäten und Abstände gut zum Trend der Enzymassays. Es ist offensichtlich, dass die – im Vergleich mit Leucin – immer anspruchsvoller werdenden aromatischen Reste die S₁- und S₂-Bindungstasche bis zum homo-Phenylalanin-Derivat **CS32** immer besser erreichen und ausfüllen können, was auch auf das Tryptophan-Derivat **CS33** zutrifft (Tab. 3.2.1.4-2).

Tab. 3.2.1.4-2: Anti-Substrat-ähnliche Bindungsposen von **CS30**, **CS31**, **CS32** und **CS33** unter Angabe der niedrigeren Distanz des Cys-Thiolats zum jeweiligen Azi- $\underline{\text{C}}\text{H}$ (in Å), der entsprechenden Affinität (in kcal/mol) und den K_i -Werten (in μm) der Enzymassays an LmCPB2.8

CS30	CS31	CS32	CS33
			
5.7 Å	5.0 Å	5.3 Å	4.7 Å
-6.8 kcal/mol	-7.1 kcal/mol	-6.9 kcal/mol	-7.7 kcal/mol
$K_i = 10.3 \mu\text{m}$	$K_i = 1.7 \mu\text{m}$	$K_i = 1.5 \mu\text{m}$	$K_i = 2.7 \mu\text{m}$

Entgegen der Erwartung, dass bei einem Substrat-ähnlichen Bindungsmodus die aromatischen Reste anstelle des Leucin-Rests in die S_1 -Tasche dirigiert werden, scheint dies nur für das Phenylglycin-Derivat **CS30** geometrisch möglich und laut Docking energetisch günstig (Tab. 3.2.1.4-3, links). Für die Cyclohexylglycin- (**CS28**) und Cyclohexylalanin-Derivate (**CS29**) werden allerdings auch für die S_1 -Bindungstasche ähnliche und vergleichbar günstige Dockingposen, gefunden (Tab. 3.2.1.4-3, Mitte bzw. rechts).

Tab. 3.2.1.4-3: Substrat-ähnliche Bindungspose von **CS30** und anti-Substrat-ähnliche Bindungsposen von **CS28** und **CS29** unter Angabe der niedrigeren Distanz des Cys-Thiolats zum jeweiligen Azi- $\underline{\text{C}}\text{H}$ (in Å) und der entsprechenden Affinität (in kcal/mol)

CS30	CS28	CS29
Typ S	Typ A	Typ A
		
5.8 Å	6.5 Å	4.9 Å
-6.7 kcal/mol	-5.0 kcal/mol	-7.2 kcal/mol
$K_i = 10.3 \mu\text{m}$	$K_i = \text{ni}$	$K_i = \text{ni}$

Eine Erklärung dafür, dass die Derivate mit den Cyclohexyl-Resten im Vergleich mit den Derivaten mit den Phenyl-Resten keine inhibitorische Wirkung zeigen, kann das Docking in Au-

toDock Vina nicht liefern. Die Gründe hierfür können in den diversen eingegangenen Vereinfachungen für ein schnelles Docking, aber auch in den Unterschieden zwischen dem für das Docking benutzten Cruzain als Homologiemodell und dem im Enzymassay verwendeten Enzym LmCPB2.8 liegen (Unterschiede in der Sequenz siehe Tab. 3.2.1.4-4).

Tab. 3.2.1.4-4: Aminosäurereste der katalytischen Triade, der S- und S'-*subsites* für Cruzain und *L. mexicana* CPB nach Juliano *et al.*⁷⁸ – Unterschiede sind **fett** hervorgehoben – Die Aminosäuren sind im Einbuchstaben-code angegeben: A (Alanin), C (Cystein), E (Glutaminsäure), G (Glycin), H (Histidin), L (Leucin), M (Methionin), N (Asparagin), Q (Glutamin), S (Serin), V (Valin), W (Tryptan), Y (Tyrosin)

Protease	S ₂ subsite	S ₁ subsite	Katalytische Triade	S ₁ ' subsite
Cruzain	N69, E208, S210	L67, M68, A138, G163	C25, H162, N182	Q19, W177
<i>L. mexicana</i> CPB	L69, Y209, V211	L67, M68, A139, G164	C25, H163, N183	Q19, W185

Es bleibt festzuhalten, dass eine Verlängerung der C-Kette über den sterischen Anspruch von Leucin bzw. Phenylglycin hinaus die Selektivität gegenüber LmCPB2.8 erhöht. Dies trifft für Norleucin sowie für Phenylalanin, homo-Phenylalanin und Tryptophan zu. Für einen anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus würde dies bedeuten, dass LmCPB2.8 im Vergleich zu den ebenfalls getesteten⁹⁸ Papain-ähnlichen Cysteinproteasen Cathepsin-L, Cruzain, Falcipain-2, und Rhodesain eine tiefere S₂-Bindungstasche aufweist.

Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der in LmCPB2.8 im Vergleich zu Cruzain abweichenden Sequenz innerhalb der S₂-*subsite* (Tab. 3.2.1.4-4). LmCPB2.8 zeigt mit Leucin, Tyrosin und Valin lipophile und aromatische Reste, die gut den jeweiligen aromatischen Rest der **CS**-Derivate stabilisieren können. Im Vergleich dazu befinden sich in Cruzain mit Asparagin, Glutaminsäure und Serin hydrophile Reste, die an dieser Stelle in der Kristallstruktur 1ME4⁶⁶ zwei Wassermoleküle koordinieren (Abb. 3.2.1.4-5). In LmCPB2.8 scheinen Wassermoleküle an dieser Stelle im Vergleich offensichtlich leichter zu

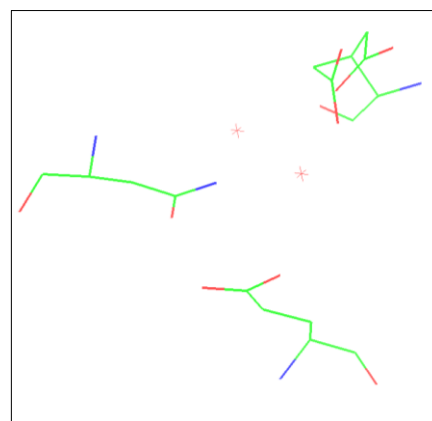


Abb. 3.2.1.4-5: Ausschnitt aus Cruzain (1ME4⁶⁶), Asp-69, Glu-208 und Ser-210 koordinieren zwei Wassermoleküle in der S₂-Bindungstasche

verdrängen zu sein, wodurch die S₂-Bindungstasche zwar nicht unbedingt tiefer ist, aber mit geringerem energetischen Aufwand sterisch anspruchsvollere Reste aufnehmen kann. Dies passt dazu, dass für CPB2.8ΔCTE bekannt ist, dass hydrophobe Reste die Substratspezifität bestimmen (siehe auch Kap. 1.5.4).⁷⁷

3.2.1.5 Neuinterpretation der Dockingergebnisse und Optimierungen für einen anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus

Nach Analyse der **CS**-Reihe scheint es noch wahrscheinlicher, dass die in der vorliegenden Arbeit behandelte Inhibitor-Klasse im Enzym LmCPB2.8, oder zumindest in Cruzain, eher einen anti-Substrat- als einen Substrat-ähnlichen Bindungsmodus aufweist.

Als Indizien lassen sich folgende Punkte zusammenfassen:

- Die geringe Empfindlichkeit bezüglich der Konfiguration am Aziridin-Ring. Diese zeigte sich im Docking (Kap. 3.2.1.3.2) und passt zu den sehr ähnlichen Hemmdaten von **RV122C** und **CS09** und der ersten **CS**-Bibliothek¹⁰² (Kap. 1.6.4).
- Der in Kap. 3.2.1.4 beschriebene Trend der Phg – Phe – hPhe -Reihe im Docking, der nur zum anti-Substrat-, nicht aber zum Substrat-ähnlichen Bindungsmodus passt.
- Bei **E-64c** als Breitband-Cysteinprotease-Inhibitor wird der Leucin-Rest in die S_2 -Bindungstasche dirigiert. **CLIK-148** z.B. zeigt durch den Phe-Rest in der S_2 -Bindungstasche eine verbesserte Selektivität hin zu Cathepsin-L-ähnlichen Cysteinproteasen. Etwas Vergleichbares stellt die Veränderung von **CS09** (Leucin) zu **CS31** (Phenylalanin) dar. Im Vergleich der **CS**-Derivate mit **CLIK-148** tragen diese mit den Benzylestern nur keinen 2-(2-Pyridin)-ethylamin-Rest, um die S' -*subsite* bzw. S_2 -Bindungstasche der Cathepsin-L-ähnlichen Cysteinproteasen zu adressieren und so Selektivität innerhalb der Cysteinproteasen zu erzeugen. So wurde **CS09** erst kürzlich als unselektiver Inhibitor innerhalb der Papainfamilie identifiziert.⁹⁸

Für den anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus ergeben sich zusammengefasst die folgenden Wechselwirkungen (Abb. 3.2.1.5-1):

- H-Brücken der Carbonyl-Funktion eines der beiden Benzylester mit den NHs von Cys-25 und Gly-65,
- Wechselwirkungen des Esters mit dem Imidazol des His-159,
- Wechselwirkung der Prolin-Carbonyl-Funktion mit dem NH des Gly-65 und
- des Prolin-Amids mit den Carbonyl-Funktionen von Leu-157 und Asp-158,
- Wechselwirkungen zwischen den Carbonyl- und Amid-Funktionen zwischen Leucin und Gly-66,

f) der hydrophobe Leucin-Rest sitzt in der flachen S_1 -Bindungstasche, und die Phenyl-Reste der Benzylester liegen im *sandwich* π - π -stacking in der ebenfalls für hydrophobe Präferenz bekannten S_1 -Bindungstasche.

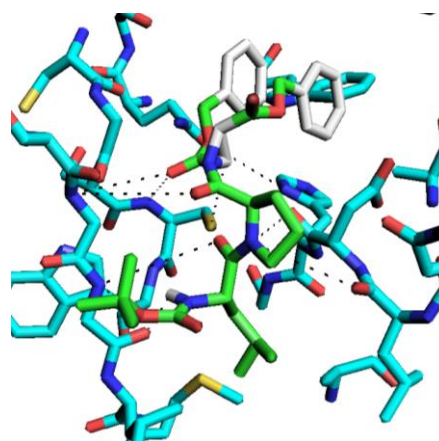
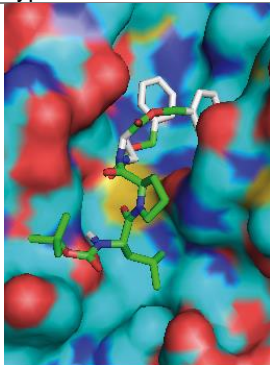
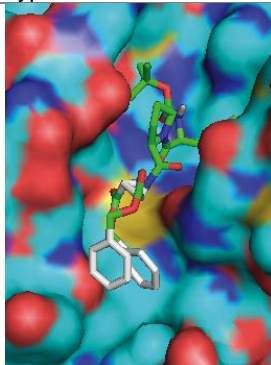
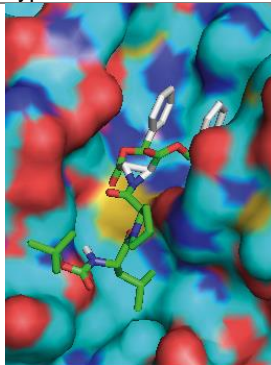
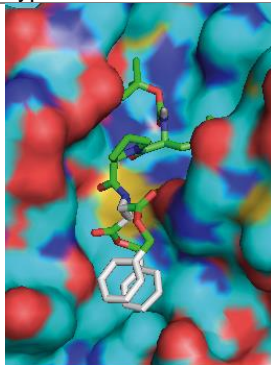


Abb. 3.2.1.5-1: Wechselwirkungen von **CS09** mit Cruzain und Abstand des Cys-Thiolats zum näheren Azi-CH

Im Gegensatz zum anti-Substrat-ähnlichen spricht für einen Substrat-ähnlichen Bindungsmodus nur, dass dieser für **RV122C** und **CS09** in Cathepsin-B ebenfalls möglich ist, und daher nicht ausgeschlossen werden kann (Tab. 3.2.1.5-2, Aufbau und Docking in Cathepsin-B erfolgten analog, wie in Kap. 3.2.1.2 und 3.2.1.3.1 beschrieben).

Tab. 3.2.1.5-2: Anti-Substrat- (Typ A) und Substrat-ähnliche (Typ S) Bindungsmodi von **CS09** und **RV122C** in Cathepsin-B (1CSB¹⁴⁷) unter Angabe der niedrigeren Distanz des Cys-Thiolats zum jeweiligen Azi-CH (in Å) und der entsprechenden Affinität (in kcal/mol)

CS09 (R,R)		RV122C (S,S)	
Typ A	Typ S	Typ A	Typ S
			
4.7 Å	5.4 Å	5.4 Å	4.1 Å
-7.1 kcal/mol	-6.9 kcal/mol	-7.2 kcal/mol	-6.8 kcal/mol

Für den wahrscheinlicheren, anti-Substrat-ähnlichen, Bindungsmodus dieser Verbindungs-klasse an Cruzain ergeben sich nun (für den Mittelwert der Affinitäten der entsprechenden Diastereomerenpaare, da nur diese auch synthetisiert und getestet wurden) – bei Bindungsmodi mit dem jeweils bevorzugten Ester in der S₁-Bindungstasche – folgende Trends. Diese sind relativ zum Mittelwert der berechneten Affinitäten der symmetrischen Derivate **RV122C/CS09** (OBn) angegeben:

Für die symmetrischen Derivate: OMeCy, OPrPh < (OBn) < OEtPh, und für die unsymmetrischen Derivate: OEt < OMeCy < O^tBu < OMeNaph < (OBn) < OEtPh < OPrPh

Die folgende Grafik (Abb. 3.2.1.5-3) fasst die beschriebenen Trends unter Angabe der berechneten Affinitäten – für den anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus und der für die Diastereomere für diesen Bindungsmodus bevorzugten (*R,R*)-Konfiguration und unter der Annahme, dass der jeweils bevorzugte Ester in die S₁-Bindungstasche bindet – noch einmal für eine bessere Übersicht zusammen:

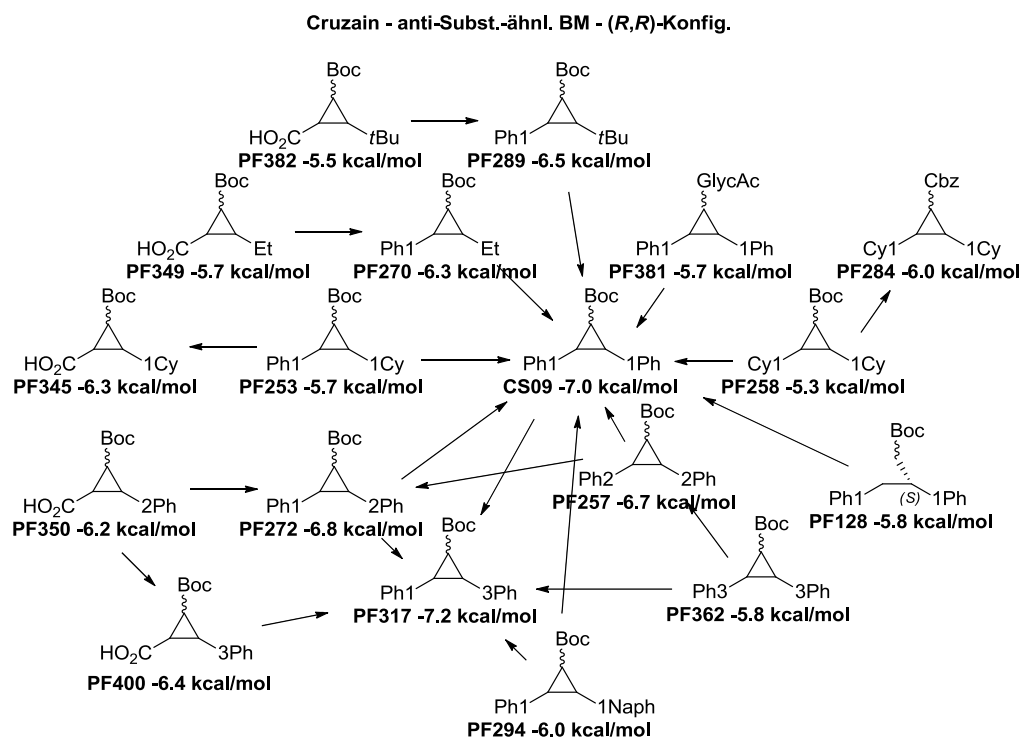


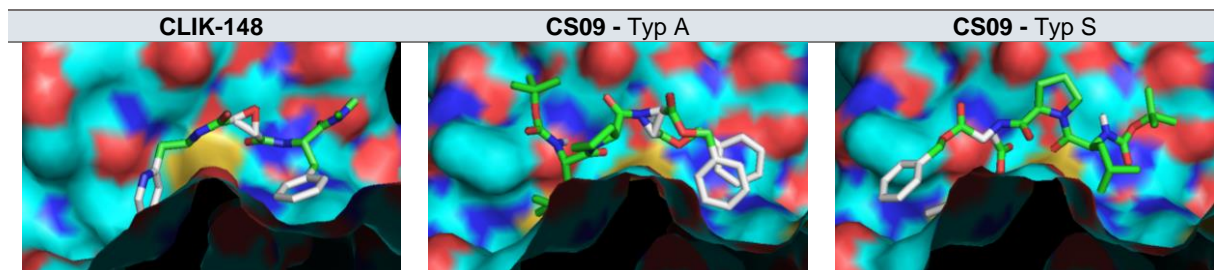
Abb. 3.2.1.5-3: Piktografische Übersicht der berechneten Docking-Ergebnisse für den anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus (BM) an Cruzain für Verbindungen mit (R,R)-Konfiguration am Aziridin (bzw. (S)-Asp bei **PF128**) mit Angabe der Affinitäten (in kcal/mol). Neben der Schutzgruppe in üblicher Abkürzung wird das Dipeptid als Wellenlinie und das Aziridin-2,3-dicarboxylat als Dreieck angegeben (Ausnahme: offenkettiges (S)-Asp bei **PF128**). Die Reste in 2- und 3-Position sind als Gruppe oder als Zahl plus Rest angegeben, wobei die Zahl für die Kettenlänge (CH₂)_x steht (z.B. 3Ph = 3-Phenylpropyl bzw. 1Naph = Naphthalin-2-ylmethyl). Die Pfeile markieren Trends und deuten jeweils eine Verbesserung der Ergebnisse durch die Strukturvariation an (z.B. **PF257** mit geringerer Affinität als **CS09**)

Für die Derivate **PF257**, **PF362**, **PF272** und **PF317**, die eine längere C-Kette als die Benzylester besitzen, bedeutet dies, dass sie in den Enzymassays, wenn überhaupt, eine noch geringere Hemmung von Cathepsin-B-ähnlichen Cysteinproteasen zeigen sollten. Denn für den anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus sollten für diese Derivate, wie beim oben bereits thematisierten **CLIK-148**, beide *subsites* adressiert werden, was die Cathepsin-L-Selektivität weiter erhöhen würde.

Für die 3-Carbonylaziridin-2-carbonsäure-Derivate bedeuten diese Ergebnisse, dass diese Inhibitoren, wenn sie tatsächlich in einem anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus binden, besser in Form der *cis*-konfigurierten Derivate dargestellt werden sollten. Für die Epoxide ist zwar bekannt, dass eine *trans*-Konfiguration essenziell für die Hemmung von Cysteinproteasen ist und eine *cis*-Konfiguration am Epoxid-Ring zum totalen Verlust der Aktivität am Enzym führt. Allerdings weisen die Epoxide im Vergleich mit beiden postulierten Bindungsmodi der Aziridin-Derivate dieser Serie einen doch deutlich anderen Bindungsmodus auf: so

liegt der Aziridin-Ring im Vergleich zum Oxiran-Ring relativ zum katalytischen Zentrum jeweils um ungefähr 90° gedreht vor (Tab. 3.2.1.5-4).

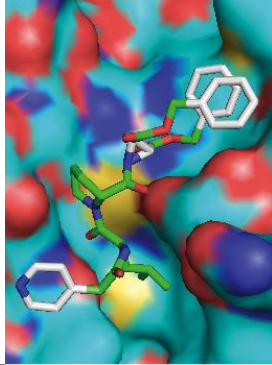
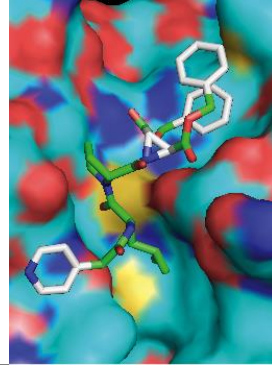
Tab. 3.2.1.5-4: Vergleich der geometrischen Ausrichtung zwischen Epoxid (**CLIK-148** in Papain) und Aziridin (**CS09** in Cruzain) in der Seitenansicht längs des *active site cleft*. Der Aziridin-Ring liegt in beiden postulierten Bindungsmodi relativ zum katalytischen Zentrum jeweils um ungefähr 90° gedreht vor.



Für den anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus lassen die relativ zur Boc-Schutzgruppe zu erwartenden schlechteren Affinitäten der GlycAc-Schutzgruppe weiterhin Optimierungen zu.

Eine mögliche Schutzgruppe, die ebenfalls alle in Kap. 3.1.2.1 geforderten Kriterien erfüllt, ist die 2-(Pyridin-4-yl)acetyl-Schutzgruppe (PyAc-OH). Wie auch die 2-(2-Methoxyethoxy)essigsäure-Schutzgruppe (GlycAc-OH), sollte die Reaktivität bzw. Stabilität vergleichbar mit der eines Acetamids und damit passend für die geplante Synthese sein. Im Docking zeigt der Ligand **PyAc-trans-Bn₂** (PyAc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn)₂) im Vergleich mit dem GlyAc-Analogon **PF381** für den anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus deutlich bessere Affinitäten (Tab. 3.2.1.5-5).

Tab. 3.2.1.5-5: Anti-Substrat-ähnliche Bindungsmodi von **PyAc-trans-Bn₂** unter Angabe der niedrigeren Distanz des Cys-Thiolats zum jeweiligen Azi-CH und der entsprechenden Affinität

PyAc-trans-Bn ₂	
PyAc-trans-(R,R)-Bn ₂	PyAc-trans-(S,S)-Bn ₂
	
5.1 Å	6.5 Å
-6.4 kcal/mol	-4.9 kcal/mol

3.2.2 Variation am C-Terminus: *cis*-konfiguriertes Aziridin-2,3-dicarboxylat

3.2.2.1 Problemstellung

Entsprechend den Ergebnissen des Dockings aus Kap. 3.2.1.3.3, Kap. 3.2.1.4 und Kap. 3.2.1.5 sollte ein unsymmetrisches *cis*-konfiguriertes Aziridin-2,3-dicarboxylat hergestellt werden. Aus diesem sollte nach Kupplung an ein Dipeptid und Hydrogenolyse das entsprechende *cis*-3-Carbonylaziridin-2-carbonsäure-Derivat hervorgehen können.

Synthetisch ist kein Weg zu unsymmetrischen, *N*-unsubstituierten, *cis*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten bekannt. Die Syntheserouten 1) und 2) aus Kap. 3.1.1.1 kommen aufgrund der beschriebenen Reaktion, die über das jeweils günstigere Tautomer/Rotamer zu den *trans*-konfigurierten Produkten führt, nicht in Frage (siehe auch Kap. 3.1.1.5). Für die Darstellung der *cis*-konfigurierten Produkte muss die Stereoinformation, die bei der Drehung der Tautomere/Rotamere verloren geht, erhalten bleiben. Durch die stereoselektive Syntheseroute 3) aus Kap. 3.1.1.1 sollten sich aus der *meso*-Weinsäure *cis*-konfigurierte Aziridin-2,3-dicarboxylate darstellen lassen. Denn *cis*-konfigurierte Aziridin-2,3-dicarboxylate wurden bereits mehrfach über *syn*-Azidoalkohole hergestellt.^{z.B.92,109,111,155,156} Die Problematik der Umesterung bzw. Darstellung von Verbindungen mit gemischtem Ester ist aber auf der stereoselektiven Route für die *cis*- dieselbe, wie bereits für die *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylate diskutiert (siehe Kap. 3.1.1.1).

Da aber die Staudinger-Reaktion die einzige bekannte Möglichkeit darstellt, *cis*-konfigurierte Aziridin-2,3-dicarboxylate darzustellen, muss die Synthese früher oder später über *syn*-Azidoalkohole zum *cis*-Aziridin führen. Um von den bereits hergestellten unsymmetrischen (2*Z*)-But-2-endoaten auf die Schiene der stereoselektiven Syntheseroute zu kommen, sind zwei Wege möglich (Abb. 3.2.2.1-1, nächste Seite). Der Kürzere führt über ein Epoxid **1** als Zwischenprodukt, welches durch Ringöffnung in den Azidoalkohol **4** überführt wird. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Olefine zum Tartrat **2** *cis*-vicinal zu dihydroxylieren. Von dort erfolgt analog der stereoselektiven Syntheseroute die Umsetzung zum Thiooxolan **3**, zum Azidoalkohol **4**, und von dort über den Ringschluss zum Aziridin **5**. Über beide Routen entsteht das *cis*-konfigurierte Aziridin-2,3-dicarboxylat racemisch (zu Details: siehe Kap. 3.2.2.2).

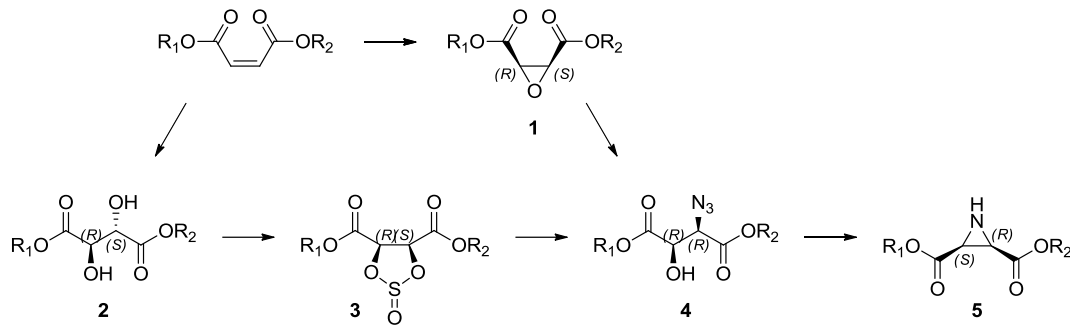


Abb. 3.2.2.1-1: Vergleich der Syntheserouten, um über Epoxide bzw. Tartrate von unsymmetrischen Maleaten zu unsymmetrischen *cis*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten zu gelangen – Informationen über ebenfalls entstehende Isomere sind für eine bessere Übersichtlichkeit weggelassen

Der Ringschluss zu *cis*-konfigurierten (2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-Aziridin-2,3-dicarboxylaten erfolgt in der stereoselektiven Staudinger-Reaktion mittels Triphenylphosphan.¹¹¹ Bei diesem Mechanismus greift das Phosphoratom von Triphenylphosphan unter Abspaltung von molekularem Stickstoff am Azid des Azidoalkohols an und es wird ein 2-Hydroxy-3((triphenylphosphoraniliden)amino)succinat gebildet. Nach anschließendem intramolekularem nucleophilen Angriff des Sauerstoffs des Alkohols am Phosphoratom wird das cyclische 1,3,2- λ^5 -Oxazaphospholidin-Intermediat gebildet. Über dieses kommt es zur vollständigen Übertragung der Phosphor-Gruppe auf den Sauerstoff unter Ausbildung der kationischen Zwischenstufe mit freiem Amin. Durch Rückseitenangriff des freienamins cyclisiert die Verbindung dann unter Inversion am C-Atom zum Aziridin-Dreiring (Abb. 3.2.2.1-2). Triebkraft dieser Reaktion ist das Freiwerden molekularen Stickstoffs und die Oxidation des oxophilen Phosphoratoms von der Oxidationsstufe drei auf fünf.¹⁵⁷

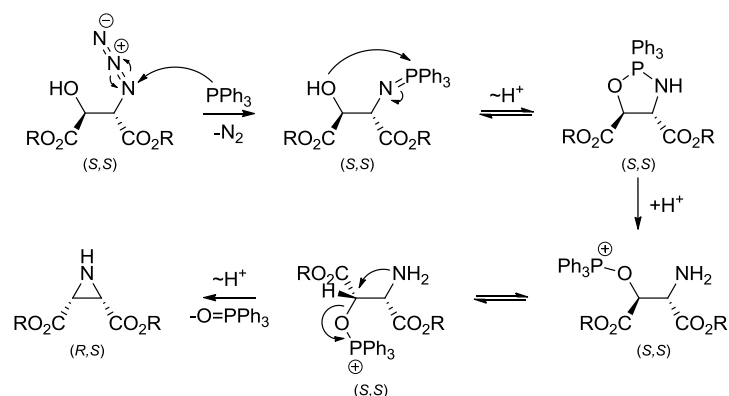


Abb. 3.2.2.1-2: Mechanismus der Staudinger-Reaktion. Stereoselektiver Ringschluss eines *syn*-Azidoalkohols zum *cis*-Aziridin am Beispiel eines Azidoalkohols mit identischen Estern

Zunächst sollte die kürzere Variante über das Epoxid getestet werden.

3.2.2.2 Versuche der Synthese eines unsymmetrischen *cis*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylats

Eine Möglichkeit, über den in Kap. 3.1.1.3 beschriebenen Weg unsymmetrische Grundgerüste darzustellen – und so ebenfalls die bereits hergestellten unsymmetrischen (2*Z*)-But-2-endioate zu nutzen – verläuft über Epoxide. Hier werden die unsymmetrischen (2*Z*)-But-2-endioate durch die direkte Weitz-Schäffer-Epoxidierung^{158,159} in die (2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-Epoxy-succinate überführt (Abb. 3.2.2.2-1). Reaktionen, die das *in situ* gebildete Lithium-*tert*-butylhydrogenperoxid als Sauerstofftransferreagenz nutzen, wurden bereits im Arbeitskreis durchgeführt.¹⁶⁰

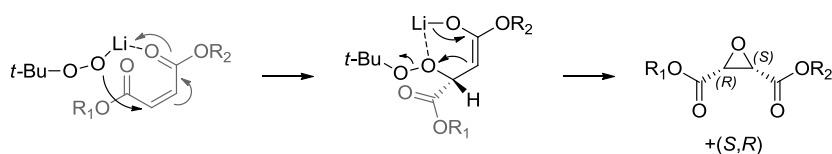


Abb. 3.2.2.2-1: Mechanismus der Weitz-Schäffer-Epoxidierung an (2*Z*)-But-2-endioate

Die so hergestellten, unsymmetrischen Epoxide sollten sich anschließend durch eine $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion mit Natriumazid selektiv in die entsprechenden vier *syn*-Azidoalkohole überführen lassen (Abb. 3.2.2.2-2). Epimerisierungsstudien der Ringöffnung von Epoxiden mittels Natriumazid wurden ebenfalls bereits im Arbeitskreis durchgeführt.¹¹¹ Der Ringschluss zum *cis*-konfigurierten (2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-Aziridin-2,3-dicarboxylat erfolgt, wie bereits in Kap. 3.2.2.1 beschrieben, mittels Triphenylphosphan.

Durch die unsymmetrischen (2*Z*)-But-2-endioate entstehen in dieser Syntheseroute auf der Epoxy-succinat-Stufe zwei Enantiomere und auf der Azidoalkohol-Stufe vier unterschiedliche Isomere (zwei Regioisomere mit entsprechenden Enantiomeren). Diese fallen aber durch den Ringschluss wieder in zwei enantiomere *cis*-konfigurierte Aziridin-2,3-dicarboxylate mit gemischten Estern zusammen (Abb. 3.2.2.2-2).

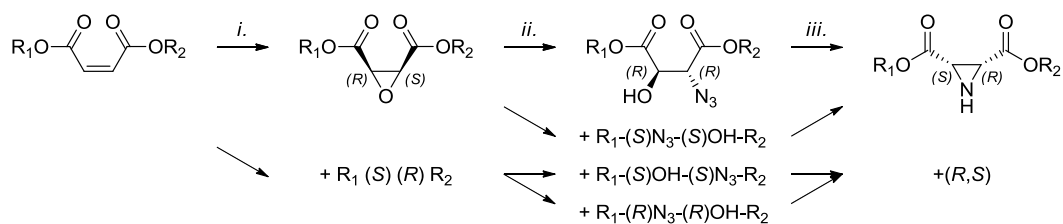


Abb. 3.2.2.2-2: Geplante Syntheseroute für racemische *cis*-konfigurierte Aziridin-2,3-dicarboxylate mit gemischten Estern aus unsymmetrischen (2*Z*)-But-2-endioaten über Epoxide und Azidoalkohole – *i.* 1.5 Äq. *t*BuOOH, 1.1 Äq. *n*-BuLi, THF, -78 °C bis RT, 10 h RT; *ii.* 2.0 Äq. NaN_3 , DMF_{abs} , 12 h RT; *iii.* 1.1 Äq. PPh_3 , DMF, 4.5 h 83 °C

Die Testreaktion mit Dibenzyl-(2*Z*)-but-2-endioat lieferte das *meso*-(2*S*,3*R*)-Dibenzyl-oxiran-2,3-dicarboxylat in 40%iger Ausbeute (Abb. 3.2.2.2-3).

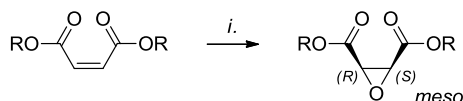


Abb. 3.2.2.2-3: Darstellung von *meso*-(2*S*,3*R*)-Dibenzyl-oxiran-2,3-dicarboxylat aus Dibenzyl-(2*Z*)-but-2-endioat – R = Benzyl – *i.* 1.5 Äq. *t*BuOOH, 1.1 Äq. *n*-BuLi, THF, -78 °C bis RT, 10 h RT

Bei der analogen Reaktion von 1-Benzyl-4-cyclohexylmethyl-(2*Z*)-but-2-endioat zum (2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-2-Benzyl-3-(cyclohexylmethyl)-oxiran-2,3-dicarboxylat konnten hingegen nur 11 % Produkt isoliert werden (Abb. 3.2.2.2-4).

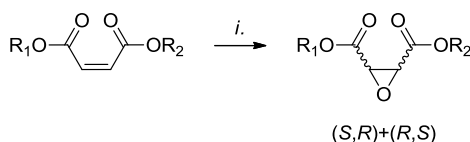


Abb. 3.2.2.2-4: Darstellung von (2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-2-Benzyl-3-(cyclohexylmethyl)-oxiran-2,3-dicarboxylat aus 1-Benzyl-4-cyclohexylmethyl-(2*Z*)-but-2-endioat – R₁ = Benzyl, R₂ = Cyclohexylmethyl – *i.* 1.5 Äq. *t*BuOOH, 1.1 Äq. *n*-BuLi, THF, -78 °C bis RT, 10 h RT

Versuche die Reaktion zu optimieren lieferten laut DC-Kontrolle nach 5 h bzw. 15 h weniger Produkt bzw. deutlich mehr Nebenprodukte. Als Nebenprodukt ließen sich *meso*-(2*S*,3*R*)-Bis(cyclohexylmethyl)-oxiran-2,3-dicarboxylat und Benzylalkohol identifizieren. Möglich ist die Bildung dieser Verbindungen durch Umesterung mit dem nach der Epoxidierung entstehenden Lithium-*tert*-Butanolat. Dieses entsteht außerdem als Nebenprodukt bei der Darstellung von Lithium-*tert*-butylhydrogenperoxid aus *tert*-Butylhydrogenperoxid und *n*-Butyllithium.^{158,159} Nach Angriff und Umesterung sind für unsymmetrische Maleate/Epoxide je zwei Produkte mit gemischten Estern möglich, wobei die entsprechenden Alkoholate der ursprünglichen Ester frei werden. Diese Alkoholate machen nun weitere Umesterungen möglich, wobei auch symmetrische Produkte entstehen können. Bei symmetrischen Edukten wirkt sich diese Umesterung auf die Ausbeute aufgrund der kleineren Anzahl an möglichen Umesterungsprodukten nicht so stark aus. Außerdem lässt sich das entstehende Produktgemisch durch säurekatalysierte Veresterung mit dem vorgesehenen Alkohol für den Ester auf die Seite des gewünschten Produkts verschieben.¹⁶⁰ Letzteres ist bei unsymmetrischen Estern nicht möglich.

Alternative Epoxidierungsreagenzien zeigen an der sehr elektronenarmen Doppelbindung der Maleate, wie auch in früheren Arbeiten bereits festgestellt, keine Reaktion.¹⁶⁰ Damit er-

scheint Lithium-*tert*-butylhydrogenperoxid essenziell für diese Epoxidierung und macht Umesterungen durch Lithium-*tert*-Butanolat folglich unvermeidbar. Letzte Versuche das entstehende Lithium-*tert*-Butanolat durch Phthalsäureanhydrid abzufangen scheiterten. Bei Hinzugabe des Anhydrids zum Reaktionsgemisch wurde Lithium-*tert*-butylhydrogenperoxid direkt abgefangen und es kam zu keiner weiteren Umsetzung. Aufgrund der schlechten Ausbeuten, fehlenden Optimierungspotentialen und den sich noch anschließenden Folgereaktionen erschien diese Syntheseroute ungeeignet.

3.2.2.3 Synthese des racemischen *cis*-2-Benzyl-3-phenylethyl-aziridin-2,3-dicarboxylats

Wie bereits in 3.2.2.1 beschrieben, scheint für die Darstellung von *cis*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten der Ringschluss über die Staudinger-Reaktion notwendig. Neben der bereits gescheiterten Variante, die bestehenden unsymmetrischen Grundgerüste über die Umwandlung zu Epoxiden zu nutzen, besteht die Möglichkeit, die (*2Z*)-But-2-endionate zu (*2S,3R*)+(*2R,3S*)-Tartraten umzusetzen. Im Gegensatz zur Epoxid-Syntheseroute wird hier zwei Stufen früher auf die stereoselektive Syntheseroute umgeschwenkt (Abb. 3.2.2.3-1). Die Tartrate werden von dort mit Thionylchlorid durch Katalyse mit DMF zu den cyclischen 1,3,2-Dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylaten und durch eine S_N2 -Reaktion mit Natriumazid zu den 3-Azido-2-hydroxysuccinaten umgesetzt. Der Ringschluss erfolgt wie bereits in Kap. 3.2.2.1 beschrieben über die Staudinger-Reaktion mit Triphenylphosphan.

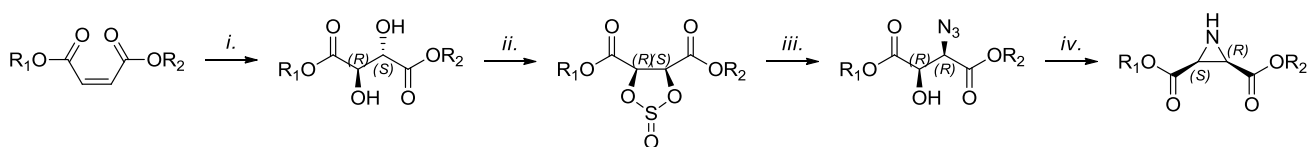


Abb. 3.2.2.3-1: Geplante Syntheseroute für racemische *cis*-konfigurierte *N*-unsubstituierte Aziridin-2,3-dicarboxylate mit gemischten Estern aus unsymmetrischen (*2Z*)-But-2-endioaten über Tartrate – Informationen über ebenfalls entstehende Isomere sind für eine bessere Übersichtlichkeit weggelassen –

i. 0.2 mol % $K_2OsO_4 \cdot H_2O$, 1.1 Äq. NMO, 0.75 Äq. Zitronensäure, $tBuOH:H_2O$ [1:1], 12 h RT; *ii.* 1.1 Äq. $SOCl_2$, DMF_{kat} , DCM, 1 h 0 °C, 2 h RT, 1 h reflux; *iii.* 2.0 Äq. NaN_3 , DMF_{abs} , 72 h RT; *iv.* 2.0 Äq. NaN_3 , DMF_{abs} , 72 h RT; *v.* 1.1 Äq. PPh_3 , DMF, 4.5 h 83 °C

Für die neue Syntheseroute sollen die (*2Z*)-But-2-endionate in einer *cis*-vicinalen-Dihydroxylierung durch 1,3-dipolare Cycloaddition von Osmiumtetroxid an die Doppelbindung stereoselektiv zu den entsprechenden (*2S,3R*)+(*2R,3S*)-Tartraten umgesetzt werden. Die Folgestufen erfolgen, wie bereits in Kap. 3.1.1.1 und 3.2.2.1 beschrieben, nach der stereoselektiven Syntheseroute. Da aufgrund der Asymmetrie der (*2Z*)-But-2-endionate – wie

auch bei der in Kap. 3.2.2.2 beschriebenen Epoxidierung – die Produkte racemisch anfallen und die Darstellung des Azidoalkohols nicht regio-spezifisch verläuft, werden auch in dieser Syntheseroute vier Isomere generiert, die erst in der finalen Reaktion zum racemischen *cis*-Produktgemisch zusammenfallen.

Mechanistisch kann der „Upjohn Prozess“ – die Osmium-katalysierte Dihydroxylierung von Olefinen – über zwei unterschiedliche katalytische Kreisläufe erfolgen (Abb. 3.2.2.3-2). Im ersten Kreislauf addiert OsO_4 in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition an die Doppelbindung. Durch Oxidation von NMO, welches zu NMM reduziert wird, wird das Osmiummonoglycolat **i** gebildet. Von hier aus erfolgt entweder die Hydrolyse durch Wasser zum Diol und freiem OsO_4 für einen erneuten Katalysezyklus, oder der Weg in den zweiten Kreislauf durch Addition eines weiteren Olefins zum Bisglycolat **ii**. Es wird vermutet, dass sich von dort die Oxidation durch Wasser zum Intermediat **iii** anschließt. Es folgt die Hydrolyse durch Wasser unter Abspaltung des Diols. Die verbleibende Spezies entspricht dem Additionsprodukt aus dem ersten Kreislauf. Durch Oxidation zum Osmiummonoglycolat **i** wird der zweite Kreislauf geschlossen. In jedem Kreislauf ist die Hydrolyse des Glycolats (Osmiummonoglycolat **i** bzw. Bisglycolat **ii**) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Unter homogenen Bedingungen verläuft die Katalyse ausschließlich über den zweiten Kreislauf.¹⁶¹

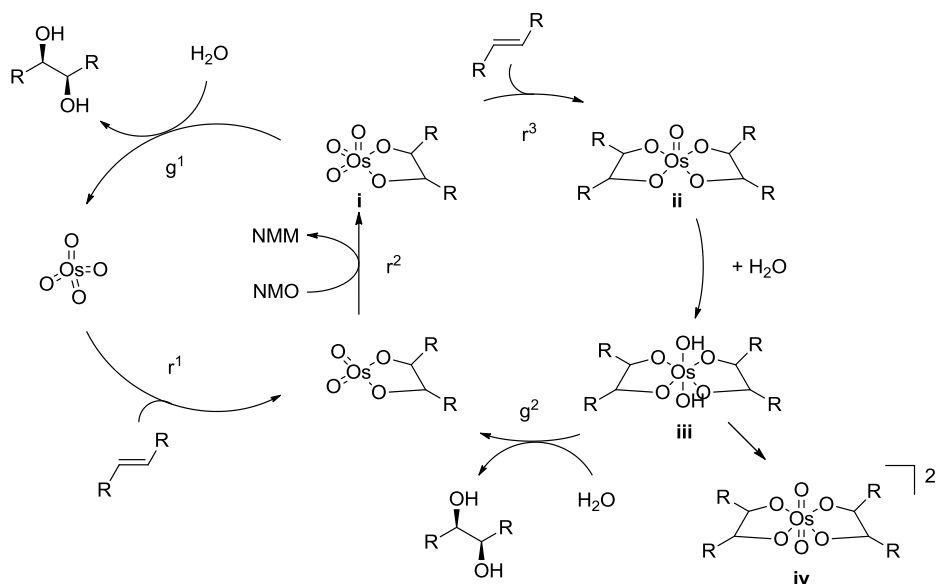


Abb. 3.2.2.3-2: Mechanismus der Osmium(VIII)-katalysierten Dihydroxylierung von Olefinen mit NMO als Reoxidanz nach Sharpless *et. al.*¹⁶¹

Sharpless *et al.* vermuten dabei den größten Verlust von katalytischem Osmium durch die Deprotonierung des Bisglycolats **iii** des zweiten Kreislaufs. Das so gebildete, inerte Osmiumdianion **iv** bedeutet das Lebensende des Osmiums als Katalysator. Dies steht im Einklang mit der schlechten Reaktivität elektronenarmer Olefine, die sich im Vergleich zu elektronenreicheren leichter deprotonieren lassen. Deprotoniert wird ab pH ~ 8, was leicht durch das in der Reduktion entstehende NMM erreicht wird.^{161,162}

Neu für die Synthese und damit prädestiniert für die Dihydroxylierung der elektronenarmen Maleate ist der Einsatz von Zitronensäure (Abb. 3.2.2.3-3), der aus zweierlei Gründen zu hohen Ausbeuten bei hervorragend reinen Produkten führt. Die Zitronensäure neutralisiert zum einen das entstehende NMM und hält den pH im optimalen Bereich zwischen pH = 4-6. Dies verhindert zum anderen mögliche Disproportionierungen, welche ab pH = 6 Osmium(VIII) und unlösliches Osmium(IV) bilden. Außerdem greift die Zitronensäure in die Ligandaktivität ein, hält die aktive Osmium(VI)-Spezies gelöst und beugt als stabilisierender Ligand zusätzlich gegen besagte Disproportionierungen vor.¹⁶¹

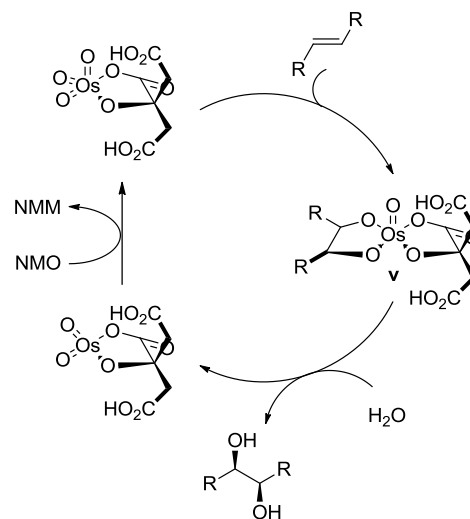


Abb. 3.2.2.3-3: Katalytischer Kreislauf mit Zitronensäure als Komplexbildner nach Sharpless *et al.*¹⁶¹

Ein weiterer Vorteil ist die einfache Handhabung. Die Reaktion wird in *tert*-Butanol/Wasser [1:1] mit 0.75 Äq. Zitronensäure bei einer Substratkonzentration von 1 M durchgeführt. Nach vollständiger Lösung des Olefins wird 0.2 mol% Kaliumosmat, gefolgt von 1.1 Äq. NMO zugegeben, wobei sich die Reaktionslösung in einen Grünton verfärbt. Nach ca. 12 h bei RT zeigt eine entfärbte Lösung das Ende der Reaktion an. Außerdem fallen die dihydroxylierten Produkte oftmals aus der Reaktionslösung aus.¹⁶¹

In einer ersten Testreaktion mit Dibenzyl-(2*Z*)-but-2-endioat konnte *meso*-(2*S*,3*R*)-Dibenzyltartrat¹⁶³ in 72%iger Ausbeute isoliert werden (Abb. 3.2.2.3-4). Diastereomere Produkte wurden nicht beobachtet (Abb. 3.2.2.3-5, nächste Seite).

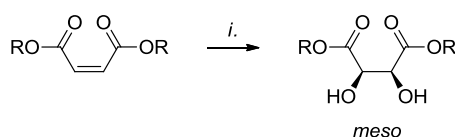


Abb. 3.2.2.3-4: Osmium(VIII)-katalysierte Dihydroxylierung von Dibenzyl-(2*Z*)-but-2-endioat – *i.* 0.2 mol % $K_2OsO_4 \cdot H_2O$, 1.1 Äq. NMO, 0.75 Äq. Zitronensäure, *t*BuOH:H₂O [1:1], 12 h RT

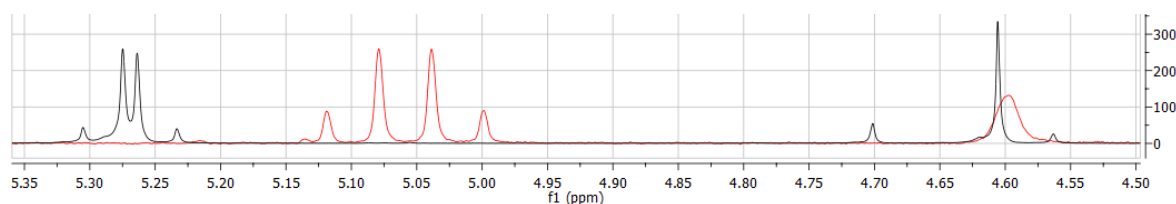


Abb. 3.2.2.3-5: Überlagerungen der ^1H -NMR-Spektren von (2*S*,3*S*)-Dibenzyltartrat (schwarz) und *meso*-(2*S*,3*R*)-Dibenzyltartrat (rot). Auffallend ist die deutliche Hochfeldverschiebung der beiden Dubletts der Benzyl- CH_2 -Peaks inklusive größerer Kopplungskonstanten in der *meso*-Verbindung. Die Hydroxy- CH -Peaks bleiben weitgehend unverändert bei ~ 4.6 ppm.

Als erstes Maleat wurde 1-Benzyl-4-cyclohexylmethyl-(2*Z*)-but-2-endioat in einer Testreaktion dihydroxyliert. Das racemische Produktgemisch ((2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-1-Benzyl-4-cyclohexylmethyltartrat) fiel quantitativ (Ausbeute > 99 %) aus der Reaktion aus, es konnte aber nur ein Diastereomerenüberschuss (bezogen auf das gewünschte racemische Produktgemisch) von $de = 66$ % erzielt werden. Ungeklärt bleibt, ob eine Isomerisierung des Edukts vor Reaktionsbeginn, oder aber durch die wässrig sauren Bedingungen der Dihydroxylierung erfolgte. Die Umsetzung zum cyclischen Thiooxolan ((4*S*,5*R*)+(4*R*,5*S*)-4-Benzyl-5-cyclohexylmethyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat) erfolgte ebenfalls nahezu quantitativ (Ausbeute > 98 %), wobei sich der Diastereomerenüberschuss auf $de = 25$ % reduzierte. Der anschließend synthetisierte Azidoalkohol ((2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-1-Benzyl-4-cyclohexylmethyl-3-azido-2-hydroxysuccinat und (2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-4-Benzyl-1-cyclohexylmethyl-3-azido-2-hydroxysuccinat) konnte in 83%iger Ausbeute gewonnen werden. Der Diastereomerenüberschuss blieb unverändert bei $de = 25$ %. Der Testansatz wurde weiter zum Aziridin umgesetzt, wobei aber kein Produkt isoliert werden konnte. Abb. 3.2.2.3-6 zeigt die Testsyntheseroute mit Ausbeuten und entsprechenden de -Werten.

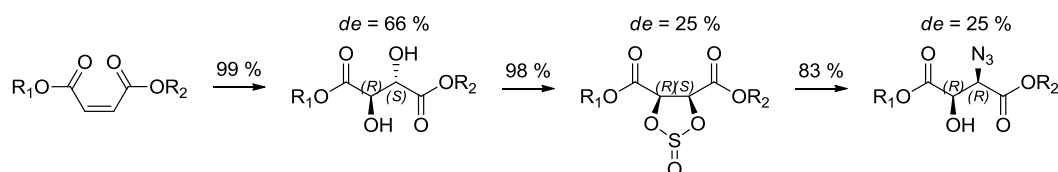


Abb. 3.2.2.3-6: Synthese eines *syn*-Azidoalkohols mit gemischten Estern – Informationen über ebenfalls entstehende Isomere sind für eine bessere Übersichtlichkeit weggelassen – Die Diastereomerenüberschüsse beziehen sich auf das jeweils gewünschte Racemat – $\text{R}_1 = \text{Benzyl}$, $\text{R}_2 = \text{Cyclohexylmethyl}$

Nach erfolgreichem Testlauf bis zum unsymmetrischen *syn*-Azidoalkohol mit gemischten Estern wurde 1-Benzyl-4-(2-phenylethyl)-(2*Z*)-but-2-endioat als aussichtsreichster Kandidat für die Syntheseroute ausgewählt. Als unsymmetrischer Grundbaustein besitzt dieser mit einem 2-Phenylethylester die laut Docking allgemein günstigste Seitenkette.

Die Darstellung des Tartrats (*syn*-1-Benzyl-4-(2-phenylethyl)-tartrat) erfolgte in 96%iger Ausbeute, $de = 70\%$ (bezogen auf das gewünschte racemische Produktgemisch). Die Stufe des cyclischen Thiooxolans (*syn*-4-Benzyl-5-(2-phenylethyl)-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat) wurde in 98%iger Ausbeute, $de = 70\%$, erreicht. Die Isomere der Azidoalkohole (*anti*-1-Benzyl-4-(2-phenylethyl)-3-azido-2-hydroxysuccinat und *anti*-4-Benzyl-1-(2-phenylethyl)-3-azido-2-hydroxysuccinat) konnten in 91%iger Ausbeute isoliert werden, $de = 70\%$. Der Ringschluss zum *cis*-Aziridin (*cis*-2-Benzyl-3-(2-phenylethyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat) lieferte im Vergleich mit dem *trans*-Aziridin (siehe Kap. 3.1.1.1) die deutlich schlechtere Ausbeute von 2% bei einem Diastereomerenüberschuss von nur noch $de = 35\%$. Abb. 3.2.2.3-7 zeigt die Syntheseroute mit Ausbeuten und entsprechenden diastereomeren Überschüssen.

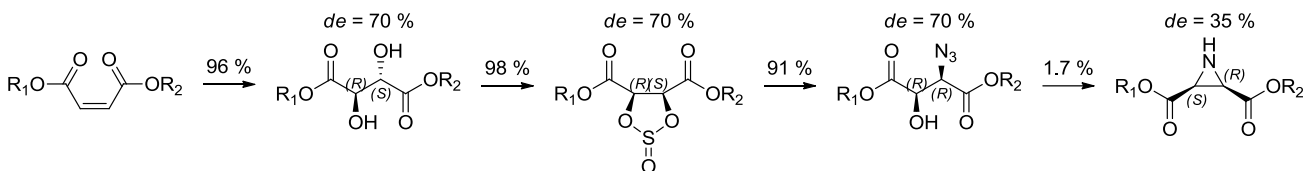


Abb. 3.2.2.3-7: Synthese des *cis*-Aziridins mit gemischten Estern – Informationen über ebenfalls entstehende Isomere sind für eine bessere Übersichtlichkeit weggelassen – Die Diastereomerenüberschüsse beziehen sich auf das jeweils gewünschte Racemat – $R_1 = \text{Benzyl}$, $R_2 = 2\text{-Phenylethyl}$

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt sich im Vergleich des *cis*- (Abb. 3.2.2.3-8, schwarzes Spektrum) und *trans*-konfigurierten Aziridins (Abb. 3.2.2.3-8, rotes Spektrum) zum einen eine deutliche Hochfeldverschiebung der 2-Phenylethyl-Peaks von 2.88 auf 2.83 ppm, so dass diese mit den im Vergleich zur *trans*-Verbindung nicht mehr so stark aufspaltenden *cis*-Azi- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -Peaks zusammenfallen (Abb. 3.2.2.3-8, grüner Kasten).

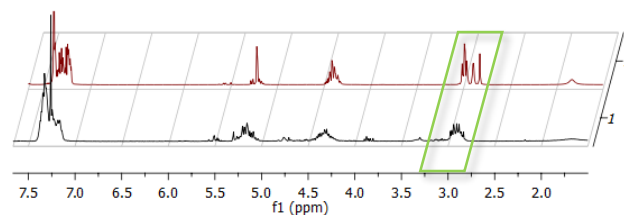


Abb. 3.2.2.3-8: Überlagerungen der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des racemischen *trans*-2-Benzyl-3-(2-phenylethyl)-aziridin-2,3-dicarboxylats (**PF266**, rot) und des racemischen *cis*-2-Benzyl-3-(2-phenylethyl)-aziridin-2,3-dicarboxylats (**PF361**, schwarz)

Die Umsetzung zum gewünschten Tripeptid (Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*S,R*)+(*R,S*)-Azi-(OBn)(OEtPh)) erfolgte wie in Kap. 3.1.3 beschrieben. Die DC-Kontrolle und ^1H -spektroskopische Untersuchungen ließen gebildetes Produkt vermuten (neu gebildete Azi- $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}$ -Peaks bei ~ 3.5 ppm), das aber nicht isoliert werden konnte (Abb. 3.2.2.3-9, grüner Kasten).

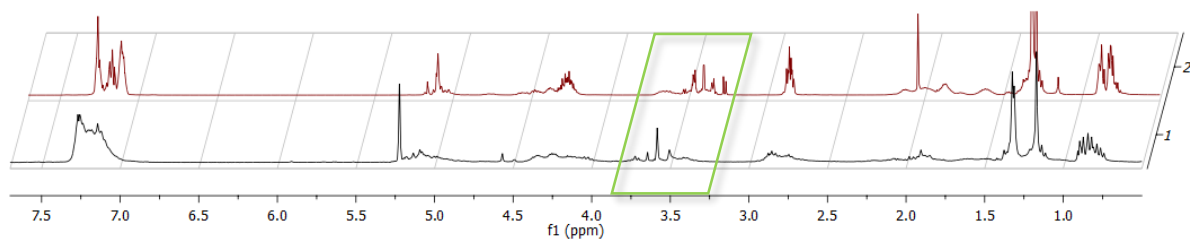


Abb. 3.2.2.3-9: Überlagerungen der ¹H-NMR-Spektren von *trans*-konfiguriertem Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*S,S*)+(*R,R*)-Azi(OBn)(OEtPh) (**PF272**, rot) und der Reaktionslösung mit *cis*-konfiguriertem Produkt (schwarz)

Auffällig im Vergleich zu den Edukten sind die neu entstandenen Peaks knapp unterhalb von 3.5 ppm im *trans*-konfigurierten, bzw. knapp oberhalb von 3.5 ppm für das vermutete *cis*-konfigurierte Tripeptid.

Auch wenn die Ausbeuten an *cis*-konfiguriertem unsymmetrischen Aziridin sehr niedrig sind und das gewünschte Tripeptid nicht bestätigt werden konnte, scheint die veranschlagte Syntheseroute geeignet für die Darstellung von Tripeptiden mit *cis*-konfiguriertem unsymmetrischen Aziridin-2,3-dicarboxylat zu sein. Aus diesen sollten weiterhin leicht *cis*-konfigurierte 3-Carbonylaziridin-2-carbonsäure-basierte Inhibitoren hervorgehen können.

3.2.3 Variation am N-Terminus

3.2.3.1 Versuch der Darstellung einer alternativen hydrophilen Schutzgruppe

Laut Docking (Kap. 3.2.1.5) wird durch die PyAc-Schutzgruppe die Affinität verbessert. Retrosynthetisch lässt sie sich analog zur GlycAc-Schutzgruppe (Kap. 3.1.2.2) in die Synthese einbauen.

Die Darstellung erfolgte über das bereits in Kap. 3.1.2.2 beschriebene (S)-Leu-OBn mit Kupplung der 4-Pyridinessigsäure zum PyAc-(S)-Leu-OBn mittels DCC/NMM in 54%iger Ausbeute. Nach hydrogenolytischer Abspaltung des Benzylesters mit Wasserstoff über Palladium-Aktivkohle als Katalysator wurde PyAc-(S)-Leu-OH in 96%iger Ausbeute gewonnen. Das Dipeptid wurde aus dem ebenfalls bereits in Kap. 3.1.2.2 beschriebenen (R)-Pro-OBn und PyAc-(S)-Leu-OH durch Kupplung mit DCC/HOBt dargestellt. Die Ausbeute lag bei 12 % (Abb. 3.2.3.1-1).

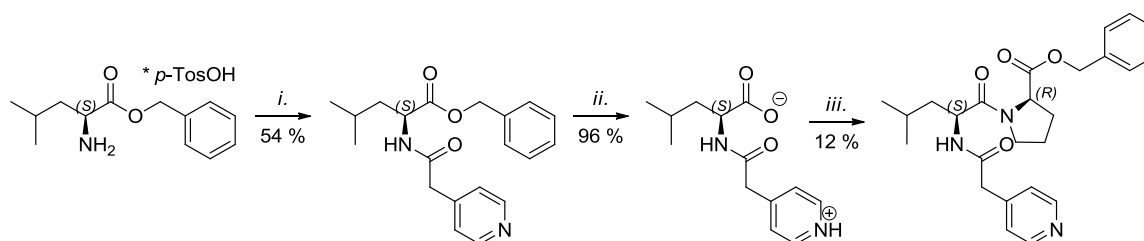


Abb. 3.2.3.1-1: Darstellung des Dipeptids PyAc-(S)-Leu-(R)-Pro-OBn mit 4-Pyridinessigsäure als hydrophile N-terminale Schutzgruppe – *i.* 1.0 Äq. 4-PyAc-OH*HCl, 3.0 Äq. NMM, 1.0 Äq. HOBt, 1.05 Äq. DCC, 1 h 0 °C, 24 h RT; *ii.* 103 mg/mmol Pd/C, MeOH, 1 h 5 Bar H₂; *iii.* 1.0 Äq. (R)-Pro-OBn, 2.0 Äq. NMM, 1.0 Äq. HOBt, 1.05 Äq. DCC, 1 h 0 °C, 24 h RT

Bei der folgenden Hydrogenolyse trat bis zur vollständigen Umsetzung, im Gegensatz zur PyAc-geschützten Aminosäure, beim Dipeptid auch die Hydrierung des Pyridin-Rests auf. Da beide Produkte als Aminosäuren vorliegen, konnte das Produktgemisch nicht getrennt werden (Abb. 3.2.3.1-2). Der Versuch der Umsetzung zum Tripeptid mit (2S,3S)+(2R,3R)-Dibenzyl-aziridin-2,3-dicarboxylat blieb ebenfalls ohne Erfolg.

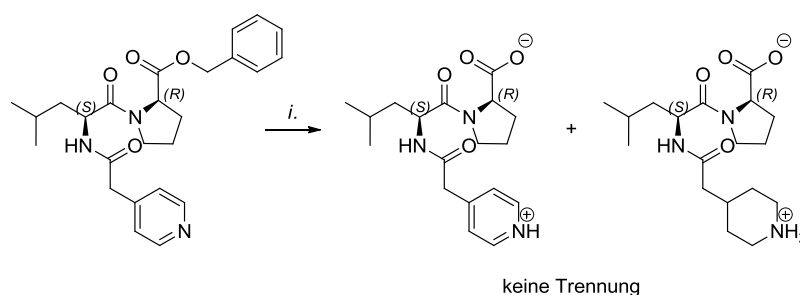


Abb. 3.2.3.1-2: Hydrierung des Pyridin-Rests als Nebenreaktion der Hydrogenolyse des Benzylesters. Die Produkte konnten nicht getrennt werden – *i.* 103 mg/mmol Pd/C, MeOH, 1 h 5 Bar H₂

Versuche mit einer anderen C-terminalen Schutzgruppe, die auf der Stufe des Dipeptids nicht hydrogenolysiert werden muss, wurden nicht durchgeführt.

3.2.3.2 Einführung einer hydrophilen Schutzgruppe an **CS25**

Aus der in Kap. 3.2.1.4 bereits erwähnten **CS**-Reihe lässt sich ein Derivat hervorheben: **CS25**. Es zeichnet sich durch die selektive Hemmung der Cathepsin-B-ähnlichen LmajcatB aus, ohne Cruzain oder LmCPB2.8 zu hemmen.⁹⁸ Wie die Leitstrukturen **RV122C/CS09** weist auch **CS25** eine geringe Hydrophilie auf, und sollte durch den Austausch der Boc-Schutzgruppe besser wasserlöslich gemacht werden.

Die Darstellung des Dipeptids erfolgte analog der in Kap. 3.1.2.2 beschriebenen Darstellung von GlycAc-(S)-Leu-(R)-Pro-OH

Das Dipeptid wurde aus dem bereits beschriebenen (R)-Pro-OBn und GlycAc-(S)-Ile-OH aufgebaut. Die Einführung der GlycAc-Schutzgruppe an (S)-Ile-OBn * *p*-TosOH wurde mittels DCC/NMM in 70%iger Ausbeute durchgeführt. Nach hydrogenolytischer Abspaltung zu GlycAc-(S)-Ile-OH (Ausbeute > 99 %) erfolgte die Kupplung der C- bzw. N-terminal geschützten Aminosäuren zu dem entsprechenden Dipeptid. Das so in 22%iger Ausbeute erhaltene Dipeptid wurde anschließend hydrogenolysiert, wobei 98 % GlycAc-(S)-Ile-(R)-Pro-OH gewonnen wurden. Die Kupplung mit (2S,3S)+(2R,3R)-Dibenzyl-aziridin-2,3-dicarboxylat mittels PPA zum entsprechenden Tripeptid **PF326** lieferte 5 % Ausbeute (Tab. 3.2.3.2-1).

Tab. 3.2.3.2-1: Dargestelltes racemisches **PF326** als hydrophileres Derivat von **CS25** mit Reaktionsdauer, Ausbeute und Diastereomeren-Verhältnis nach Aufreinigung durch HPLC

Lab. Nr.	Verbindung	Rkt-Dauer	Ausbeute	Diast.*-Verhältnis
PF326	GlycAc-(S)-Ile-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn) ₂	24 h	5 %	1:1:0.6

* Bis zu vier Isomere durch N-Acylierung von racemischen *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten mit epimerisierten Dipeptiden

Die Daten wurden für eine bessere Gesamtübersicht bereits in Kap. 3.1.3 gezeigt.

3.3 Übersicht und Hydrophilie aller dargestellten Inhibitoren

Entsprechend dem Thema dieser Arbeit, der „Synthese und Testung neuer wasserlöslicher Cystein-Protease-Inhibitoren mit Aziridin-2,3-dicarbonsäure-Baustein“ soll hier auf die Hydrophilie/Lipophilie der Inhibitoren eingegangen werden.

Wie in Kap. 1.1 bereits erwähnt, wird die Bioverfügbarkeit von einer Reihe von Faktoren beeinflusst, darunter auch von der Lipophilie. Für neutrale Moleküle wird die Lipophilie als logP-Wert angegeben, für ionisierbare Moleküle als pH-abhängiger logD-Wert.

$$\log P_{Oct/H_2O} = \log \left(\frac{\text{Substanz}_{Octanol}}{\text{Substanz}_{\text{nicht-ionisiertes Wasser}}} \right) \quad \log D_{Oct/H_2O}(pH) = \log \left(\frac{\text{Substanz}_{Octanol}}{\left(\text{Substanz}_{\text{nicht-ionisiertes Wasser}} \right) + \left(\text{Substanz}_{\text{ionisiertes Wasser}} \right)} \right)$$

Für lipophile Verbindungen ergeben sich so positive logP/D-Werte, da diese eher in der organischen Phase vorliegen. Polare Verbindungen zeigen folglich negative Werte. Die logD-Werte berücksichtigen dabei die unterschiedlichen neutralen bzw. ionisierten Anteile abhängig vom pH-Wert. Für nicht ionisierbare Verbindungen entspricht der logD- dem logP-Wert. Bei ionisierbaren Verbindungen besteht weiter folgender Zusammenhang,

$$\log D_{pH} = \log P - (1 + 10^{pH-X}) \quad \text{mit } X = pK_a/pH \text{ für Säuren/Basen bzw.}$$

$$\log D_{pH} = \log P - c_D$$

mit logP für die Lipophilie der neutralen Verbindung und logD für die Lipophilie bei einem bestimmten pH-Wert. Da der Faktor c_D stets größer/gleich Null ist, folgt für den logD, dass dieser stets kleiner/gleich dem logP-Wert ist. Anders ausgedrückt: ionische Verbindungen zeigen natürlich aufgrund ihrer Polarität die höhere Wasserlöslichkeit.^{164–166}

Im Gegensatz zur in der medizinischen Chemie weit verbreiteten Methode, die Lipophilie als Verteilungskoeffizient zwischen Octanol und Wasser zu ermitteln, lässt sich diese auch weniger zeitintensiv mittels HPLC bestimmen. Grundlage ist die gute Korrelation zwischen Verteilungskoeffizienten logP (für neutrale Moleküle) bzw. logD (für ionisierbare Moleküle) und der Retentionszeit der Moleküle an der stationären Phase der RP-18-Säule. Für isokratische HPLC-Läufe ließen sich diese sogar über folgenden Zusammenhang bestimmen:^{167–169}

$$\log P/D = a * \log k' + b$$

$$\text{mit } k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

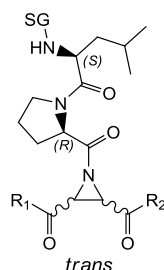
t_R = Retentionszeit der Substanz

t_0 = Totzeit (Einspritzpeak der mobilen Phase)

Voraussetzung für die Bestimmung ist aber zusätzlich der Einsatz von Referenzsubstanzen mit bekannten $\log P/D$ -Werten, um die Parameter a und b zu ermitteln.

Die folgende Übersicht der dargestellten Inhibitoren ist relativ zu ihrer Hydrophilie sortiert (Tab. 3.3-1). Für die Reihenfolge wurden identisch verlaufende analytische HPLC-Läufe (siehe auch Kap. 8.2) durchgeführt. Auch wenn keine absoluten $\log P/D$ -Werte bestimmt wurden, zeigen sich gute Korrelationen zwischen den Retentionszeiten und den berechneten^{170–173} $\log P/\log D/\text{clogP}$ -Werten ($\log D$: pH ~ 5, Ameisensäure als mittelstarke Säure).

Tab. 3.3-1: Dargestellte Inhibitoren in der Reihenfolge ihrer Retentionszeiten mit berechneten $\log P/\text{clogP}$ -Werten für neutrale Verbindungen und berechneten $\log D_{5.0}$ -Werten für Säuren – Reste in üblicher Abkürzung bzw. als Kette plus Rest z.B. OMeCy = Cyclohexylmethyl oder OMeNaph = Naphthalin-2-ylmethyl bzw. Säure = OH



#	Lab. Nr.	SG	R ₁	R ₂	Retentionszeit [min]	$\log P^{172}/D_{5.0}^{171}$ -Wert	clogP^{170}
1	PF349	Boc	OH	OEt	12.67	$\log D_{5.0} -0.22$	3.27
2	PF382	Boc	OH	OtBu	16.07	$\log D_{5.0} 0.58$	3.97
3	PF350	Boc	OH	OEtPh	16.60	$\log D_{5.0} 1.45$	4.83
4	PF400	Boc	OH	OPrPh	17.29	$\log D_{5.0} 1.88$	5.21
5	PF381	GlycAc	OBn	OBn	19.79	2.60 ± 0.73	4.60
6	PF326*	GlycAc	OBn	OBn	19.86	2.61 ± 0.74	4.60
7	PF345	Boc	OH	OMeCy	20.25	$\log D_{5.0} 1.63$	5.39
8	PF270	Boc	OBn	OEt	21.73	3.23 ± 0.78	5.24
9	PF128**	Boc	OBn	OBn	nd	4.52 ± 1.15	6.30
10	PF180	Boc	OBn	OBn	22.90	4.56 ± 1.17	6.42
11	PF289	Boc	OBn	OtBu	24.13	4.15 ± 1.13	5.95

12	PF272	Boc	OBn	OEtPh	24.13	4.86 ± 1.18	6.81
13	PF257	Boc	OEtPh	OEtPh	25.28	5.15 ± 1.21	7.20
14	PF317	Boc	OBn	OPrPh	25.68	5.25 ± 1.27	7.19
15	PF294	Boc	OBn	OMeNaph	26.05	5.59 ± 1.36	7.60
16	PF362	Boc	OPrPh	OPrPh	26.73	5.92 ± 1.40	7.95
17	PF253	Boc	OBn	OMeCy	27.07	5.19 ± 1.36	7.36
18	PF284	Cbz	OMeCy	OMeCy	29.91	6.16 ± 1.65	8.77
19	PF258	Boc	OMeCy	OMeCy	30.73	5.76 ± 1.59	8.30

* Derivat **PF326** trägt anstelle des (S)-Leu (S)-Ile im Dipeptid

** Derivat **PF128** trägt als Tripeptid anstelle des Aziridin-2,3-dicarboxylats (S)-Asp(OBn)₂

Ausnahmen machen die berechneten logP-Werte der Verbindungen mit Cyclohexyl-Rest(en), die nicht perfekt in die Retentions-Reihenfolge passen, aber zumindest relativ innerhalb ihrer Gruppe eine passende Reihenfolge liefern. Weiterhin wird die Cbz-Schutzgruppe als tendenziell zu lipophil, und die GlycAc-Schutzgruppe und der *tert*-Butylester als tendenziell zu hydrophil errechnet.

Insgesamt wurden neben den fünf 3-Carbonylaziridin-2-carbonsäure-basierten Inhibitoren, die aufgrund ihrer Carboxy-Funktion deutlich besser wasserlöslich sind, zwei Derivate mit hydrophiler Schutzgruppe hergestellt. Der Einfluss der GlycAc-Schutzgruppe auf die Hydrophilie zeigt sich in der Retentionszeit dabei sehr deutlich. Die Derivate **PF270** und **PF289** sind als Edukte der Halbestere **PF345** und **PF382** bereits weniger lipophil, ab **PF272** folgen die Derivate mit höherer Lipophilie im Vergleich zu den Leitstrukturen **RV122C/CS09**.

Die berechneten clogP-Werte (*calculated* logP, „Goldstandard“ der Verteilungskoeffizientberechnung)¹⁷⁴ sollen später, zumindest in ihrer relativen Aussagekraft zueinander, in die Beurteilung der Effizienz der Inhibitoren einfließen.

4. Ergebnisse: Biochemische und biologische Untersuchungen

4.1 Enzymkinetik

4.1.1 Einführung zur Enzymkinetik und Hemmmechanismen

Wie in Kap. 1.1 erwähnt, sind Enzyme die Katalysatoren der Natur. Sie sorgen für ein Absenken der Aktivierungsenthalpie $\Delta^\ddagger G$, die aufgebracht werden muss, um im Reaktionsverlauf vom Edukt (bzw. Substrat) zum Produkt zu gelangen. Je weiter diese Barriere abgesenkt wird, desto schneller verläuft die Reaktion. Die Triebkraft für die Reaktion, die freie Enthalpie $\Delta_R G$, bleibt dabei von der Katalyse unberührt (Abb. 4.1.1-1).

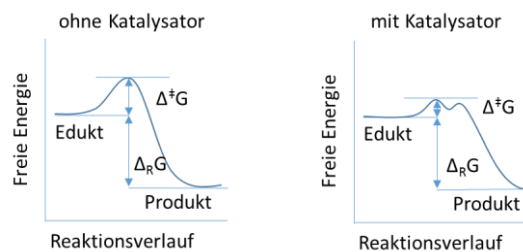


Abb. 4.1.1-1: Reaktions-Energie-Diagramm ohne und mit Katalysator

Die Enzymkinetik befasst sich nun mit der Messung und mathematischen Beschreibung dieser Reaktionsgeschwindigkeiten sowie der Reaktionsgleichgewichte und der sich daraus ergebenden Konstanten.

In einer Enzym-katalysierten Reaktion wird ein Substrat [S] von einem Enzym [E] zum Produkt [P] umgesetzt (Abb. 4.1.1-2). Dabei gibt es zwei Modellvorstellungen, die des Schlüssel-Schloss-Prinzips mit starrem Enzym von Emil Fischer und die des *induced fit*, der induzierten Anpassung des Enzyms durch die Bindung des Liganden.¹⁵



Abb. 4.1.1-2: Enzymatische Katalyse eines Substrats

Trägt man die Initialgeschwindigkeiten einer Enzym-katalysierten Reaktion gegen die jeweils eingesetzten Substratkonzentrationen auf, ergibt sich eine typische Sättigungskurve, die mit der Michaelis-Menten-Gleichung¹⁷⁵ beschrieben werden kann. Abb. 4.1.1-3 zeigt das allgemeine Schema einer Enzym-katalysierten Reaktion.



Abb. 4.1.1-3: Schema einer enzymatischen Reaktion: Produktbildung über einen Enzym-Substrat-Komplex

Dabei wird in der Reaktion zunächst ein Enzym-Substrat-Komplex [ES] gebildet, von dem aus das Substrat zum Produkt umgesetzt werden kann. Die Ausbildung dieses Komplexes ist aber reversibel, der Komplex kann also auch ohne Reaktion wieder zerfallen. Auch eine Rückreaktion (k_2) vom Produkt aus ist möglich. Am Beginn einer Reaktion kann diese Rückreaktion aufgrund fehlenden Produkts aber vernachlässigt werden. Somit gilt dann für die zeitliche Änderung der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes:¹⁷⁶

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (1)$$

Die Enzymkonzentration [E] lässt sich auch als Teil der Gesamtkonzentration an Enzym $[E]_{ges}$ abzüglich des im Enzym-Substrat-Komplex [ES] gebundenen Enzyms beschreiben.

$$[E] = [E]_{ges} - [ES] \quad (2)$$

Wird (2) in (1) eingesetzt ergibt sich:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1([E]_{ges} - [ES])[S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (3)$$

Weiterhin wird angenommen, dass sich während der Reaktion ein Fließgleichgewicht einstellt, und die Konzentration an Enzym-Substrat-Komplex über die Zeit konstant bleibt:

$\frac{d[ES]}{dt} = 0$ Damit wird aus (3):

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2} \quad (4)$$

Wird $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ definiert, ergibt sich aus (4):

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (5)$$

Und mit (2) in (5) folgt:

$$[ES] = [E]_{ges} \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (6)$$

Für die Reaktionsgeschwindigkeit der Produktbildung zum Zeitpunkt Null gilt $v_0 = k_2[ES]$, und damit wird aus (6):

$$v_0 = k_2[E]_{ges} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (7)$$

Für den Fall, dass jedes Enzym mit Substrat gesättigt vorliegt, $[E]_{ges}$ gleich $[ES]$ ist, erhält man das Maximum an möglichem Substratumsatz. Diesen Fall beschreibt die *Michaelis-Menten-Gleichung*:¹⁷⁵

$$v_0 = v_{max}[E]_{ges} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (8)$$

Die Werte K_M und v_{max} sind durch unterschiedliche Auftragungen bestimmbar. Im *Lineweaver-Burk-Plot*¹⁷⁷ wird z.B. durch Auftragung des Kehrwerts der Geschwindigkeit V gegen den Kehrwert der Substratkonzentration $[S]$ ein linearer Zusammenhang erhalten, aus dem sich $\frac{1}{v_{max}}$ aus dem Schnittpunkt mit der Y-Achse und, $-\frac{1}{K_M}$ aus dem Schnittpunkt mit der X-Achse ergibt.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{v_{max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

Der *Lineweaver-Burk-Plot* kann vor allem auch zur Differenzierung zwischen den Hemmtypen herangezogen werden.

Da bereits experimentell nachgewiesen wurde, dass Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Hemmstoffe kompetitiv-irreversible Inhibitoren sind,^{96,178} werden auch die Inhibitoren dieser Arbeit als kompetitiv-irreversible, kovalent ins aktive Zentrum bindende Inhibitoren behandelt.

Im Folgenden soll daher auf die Bestimmung der Art der Enzymhemmung (reversibel oder irreversibel) und dabei auftretende Probleme eingegangen werden.

4.1.2 Arten der Enzymhemmung – reversibel und irreversibel

Die Art der Enzymhemmung lässt sich meist schon anhand der Struktur des Inhibitors bzw. anhand seiner reaktiven Gruppe abschätzen. Eine endgültige Bestätigung kann aber erst durch weitere Untersuchungen erhalten werden.¹⁷⁶ Zu diesen gehören z.B. Dialyse oder Gelfiltration, die darauf abzielen bei reversiblen Inhibitoren diese wieder abzutrennen und Enzymaktivität zurückzugewinnen. Bei irreversiblen Inhibitoren ist dies nicht möglich. Eindeutige Nachweise liefern die Röntgenstrukturanalyse eines mit dem Enzym kokristallisierten Inhibitors oder die massenspektroskopische Analyse des Enzym-Inhibitor-Komplexes nach tryptischem Verdau.

Schneller und einfacher lässt sich die Art der Enzymhemmung durch die Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Enzymhemmung ableiten:

Unter *steady-state*-Bedingungen ($[S] \gg [E]$) setzt das Enzym Substrat konstant zum Produkt um. Wird ein Inhibitor hinzugegeben, verändert sich nun durch dessen Einfluss die Geschwindigkeit des Substratumsatzes. Bei reversiblen Inhibitoren ist durch die temporäre Besetzung der aktiven Zentren im Mittel dauerhaft ein Teil der Enzymmenge nicht an der Substratumsetzung beteiligt. Die Enzymaktivität wird also herabgesetzt auf ein, je nach Stärke und/oder Konzentration des Inhibitors, niedrigeres aber konstantes Niveau. Man spricht von nicht-zeitabhängiger Enzymhemmung. Im Gegensatz dazu werden beim Einsatz eines irreversiblen Inhibitors nach und nach die aktiven Zentren dauerhaft blockiert. Die Enzymaktivität fällt folglich mit der Zeit, da die Menge der zur Umsetzung des Substrats noch fähigen Enzym-Moleküle bis zur vollständigen Besetzung aller aktiven Zentren abnimmt (Abb. 4.1.2-1). Diese Beobachtung wird als zeitabhängige Enzymhemmung bezeichnet.

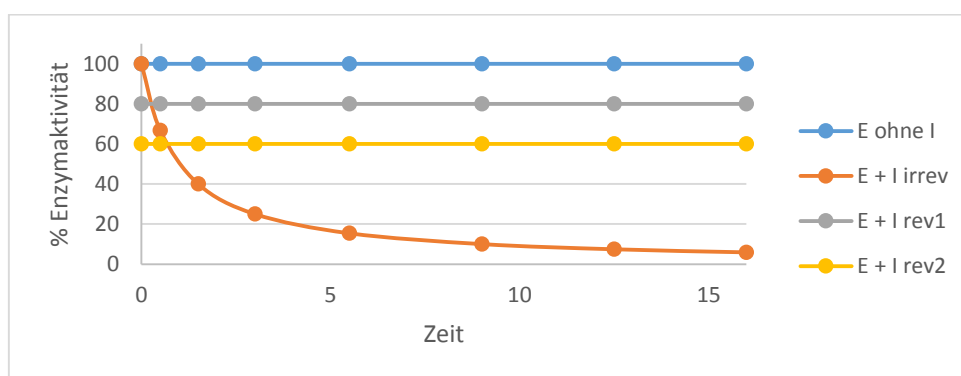


Abb. 4.1.2-1: Vergleich der zeitabhängigen (I irrev) und nicht-zeitabhängigen (I rev1/2) Enzymhemmung

Aus den erhaltenen Daten der Enzymassays lassen sich die jeweiligen charakteristischen Hemmkonstanten ableiten, die im nächsten Kapitel diskutiert werden. Diese erlauben Aussagen über die Stärke der Inhibitoren und lassen Vergleiche zwischen den Inhibitoren zu.

4.1.3 Enzymkinetik der irreversiblen Hemmung

Die Kinetik der irreversiblen Hemmung von Enzymen wird durch die erweiterte Michaelis-Menten-Theorie¹⁷⁵ beschrieben. Das erweiterte Reaktionsschema der Charakterisierung mit einem irreversiblen Inhibitor (I), dem entsprechenden Enzym-Inhibitor-Komplex (EI), und dem inaktivierten Enzym (E-I) sieht wie folgt aus (Abb. 4.1.3-1):

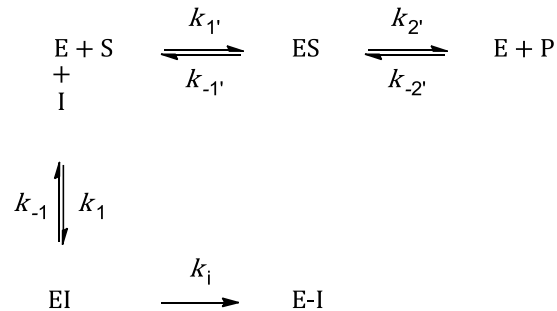


Abb. 4.1.3-1: Schema der irreversiblen Enzymhemmung durch einen kompetitiven Inhibitor

Dabei wird zuerst, in Konkurrenz zum Enzym-Substrat-Komplex [ES], ein ebenfalls reversibler Assoziationskomplex [EI] aus Enzym und Inhibitor gebildet. An die Ausbildung dieses Assoziationskomplexes schließt sich eine irreversible Reaktion mit der Geschwindigkeitskonstante k_i an. Durch die so neu gebildete kovalente Bindung wird das Enzym inaktiviert [E-I]. Der gebildete Enzym-Substrat-Komplex [ES] zerfällt mit der Geschwindigkeitskonstante k_2' zum Produkt [P] und zum freiem Enzym [E]. Sind die Assoziationsgeschwindigkeit k_1' und die Dissoziationsgeschwindigkeit k_{-1}' des Enzym-Substrat-Komplexes [ES] deutlich größer als die Geschwindigkeit dessen Zerfalls k_2' , bleibt die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes [ES] nahezu konstant. Es stellt sich ein Fließgleichgewicht ein (*steady-state*). Als Folge wird eine lineare Substratabnahme und damit eine Reaktion nullter Ordnung hinsichtlich des Substrats beobachtet. Gleiches gilt für den Assoziationskomplex [EI].

Charakteristische Konstanten bei irreversibler Enzymhemmung sind k_i , K_i und k_{2nd} :

- k_i [min^{-1}]: Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Bildung des inaktivierten Enzyms (E-I).
- K_i [M]: Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes (EI). Aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich $K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$ bzw. $K_i = \frac{(k_{-1} + k_i)}{k_1}$ was sich durch den ge-

schwindigkeitsbestimmenden Schritt der irreversiblen Reaktion zu $K_i = \frac{k_{-1}}{k_1}$ vereinfacht. Die Affinität des Inhibitors ist dabei umso größer, je kleiner der K_i -Wert ist.

- k_{2nd} [$M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]: Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der Inaktivierung. Sie ergibt sich aus $k_{2nd} = \frac{k_i}{K_i}$. Die Inaktivierung ist folglich von der Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes sowie von der Geschwindigkeitskonstante für die Bildung des inaktivierten Enzyms (E-I) abhängig. Größere k_{2nd} -Werte werden folglich entweder durch eine schnelle irreversible Reaktion (große k_i -Werte), oder durch eine hohe Affinität (kleine K_i -Werte) erhalten.

Herleiten lassen sich die charakteristischen Konstanten wie folgt:¹⁷⁶

Die Gesamtkonzentration an Enzym $[E]_0$ ist die Summe aus:

$$[E]_0 = [E] + [EI] + [E-I] = [E]_a + [E-I] \quad (1)$$

Dabei entspricht $[E]_a$ der Summe der aktiven Enzyme, die Substrat umsetzen können. Bei Substratüberschuss ist es möglich, dass der Inhibitor vor der irreversiblen Inaktivierungsreaktion aus $[EI]$ verdrängt wird. Unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung ($[I] \gg [E]_0$) besteht ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Bildung von $[E-I]$ und des reversiblen Komplexes $[EI]$:

$$\frac{d[E-I]}{dt} = -\frac{d([E]_0 - [E]_a)}{dt} = k_i * [EI] \quad (2)$$

Da $[E]_0$ konstant ist, und damit $\frac{d[E]_0}{dt} = 0$ ist, vereinfacht sich die Gleichung zu:

$$-\frac{d[E]_a}{dt} = k_i * [EI] \quad (3)$$

Gleichung (1) lässt sich unter der Berücksichtigung der Dissoziationskonstante der reversiblen Bindung des Inhibitors wie folgt umformen:

$$[EI] = \frac{[E]_a}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (4)$$

Und aus (4) in (3) wird für die Abnahme der Enzymaktivität:

$$-\frac{d[E]_a}{dt} = k_i * \frac{[E]_a}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (5)$$

Die Integration von $[E]_0$ zur Zeit $t = 0$ nach $[E]_a$ zur Zeit t :

$$-\int_{[E]_0}^{[E]_a} \frac{d[E]_a}{dt} = \int_{t=0}^t \frac{k_i * [E]_a}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad \text{ergibt} \quad \ln \frac{[E]_a}{[E]_0} = -\frac{k_i * t}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (6)$$

Unter *steady-state*-Bedingungen ($[S] \gg [E]_0$) folgt die Abnahme der Enzymaktivität einer Kinetik pseudo-erster Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstante k_{obs} :

$$\ln \frac{[E]_a}{[E]_0} = -k_{obs} * t \quad (7)$$

Durch Einsetzen von (7) in (6) wird folgende Funktion erhalten:^{15,176,179}

$$-k_{obs} * t = -\frac{k_i * t}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad \rightarrow \quad k_{obs} = \frac{k_i * [I]}{K_i + [I]} \quad (8)$$

Die Bestimmung der Hemmkonstanten k_i und K_i erfolgt nun durch nichtlineare Regressionsanalyse. Dabei wird k_{obs} gegen $[I]$ aufgetragen. Für den Fall, dass nur mit relativ geringer $[I]$ gearbeitet werden kann vereinfacht sich (8) zu:

$$\frac{k_i * [I]}{K_i} = \frac{k_{obs}}{[I]} = k_{2nd} \quad (9)$$

Das ist dann der Fall, wenn $[I] \ll K_i$ ist. Dies geschieht aufgrund schlechter Löslichkeit des Inhibitors oder schneller Inaktivierungsreaktion oder hoher Dissoziationskonstanten. Für diese Fälle wird k_{2nd} über die Auftragung von k_{obs} gegen $[I]$ als Näherung bestimmt.^{179,180}

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wird zunächst die apparente Dissoziationskonstante K_i^{app} mit Hilfe des Enzym-Kinetik-Programms *GraFit*¹⁸¹ bestimmt. Da Inhibitor und Substrat um die Bindungsstelle konkurrieren, muss die bei der Messung vorliegende Substratkonzentration $[S]$ sowie die enzymeigene Affinität des Substrats K_M berücksichtigt werden. Erst dies ermöglicht den absoluten Vergleich der bestimmten Hemmwerte. Der experimentell bestimmte K_i^{app} -Wert kann, wie der IC_{50} -Wert, unter Berücksichtigung von $[S]$ und K_M wie folgt in den K_i -Wert umgerechnet werden:¹⁷⁹

$$K_i = \frac{K_i^{app}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right)} \quad (10)$$

Wie in Kap. 4.1.2 schon thematisiert, können bei sehr langsamer Inaktivierung des Enzyms oftmals nur lineare Umsatz-Zeit-Kurven und keine zeitabhängige Hemmung beobachtet werden. Die Auswertung und Bestimmung der IC_{50} -Werte erfolgt dann durch drei verschiedene Gleichungen, wobei in jedem Fall die Gleichung vorgezogen werden sollte, die den besten Fit liefert. Die Parameter für die Gleichungen sind dabei: y [dF/min] als Substrathydrolyserate des Enzyms gemessen als Fluoreszenzzunahme pro Zeit [dF/min], $y_{min/max}$ als Mini-

mum/Maximum der Substrathydrolyse (minimale Substrathydrolyse ohne Enzym, maximale Substrathydrolyse ohne Inhibitor) und s als *slope factor* der die Steigung im mittleren linearen Teil der IC_{50} -Kurve beschreibt.

- Die 4-Parameter-Gleichung: „ IC_{50} - 4 Parameter Logistic, no estimates“

$$y = \frac{y_{max} - y_{min}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^s} + y_{min} \quad (11)$$

- Die 3-Parameter-Gleichung: „ IC_{50} - Start at 0, defined End“

$$y = \frac{y_{max} - y_{min}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^s} \quad \text{bzw.} \quad y = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^s} \quad (12)$$

mit $y_{min} = 0$ und $y_{max} = v_0$, d.h. der Hydrolyserate ohne Inhibitor.

- Die 1-Parameter-Gleichung: „reversibel, Dixon“¹⁷⁹

$$y = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{[I]}{K_i^{app}}\right)} \quad (13)$$

für optimale Bedingungen mit dem *slope factor* = 1.

Für kompetitive Inhibitoren entspricht der IC_{50} -Wert dem K_i^{app} -Wert und liefert durch Umrechnung nach Gleichung (10) den entsprechenden K_i -Wert.

Problematisch wird die Auswertung, wenn ein Inhibitor ein Enzym nur sehr langsam inaktiviert. Dann wird im Enzymassay eine fast lineare Umsatz-Zeit-Kurve beobachtet, und damit eine nicht-zeitabhängige Hemmung. Auch wenn die Inhibitoren das Enzym irreversibel hemmen, lassen sich in diesem Fall die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung nicht bestimmen. Stattdessen können aber IC_{50} -Werte wie bei reversibler Hemmung bestimmt werden. Der direkte Vergleich von IC_{50} -Werten ist jedoch nur bei einer Inhibitor-Serie sinnvoll, bei der die Hemmung unter identischen Bedingungen bestimmt wurde. Für den Vergleich unter unterschiedlichen Bedingungen werden K_i -Werte benötigt. Der Zusammenhang zwischen IC_{50} -Wert und K_i , $[S]$ und K_M ist durch die *Cheng-Prusoff*-Gleichung gegeben.¹⁸²

$$IC_{50} = K_i * \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right)$$

Irreversible und reversible Inhibitoren mit langsamer Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes (*tight binding*) über IC_{50} -Werte zu charakterisieren, birgt zudem weitere Fehlerquellen. Der IC_{50} -Wert ist neben der Natur des Substrats und dessen Konzentration auch abhängig von der Inkubationszeit. Längere Inkubationszeiten von Enzym und Inhibitor vor der Zugabe des Substrats führen zu kleineren IC_{50} -Werten, exponentiell abhängig von der Zeit.^{21,179}

4.1.4 Fluorimetrische Enzymassays nach Tian und Tsou – Theorie und Durchführung

Der sog. kontinuierliche Assay nach Tian und Tsou¹⁸³ bestimmt kontinuierlich die Produktzunahme über die Zeit aus der Mischung von Enzym, Substrat und Inhibitor. Dabei liegen sowohl Inhibitor als auch Substrat in großem Überschuss zum Enzym vor. Dadurch erfolgt die Produktbildung unter den für die Auswertung nötigen *steady-state*-Bedingungen nach einer Kinetik pseudo-erster Ordnung. Der Verlauf der Produktzunahme kann für eine zeitabhängige Hemmung über folgende Gleichung (A) beschrieben werden:

$$F = A * (1 - e^{-k_{obs}*t}) + B + offset \quad (A)$$

Wobei F die Fluoreszenzintensität, die proportional zur Konzentration des gebildeten Produkts [P] ist, und *offset* die Hintergrundfluoreszenz angibt. A ist ein Faktor, der proportional zur maximalen finalen Produktkonzentration [P][∞] bei vollständiger Inaktivierung des Enzyms ist. A und B (= $v_s * t$) hängen dabei von der Initialgeschwindigkeit v_i und der Geschwindigkeit bei *steady-state* der Reaktion v_s bei Anwesenheit eines Inhibitors ab. Diese Geschwindigkeiten ergeben sich aus den Steigungen der Umsatz-Zeit-Kurven. k_{obs} ist die apparente Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung für die Umwandlung zwischen der Initialgeschwindigkeit v_i und der Geschwindigkeit bei *steady-state* der Reaktion v_s . Im Falle irreversibler Hemmung wird $v_s = 0$ (und damit B = 0). Eine Voraussetzung für die Auswertung der Messungen ist, dass die Umsatz-Zeit-Kurve in Abwesenheit eines Inhibitors während der Messzeit linear verläuft, und die Reaktionsgeschwindigkeit nicht als Folge sinkender Substratkonzentration abnimmt.¹⁷⁹

Diese Erläuterungen werden in den nächsten Abbildungen an zwei Beispielen veranschaulicht.

Abbildung 4.1.4-1 zeigt die nicht-zeitabhängige Hemmung von Cruzain durch **PF257**. Die Umsatz-Zeit-Kurven mit Inhibitor verlaufen nahezu linear.

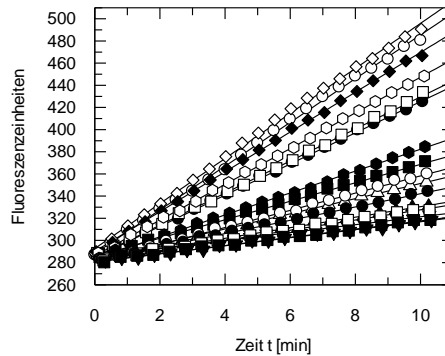


Abb. 4.1.4-1: Verlaufskurven der Substrathydrolyse ohne ($[I] = 0 \mu\text{M}$) und mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen am Beispiel der nicht-zeitabhängigen Enzymhemmung von **PF257** an Cruzain ($[I] = 0, 10, 20, 40, 50, 60, 80, 100 \mu\text{M}$).

Abbildung 4.1.4-2 zeigt die zeitabhängige Hemmung von LmCPB2.8 durch **PF350**. Die Steigungen der Umsatz-Zeit-Kurven mit Inhibitor nehmen im Verlauf ab.

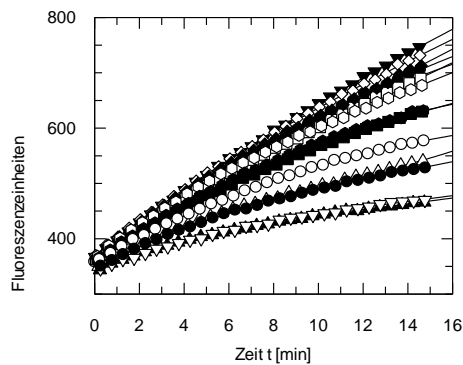


Abb. 4.1.4-2: Verlaufskurven der Substrathydrolyse ohne ($[I] = 0 \mu\text{M}$) und mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen am Beispiel der zeitabhängigen Enzymhemmung von **PF350** an LmCPB2.8 ($[I] = 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 12.5, 15 \mu\text{M}$).

Für nicht-zeitabhängige Hemmung werden IC_{50} -Werte (und als Folge auch die K_I -Werte) bestimmt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten, erhalten aus den Steigungen des linearen Teils der Umsatz-Zeit-Kurven, werden gegen die Inhibitorkonzentration gefittet (Abb. 4.1.4-3).

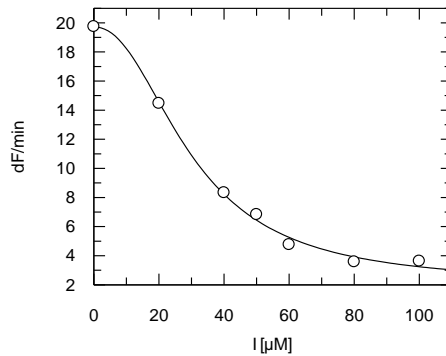


Abb. 4.1.4-3: Die Steigungen der Umsatz-Zeit-Kurven (Gleichung A, Abb. 4.1.4-1) der konstanten ersten Minuten der Umsatz-Zeit-Kurven werden (hier am Beispiel von **PF257**) gegen die Inhibitorkonzentrationen ($[I] = 0, (10), 20, 40, 50, 60, 80, 100 \mu\text{M}$) aufgetragen und mit Hilfe der Gleichung, die den besten Fit zur Ermittlung des K_I^{app} -Werts liefert, ausgewertet (siehe auch Kap. 4.1.3).

Abbildung 4.1.4-2 zeigte ein Umsatz-Zeit-Diagramm der zeitabhängigen Hemmung von LmCPB2.8 durch **PF350**. Die IC_{50} -Werte für solche Hemmstoffe werden aus den Steigungen der ersten Minuten der Umsatz-Zeit-Kurve, also aus dem linearen Bereich der Kurven, durch Anfitzen der Steigungen gegen die Inhibitor-Konzentrationen erhalten (Abb. 4.1.4-4).

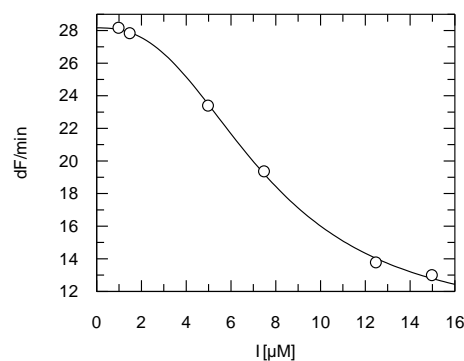


Abb. 4.1.4-4: Die Steigungen der Umsatz-Zeit-Kurven (Gleichung A, Abb. 4.1.4-2) der konstanten ersten Minuten der Umsatz-Zeit-Kurven werden (hier am Beispiel von **PF350**) gegen die Inhibitorkonzentrationen ($[I] = 0, 1, (2.5), 5, 7.5, 12.5, 15 \mu\text{M}$) aufgetragen und mit Hilfe der Gleichung, die den besten Fit zur Ermittlung des K_I^{app} -Werts liefert, ausgewertet (siehe auch Kap. 4.1.3).

Für solche Hemmstoffe sind zusätzlich die k_r - und k_{2nd} -Werte zu bestimmen. Dafür werden die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung der Hemmung k_{obs} benötigt, die durch Anfitzen der Umsatz-Zeit-Kurven an Gleichung (A) erhalten werden. Die so erhaltenen k_{obs} -Werte werden dann gegen die Inhibitorkonzentrationen aufgetragen und an die folgende nicht-lineare Gleichung (B) angefitzt (Abb. 4.1.4-5):¹⁷⁹

$$k_{obs} = \frac{k_i[I]}{K_i^{app} + [I]} \quad (B)$$

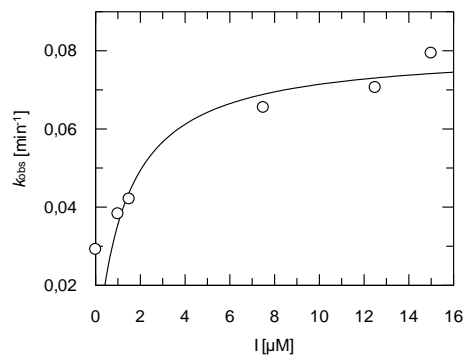


Abb. 4.1.4-5: Die k_{obs} -Werte aus den Umsatz-Zeit-Kurven (Gleichung A, Abb. 4.1.4-2) werden in die hyperbolische Gleichung (B) eingepasst, und so k_i und K_i^{app} erhalten. Hier am Beispiel von **PF350** an der *Leishmania*-Protease LmCPB2.8 ($[I] = 0, 1, 2.5, (5), 7.5, 12.5, 15 \mu\text{M}$).

Die fluorimetrischen Enzymassays nach Tian und Tsou wurden mit einem Fluoreszenzspektrometer bei 20 °C in weißen 96-Well-Mikrotierplatten unter Verwendung von Z-Phe-Arg-AMC als Substrat durchgeführt. Das Substrat selbst zeigt nur eine geringe Fluoreszenz. Durch die enzymatische Spaltung der Amidbindung zwischen Arg und AMC wird allerdings Letzteres frei und ist in der Lage, nach Anregung durch Licht der Wellenlänge von 380 nm, Licht der Wellenlänge von 480 nm zu emittieren.¹⁸⁴ Die Detektion des emittierten Lichts erfolgte bei 480 nm und die gemessene Fluoreszenz ist proportional zur gebildeten Produktkonzentration.

Alle Substrat- und Inhibitor-Stammlösungen wurden in DMSO hergestellt. Jede Inhibitorkonzentration wurde in unabhängigen Assays jeweils doppelt vermessen, ebenso wie die jeweilige Negativkontrolle (DMSO). Tab. 4.1.4-4 zeigt die Übersicht der Enzym-Assay-Bedingungen mit Substratkonzentrationen $[S]$ und K_M -Werten der Enzyme. Detaillierte Enzym-Assay-Bedingungen sind in Kap. 8.5 aufgeführt.

Tab. 4.1.4-4: Bedingungen der Enzym-Assays: Substrat in allen Fällen: Z-Phe-Arg-AMC

Enzym	Puffer	[S]	K_M
Cathepsin-L	Tris-Puffer (pH 6.5)	6.25 μ M	6.5 μ M
Cathepsin-B	Tris-Puffer (pH 6.5)	100 μ M	150 μ M
Cruzain	Acetat-Puffer (pH 5.5)	5.0 μ M	1.5 μ M
Falcipain-2	Acetat-Puffer (pH 5.5)	25.0 μ M	21.5 μ M
LmCPB2.8	Phosphat-Puffer (pH 6.5)	10.0 μ M	5.0 μ M
Rhodesain	Acetat-Puffer (pH 5.5)	10.0 μ M	826.5 nM

4.1.5 Ergebnisse der fluorimetrischen Enzymassays

Vor der Bestimmung der Hemmkonstanten wurde im Screening die Hemmung der Enzyme bei 20 μ M Inhibitor bestimmt. Von den aktiven Substanzen, die bei 20 μ M eine Hemmung von > 50 % zeigten, wurden durch kontinuierliche Assays nach Tian und Tsou und durch Auswertung mittels *GraFit* die charakteristischen Hemmkonstanten bestimmt. Dabei wurden Verdünnungsreihen mit DMSO-Kontrolle ([I] = 0 μ M) und je sieben verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen jeweils doppelt vermessen. Bis auf drei Inhibitoren mit 3-Carbonylaziridin-2-carbonsäure-Baustein (**PF345**, **PF350** und **PF400**) zeigten alle Derivate nicht-zeitabhängige Enzymhemmungen. Für diese wurden K_I -Werte wie in Kap. 4.1.3 beschrieben über IC_{50} -Werte bestimmt.

Tabelle 4.1.5-1 zeigt die ermittelten Hemmkonstanten für nicht-zeitabhängige Hemmung. Zum Vergleich sind außerdem die Hemmkonstanten der Leitstrukturen **RV122C** und **CS09** aufgeführt.

Tab. 4.1.5-1: Nicht-zeitabhängige Hemmung von Cathepsin-L (Cath-L), Cathepsin-B (Cath-B), Cruzain (Cruz), Falcipain-2 (Fal-2), LmCPB2.8 (LmCPB) und Rhodesain (Rho). Angegeben sind ermittelte IC₅₀- und daraus berechnete K_i-Werte in μM, außerdem theoretische* K_i-Werte des Diastereomerenpaares **PF180** in μM – ni = no inhibition, IC₅₀ > 20 μM – Reste in üblicher Abkürzung bzw. als Kette plus Rest z.B. OMeCy = Cyclohexylmethyl oder OMeNaph = Naphthalin-2-ylmethyl – Allgemeine Struktur: SG-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(R₁)(R₂)

Lab. Nr.	SG	R ₁	R ₂	Cath-L	Cath-B	Cruz	Fal-2	LmCPB	Rho
RV122C K _i [μM]	Boc	OBn	OBn	6.0	ni	0.9	209	1.7	1.2
CS09 K _i [μM]	Boc	OBn	OBn	ni	ni	ni	ni	3.8	1.7
PF180 ^{theor.*} K _i [μM]	Boc	OBn	OBn	12.0 ^{theor.*}	ni	1.8 ^{theor.*}	ni	2.8 ^{theor.*}	1.5 ^{theor.*}
PF381	GlycAc	OBn	OBn	ni	ni	ni	ni	ni	ni
PF326 **	GlycAc	OBn	OBn	ni	ni	ni	ni	ni	ni
PF270	Boc	OBn	OEt	ni	ni	ni	ni	ni	ni
PF289	Boc	OBn	OrBu	ni	ni	ni	ni	ni	ni
PF272 IC ₅₀ [μM] K _i [μM]	Boc	OBn	OEtPh	ni	ni	24.0±0.8 5.5±0.2	ni	5.8±0.2 1.92±0.06	ni
PF257 IC ₅₀ [μM] K _i [μM]	Boc	OEtPh	OEtPh	ni	ni	33.3±3.2 7.7±0.7	ni	4.7±0.3 1.6±0.1	ni
PF317 IC ₅₀ [μM] K _i [μM]	Boc	OBn	OPrPh	ni	ni	ni	ni	4.1±0.1 1.36±0.05	ni
PF294 IC ₅₀ [μM] K _i [μM]	Boc	OBn	OMeNaph	ni	ni	ni	ni	2.3±0.8 0.8±0.3	ni
PF362 IC ₅₀ [μM] K _i [μM]	Boc	OPrPh	OPrPh	ni	ni	ni	ni	2.6±0.3 0.9±0.1	ni
PF253 IC ₅₀ [μM] K _i [μM]	Boc	OBn	OMeCy	ni	ni	33.0±2.9 7.6±0.7	ni	5.4±1.4 1.8±0.4	ni
PF284 IC ₅₀ [μM] K _i [μM]	Cbz	OMeCy	OMeCy	ni	ni	ni	ni	6.8±0.5 2.3±0.2	ni
PF258 IC ₅₀ [μM] K _i [μM]	Boc	OMeCy	OMeCy	ni	ni	ni	ni	2.3±0.2 0.77±0.05	ni
PF128 ***	Boc	OBn	OBn	ni	ni	ni	ni	ni	ni

* Das Diastereomerenpaar **PF180** wurde nicht getestet. Der theoretische Wert ist abgeleitet aus den Testergebnissen von **RV122C** und **CS09**. Detaillierte Erklärung siehe nächste Seite.

** Derivat **PF326** trägt anstelle von (S)-Leu (S)-Ile im Dipeptid

*** Derivat **PF128** trägt anstelle des Aziridin-2,3-dicarboxylats (S)-Asp(OBn)₂

Ein erster Vergleich der Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Inhibitoren der **PF**-Reihe mit den Leitstrukturen zeigt, dass die neuen Diester-Derivate eine verbesserte Selektivität innerhalb der Cathepsin-L-Familie aufweisen. Hemmt **RV122C** als Vertreter der ersten Generation selektiv Cathepsin-L-ähnliche Cysteinproteasen und **CS09** als Vertreter der zweiten Generation bereits selektiv die parasitären Cathepsin-L-ähnlichen Cysteinproteasen, so sind fünf der acht **PF**-Derivate selektiv gegenüber der *Leishmania*-Protease LmCPB2.8. Nur drei **PF**-Derivate zeigen neben der Aktivität gegenüber LmCPB2.8 auch Aktivität gegenüber Cruzain. Die Leitstrukturen dieser Arbeit (**RV122C** und **CS09**) sind diastereomerenreine Verbindungen, die dargestellten Inhibitoren der **PF**-Serie hingegen Diastereomerengemische. Ein direkter Vergleich der ermittelten K_i -Werte ist daher nicht möglich. Das Diastereomerengemisch der Leitstrukturen ist **PF180**. Dieses wurde für die beschriebenen Versuche der Freisetzung der *N*-terminalen Schutzgruppe (siehe Kap. 3.1.4.2) dargestellt, die Hemmkonstanten des Gemischs aber nicht ermittelt. Für die folgende Diskussion sollen daher theoretische K_i -Werte dieses Diastereomerengemischs herangezogen werden. Diese ergeben sich als Mittelwerte der K_i -Werte beider Leitstrukturen. Im Falle der Inaktivität eines Diastereomers wird der K_i -Wert des Diastereomerengemischs **PF180** durch Verdopplung des K_i -Werts des aktiven Diastereomers erhalten, da ja dann die Konzentration des aktiven Diastereomers im 1:1-Gemisch nur die Hälfte beträgt.

Demnach erreicht **PF180** als Diastereomerengemisch aus **RV122C** und **CS09** K_i -Werte von 1.8 μM an Cruzain und 2.8 μM an LmCPB2.8. Ausgehend davon bringt der Austausch der Boc- zur GlycAc-Schutzgruppe im Derivat **PF381** wider Erwarten den Verlust jeglicher Aktivität mit sich. Der Austausch zur Cbz-Schutzgruppe im Cyclohexylmethyl-Derivat **PF284** führt hingegen nicht zum Verlust der Aktivität. Ein Vergleich der beiden Derivate Cyclohexylmethyl-Derivate **PF284** und **PF258** zeigt weiterhin, dass die Boc- der Cbz-Schutzgruppe überlegen ist. Der Tausch der Benzyl- zu den Cyclohexylmethylestern führt außerdem zu LmCPB2.8 selektiven Verbindungen. Die Substitution des Aziridinrings in **RV122C** durch das offenkettige (*S*)-Aspartat in **PF128** führt erwartungsgemäß zum Verlust jeglicher Aktivität. An der 2- bzw. 3-Position ist kein nucleophiler Angriff des Cys-Thiolats, wie für das Aziridin-2,3-dicarboxylat postuliert, möglich.

Bleibt die Boc-Schutzgruppe erhalten, geht der Austausch nur eines Benzylesters durch einen Ethylester (**PF270**) oder *tert*-Butylester (**PF289**) mit dem Verlust jeglicher Aktivität einher. Bei (kettenverlängerten) Derivaten mit Ringsystemen in den Diestern ist dies hingegen nicht der Fall. Hier lässt sich ganz allgemein ein Trend hin zur verbesserten Selektivität bei raumgreifenderen Resten (für unsymmetrische Derivate **PF294** / **PF317** und als symmetrisches Derivat **PF362**) erkennen. Diese Verbindungen inhibieren LmCPB2.8 sehr gut, während sie an Cruzain keine Aktivität aufweisen. Außerdem verbessert sich die Affinität gegen-

über LmCPB2.8 innerhalb der Reihen mit den größer werdenden Resten: für die unsymmetrischen Derivate **PF272 / PF317 / PF294** bzw. die symmetrischen Derivate **PF180 / PF257 / PF362**. Die symmetrischen Derivate liefern im direkten Vergleich mit den unsymmetrischen die niedrigeren Hemmkonstanten, also die bessere Hemmung.

Tabelle 4.1.5-2 zeigt die aus den Diester-Derivaten resultierenden Halbesten, bei denen, im Gegensatz zu ihren Edukt-Diestern, zeitabhängige Hemmung zu beobachten ist.

Tab. 4.1.5-2: Hemmkonstanten der zeitabhängigen Hemmung von Cathepsin-L (Cath-L), Cathepsin -B (Cath-B), Cruzain (Cruz), Falcipain-2 (Fal-2), LmCPB2.8 (LmCPB) und Rhodesain (Rho) – ni = no inhibition, $IC_{50} > 20 \mu M$ –
Allgemeine Struktur: SG-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OH)(R₂)

Lab. Nr.	R ₂	Cath-L	Cath-B	Cruz	Fal-2	LmCPB	Rho
PF349	OEt	ni	ni	ni	ni	ni	ni
PF382	OBu	ni	ni	ni	ni	ni	ni
PF350							
IC_{50}^* [μM]					2.7±0.5	9.3±1.7	2.14±0.03
k_i [min^{-1}]	OEtPh	ni	ni	ni	0.139**	0.084±0.004	0.291**
K_i [μM]					1.26±0.22***	0.441±0.022	0.163±0.003***
k_{2nd} [$M^{-1}min^{-1}$]					11100±939	190569±1638	178388±17140
PF400							
IC_{50}^* [μM]					62.0±8.0		
k_i [min^{-1}]	OPrPh	ni	ni	ni	0.960**	ni	ni
K_i [μM]					28.6±3.7***		
k_{2nd} [$M^{-1}min^{-1}$]					3349±48		
PF345							
IC_{50}^* [μM]		14.3±4.7		4.1±1.2	0.97±0.03	3.5±0.8	1.59±0.02
k_i [min^{-1}]	OMeCy	1.02**	ni	0.229±0.003	0.343**	0.957**	0.598**
K_i [μM]		7.3±2.4***		0.711±0.015	0.447±0.015***	1.79±0.43***	0.121±0.002***
k_{2nd} [$M^{-1}min^{-1}$]		13939±517		322531±11089	76789±2147	53595±2030	494038±6941

* IC_{50} aus dem linearen Teil der Umsatz-Zeit-Kurven ermittelt

** aus $k_{2nd} = \frac{k_i}{K_i}$ berechnet

*** siehe Kap. 4.1.3: Da $[I] \ll K_i$ wurde k_{2nd} über die Auftragung von k_{obs} gegen $[I]$ als Näherung bestimmt und K_i über die *Cheng-Prusoff*-Gleichung aus dem IC_{50} berechnet

Die Darstellung der Halbesten erfolgte mit dem Ziel, durch die Freisetzung der Carboxy-Funktion eine deutlich erhöhte Affinität an das Enzym zu generieren. Die als Diester inaktiven Derivate **PF270** und **PF289** zeigen auch als Halbesten **PF349** und **PF382** keine Aktivität.

Vergleicht man den aktiven Halbesten **PF345** mit seinem Diester **PF253**, ergibt sich für Cruzain eine deutliche Verbesserung der Affinität (**PF253** $K_i = 7.6 \mu M$, **PF345** $K_i = 0.711 \mu M$). Allerdings zeigt **PF345** innerhalb der Cathepsin-L-ähnlichen Cysteinproteasen keine Selektivität mehr. Für die Ausbildung der Selektivität scheint ein Cyclohexylmethyl-Rest sterisch zu wenig anspruchsvoll. So werden außer Cruzain sowohl die *Leishmania*-Protease LmCPB2.8 als auch Falcipain-2, Rhodesain und Cathepsin-L inhibiert. Die k_{2nd} -Werte liegen dabei in einem

Bereich von $\sim 320.000\text{-}490.000$ [$\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$] für Rhodesain und Cruzain bzw. in einem Bereich von $\sim 14.000\text{-}76.000$ [$\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$] für Cathepsin-L, Falcipain-2 und LmCPB2.8.

Vergleicht man den Halbesther **PF350** mit dem Diester **PF272** bzw. mit dem symmetrischen Bis(2-phenylethyl)-Derivat **PF257**, findet man ebenfalls eine Verbesserung der Hemmung an LmCPB2.8 (**PF272** $K_i = 1.92 \mu\text{M}$, **PF257** $K_i = 1.6 \mu\text{M}$, **PF350** $K_i = 0.441 \mu\text{M}$). Allerdings geht dies wiederum auf Kosten der Selektivität. Im Vergleich zu **PF345** wird von **PF350** allerdings weder Cathepsin-L noch Cruzain inhibiert. Das einen 2-Phenylethyl-Rest tragende Derivat **PF350** ist selektiv für parasitäre Cathepsin-L-ähnliche Cysteinproteasen und zeigt k_{2nd} -Werte von ~ 11.000 [$\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$] an Falcipain-2 und im Bereich von $\sim 180.000\text{-}190.000$ [$\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$] für LmCPB2.8 und Rhodesain. Der aus dem aktivsten unsymmetrischen Diester-Derivat **PF317** synthetisierte Halbesther **PF400** mit 3-Phenylpropyl-Rest zeigt, wie auch die eingangs diskutierte Halbesther **PF349** und **PF382**, keine Aktivität an der *Leishmania*-Protease LmCPB2.8. Dies ist verwunderlich, wurde doch **PF400** wie auch die aktiven Derivate **PF345** und **PF350** aus einem aktiven Diester dargestellt. Aufgrund der Freisetzung der Carboxy-Funktion wäre eine deutlich erhöhte Aktivität zu erwarten gewesen. Auch in Bezug auf die Selektivität, welche sich durch die Verlängerung der C-Kette zwischen **PF345** und **PF350** erhöhte, hätte man hier durch eine weitere Einheit in der C-Kette auf eine Steigerung der Selektivität hoffen können. Ist doch das Edukt von **PF400**, der unsymmetrische Diester **PF317** wie auch der symmetrische, zwei 3-Phenylpropyl-Reste tragende Diester **PF362** selektiv für die *Leishmania*-Protease LmCPB2.8. Die Testergebnisse von **PF400** zeigen trotzdem eine verbesserte Selektivität innerhalb der Halbesther, wenn auch nicht für LmCPB2.8. **PF400** ist selektiv für Falcipain-2, dies aber bei einem sehr niedrigen k_{2nd} -Wert von ~ 3400 [$\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$].

Die folgenden Grafiken (Abb. 4.1.5-3, nächste Seite) fassen die beschriebenen Trends für Cruzain und LmCPB2.8 unter Angabe der K_i -Werte zusammen.

Insgesamt betrachtet zeigt **PF350** ($K_i = 0.441 \mu\text{M}$) als Halbesther den niedrigsten K_i -Wert, und damit die beste Hemmung der *Leishmania*-Protease LmCPB2.8. **PF350** ist jedoch nicht selektiv innerhalb der Cathepsin-L-ähnlichen Cysteinproteasen der Papainfamilie. Die niedrigsten K_i -Werte gegenüber LmCPB2.8 unter den selektiven Verbindungen werden von den Diester-Derivaten **PF362** ($K_i = 0.9$), **PF294** ($K_i = 0.8 \mu\text{M}$) und **PF258** ($K_i = 0.77 \mu\text{M}$) erreicht. Der höchste k_i -Wert an LmCPB2.8, und die damit schnellste irreversible Reaktion, wird von der unselektiven Verbindung **PF345** ($k_i = 0.957 \text{ min}^{-1}$) erzielt. An Cruzain zeigt der unselektive Halbesther **PF345** den niedrigsten K_i -Wert ($0.771 \mu\text{M}$). Der zugehörige, höchste, k_i -Wert liegt bei 0.229 min^{-1} . Keines der **PF**-Derivate zeigt Selektivität gegenüber Cruzain.

Zuletzt ist **PF400** als selektiver Inhibitor von Falcipain-2 zu nennen (K_i -Wert = $28.6 \mu\text{M}$, k_i -Wert = 0.960 min^{-1}).

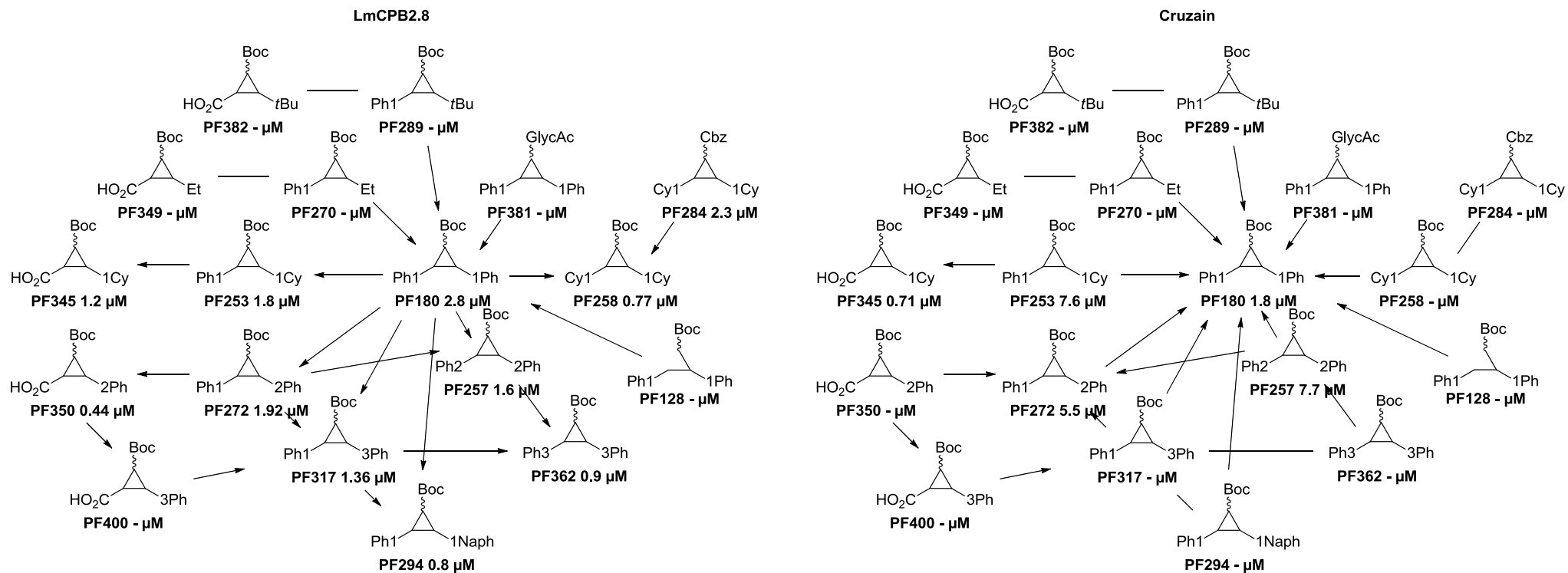


Abb. 4.1.5-3: Piktografische Übersicht der Trends für die Hemmung von LmCPB2.8 (links) und Cruzain (rechts). Neben der Schutzgruppe in üblicher Abkürzung wird das Dipeptid als Wellenlinie und das Aziridin-2,3-dicarboxylat als Dreieck angegeben (Ausnahme: offenkettiges (S)-Asp bei **PF128**). Die Reste in 2- und 3-Position sind als Gruppe oder als Zahl plus Rest angegeben, wobei die Zahl für die Kettenlänge (CH₂)_x steht (z.B. 3Ph = 3-Phenylpropyl bzw. 1Naph = Naphthalin-2-ylmethyl). Die Pfeile markieren Trends und deuten jeweils eine Verbesserung der Ergebnisse durch die Strukturvariation an (z.B. **PF294** mit niedrigeren, also besseren K_i -Wert als **PF180** für die Hemmung von LmCPB2.8 links).

4.2 Ergebnisse der Testungen auf Zytotoxizität und antiparasitäre Aktivität

Im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 630 („Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten“) wurden die synthetisierten Verbindungen in Würzburg im Teilprojekt Z1 auf antiparasitäre Aktivität sowie Zytotoxizität getestet.

Die EC_{50} -Werte *in vitro* wurden mittels Alamar Blue®-Assays bestimmt. Bei diesen wird der wasserlösliche, nicht toxische, blaue Farbstoff Alamar Blue® (Resazurin) verwendet, der in die Zellen aufgenommen und reduziert wird, wobei NADH/H⁺ verbraucht wird. Es entsteht dabei der pinkfarbene, fluoreszierende Farbstoff Resofurin. In lebenden, gesunden Zellen wird der eingesetzte Farbstoff kontinuierlich umgesetzt. Zu testende Wirkstoffe können je nach ihrer Toxizität diesen Prozess verlangsamen oder gar stoppen. Der Assay zeigt somit die katalytische Wirkung NADPH/NADH-abhängiger Dehydrogenasen bzw. anderer Redoxaktiver Systeme an. Die Konzentrationen des Farbstoffs Resofurin korreliert mit der Viabilität der Zelle. Die Absorption ist dabei proportional zur Anzahl lebender Zellen, und durch den Vergleich mit einer wirkstofffreien Kontrollprobe kann die Zytotoxizität bestimmt werden.¹⁸⁵

Für die Bestimmung der Zytotoxizität der synthetisierten Verbindungen wurde die Maus-Makrophagenzelllinie J774.1 verwendet.^{97,186} Die antitrypanosomale Aktivität wurde an Trypanosomen (*T. brucei brucei* TC 211) mit der Referenzsubstanz Pentamidin,^{95,187} anti-leishmaniale Aktivität an *Leishmania*-Promastigoten (*L. major* MHOM/IL/81/FE/BNI) mit der Referenzsubstanz Amphotericin B bestimmt.^{97,188} Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmungen mit verschiedenen Konzentrationen, wobei die optische Dichte nach 24-72 h nach der Zugabe von Alamar Blue® bestimmt wurde. Die Ergebnisse dieser Testungen sind in folgender Tabelle 4.2-1 zusammengefasst.

Tab. 4.2-1: Ergebnisse der Testungen an *L. major*-Promastigoten (*L. m. (p)*), *T. brucei brucei* (*T. b. b.*) und Zytotoxizität an Makrophagen an der Zelllinie J774.1 (Cyt. (J774.1)) in μM – Reste in üblicher Abkürzung bzw. als Kette plus Rest z.B. OMeCy = Cyclohexylmethyl oder OMeNaph = Naphthalin-2-ylmethyl bzw. Säure = OH –
Allgemeine Struktur: SG-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(R₁)(R₂)

Lab. Nr.	SG	R ₁	R ₂	<i>L. m. (p)</i> EC ₅₀ μM	<i>T. b. b.</i> EC ₅₀ μM		Cyt. (J774.1) EC ₅₀ μM
					48 h	72 h	
PF349	Boc	OH	OEt	> 100	> 40 \pm nd	> 40 \pm nd	> 100
PF382	Boc	OH	O \dagger Bu	> 100	> 40 \pm nd	> 40 \pm nd	> 100
PF350	Boc	OH	OEtPh	> 100	8.81 \pm 0.02	13.94 0.54	> 100
PF345	Boc	OH	OMeCy	> 100	> 40 \pm nd	> 40 \pm nd	> 100
PF400	Boc	OH	OPrPh	> 100	> 40 \pm nd	> 40 \pm nd	> 100
PF381	GlycAc	OBn	OBn	> 100	12.30 \pm 2.99	> 40 \pm nd	> 100
PF326*	GlycAc	OBn	OBn	75.0	9.47 \pm 0.20	15.59 \pm 0.17	> 100
PF270	Boc	OBn	OEt	46.5	33.25 \pm 0.46	> 40 \pm nd	52.6
PF289	Boc	OBn	O \dagger Bu	85.4	11.84 \pm 2.25	15.80 \pm 0.89	46.5
PF272	Boc	OBn	OEtPh	46.5	2.80 \pm 0.53	3.70 \pm 0.17	43.4
PF257	Boc	OEtPh	OEtPh	> 100	2.79 \pm 0.05	3.34 \pm 0.1	> 100
PF317	Boc	OBn	OPrPh	> 100	2.72 \pm 0.29	4.03 \pm 0.4	> 100
PF294	Boc	OBn	OMeNaph	> 100	15.34 \pm 0.20	17.15 \pm 0.44	> 100
PF362	Boc	OPrPh	OPrPh	> 100	3.58 \pm 0.05	3.60 \pm 0.17	> 100
PF253	Boc	OBn	OMeCy	> 100	3.75 \pm 0.97	7.05 \pm 0.24	47.5
PF284	Cbz	OMeCy	OMeCy	> 100	1.73 \pm 0.90	2.55 \pm 0.26	> 100
PF258	Boc	OMeCy	OMeCy	> 100	2.50 \pm 0.55	3.04 \pm 0.1	> 100

* Derivat **PF326** trägt anstelle des (S)-Leu- (S)-Ile im Dipeptid

Die meisten Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Inhibitoren zeigen keine toxische Wirkung. Die vier Inhibitoren (**PF270**, **PF289**, **PF272** und **PF253**), die zytotoxisch sind, d.h. EC₅₀-Werte < 100 μM aufweisen müssen, sind unsymmetrische Ester der Bibliothek, wobei dies nur auf die Derivate mit den kürzeren Resten zutrifft (OEt, O \dagger Bu, OMeCy und OEtPh). Die EC₅₀-Werte liegen zwischen 43.3 und 52.6 μM . Die unsymmetrischen Inhibitoren (**PF317** und **PF294**) mit den längeren Resten (OPrPh und OMeNaph), wie auch die Halbesther (**PF345**, **PF349**, **PF350**, **PF382** und **PF400**) zeigen hingegen keine Zytotoxizität.

Von den genannten zytotoxischen Inhibitoren sind gleichzeitig auch **PF270**, **PF289** und **PF282** diejenigen, die antileishmaniale Aktivität bei EC_{50} -Werten zwischen 46.5 und 85.4 μM zeigen. Meist liegen die Zytotoxizität und die antileishmaniale Aktivität dabei in der gleichen Größenordnung, es ergeben sich damit Selektivitätsindizes (SI) $EC_{50} \text{ J774.1} / EC_{50} \text{ L. m.}$ von ~ 1 . Hier ist eher davon auszugehen, dass die antileishmaniale Aktivität alleine auf die Zytotoxizität der Verbindung zurückzuführen ist. **PF253** zeigt nur toxische Wirkung an der J774.1-Zelllinie, ohne antileishmaniale Aktivität zu besitzen. Das einzig verbleibende Derivat, welches nicht toxisch ist, aber antileishmaniale Aktivität zeigt, ist **PF326**, wobei dieses mit einem EC_{50} von 75 μM keine besonders starke antiparasitäre Aktivität aufweist.

Die meisten Derivate zeigen zusätzlich antitrypanosomale Aktivität. Für die zytotoxischen Derivate ergeben sich schlechte bis tolerierbare Selektivitätsindizes ($EC_{50} \text{ J774.1} / EC_{50} \text{ T. b. b.}$) zwischen 1.58 und 12.67. Hervorzuheben ist das Derivat **PF284**, welches mit einem EC_{50} von 1.73 μM (48 h), bzw. 2.55 μM (72 h) die stärkste antitrypanosomale Aktivität zeigt, ohne dabei zytotoxisch zu sein.

Zusammenfassen lässt sich, dass weder die Halbestere noch die Diester-Derivate, unabhängig von der Hemmstärke gegenüber LmCPB2.8, an Promastigoten sehr gute Aktivität zeigen. Die gefundenen Aktivitäten im mittleren mikromolaren Bereich sind eher auf die Zytotoxizität der Verbindungen zurückzuführen. Von den an Rhodesain aktiven Verbindungen (**PF345** und **PF350**) zeigt nur **PF350** antitrypanosomale Aktivität mit EC_{50} -Werten von 8.81 μM (48 h) bzw. 13.94 μM (72 h). Mehrere an Rhodesain inaktive Derivate zeigen jedoch noch niedrigere EC_{50} -Werte, ohne dabei toxisch zu sein. Das Derivat **PF345**, welches als einziges Derivat der **PF**-Reihe humanes Cathepsin-L im Enzymassay inhibiert, zeigt an der J774.1-Zelllinie keine Zytotoxizität. Insgesamt betrachtet lassen sich keine Korrelationen zwischen den biochemischen und den biologischen Untersuchungen ableiten. Im Falle der Aktivität gegen Leishmanien ist anzumerken, dass an *L. major* getestet wurde, als Enzym jedoch nur die Protease von *L. mexicana* zur Verfügung stand, so dass hier die Daten nicht unbedingt vergleich- und korrelierbar sind.

4.3 Betrachtung der *ligand efficiency* (LE) und *ligand lipophilic efficiency* (LLE) der aktiven Derivate

Bei der Beurteilung der Effizienz von Wirkstoffen hat sich in der medizinischen Chemie die Berechnung der sog. *ligand efficiency* (Ligandeneffizienz, LE) und der sog. *ligand lipophilic efficiency* (lipophile Ligandeneffizienz, LLE) etabliert.¹⁸⁹ Grundlage für das Konzept der LE-Berechnung ist die Beobachtung, dass die Wirksamkeit analoger Derivate stark mit deren Molekulargewicht zusammenhängt.¹⁹⁰ Berücksichtigt man bei der Auswahl einer neuen Leitstruktur für weitere Optimierungen nur die Wirksamkeit in einem Enzymassay, ist dies nicht ausreichend. Es erscheint in diesem Zusammenhang zielführender die biologische Aktivität mit physikalischen Faktoren zu verknüpfen.

Im Falle der Berechnung der LE-Werte zieht man die Anzahl der Schweratome als Summe der Nicht-Wasserstoffatome heran (*heavy atom count*, HA).

$$LE = \left(\frac{pIC_{50}(\text{oder } pK_i)}{HA} \right) * 1.37$$

Die Ligandeneffizienz beschreibt damit den Beitrag zur Hemmwirkung pro Schweratom. Kleinere Moleküle erreichen damit natürlich leichter eine hohe Ligandeneffizienz als große. Der empfohlene Richtwert für Wirkstoffkandidaten liegt dabei bei > 0.3.¹⁹¹

Für den LLE-Wert wird in der Berechnung die Lipophilie einer Verbindung als physikalischer Einflussfaktor mit einbezogen. Wie in Kap. 1.1 bereits erwähnt, ist sie als logP Teil der *rule of five* und trägt damit maßgeblich zur Bioverfügbarkeit und damit auch zur Wirksamkeit bei. Aus diesem Grund hat sich die Berücksichtigung der Lipophilie über den LLE bei der Wahl einer Leitstruktur bewährt.

$$LLE = pIC_{50}(\text{oder } pK_i) - clogP(\text{oder } logD)$$

Ziel der Arzneistoffentwicklung ist es somit maximale Aktivität bei minimaler Lipophilie zu erreichen, wobei heute davon ausgegangen wird, dass Wirkstoffkandidaten einen LLE-Wert von > 5 aufweisen sollten.¹⁹¹

Um die dargestellten Derivate miteinander zu vergleichen, wurden entsprechende LE- und LLE-Werte berechnet (Tab. 4.3-1). Grundlage der Berechnung sind zum einen die in den Enzymassays an LmCPB2.8 ermittelten Dissoziationskonstanten K_i . Zum anderen entweder die Anzahl Schweratome oder die über die ChemBioOffice Ultra 13.0 Suite¹⁷⁰ errechneten clogP-Werte (siehe Kap. 3.3). Wenn auch nicht experimentell bestimmt, korrelieren Letztere wie gezeigt sehr gut mit der über analytische HPLC ermittelten Retentionsreihenfolge.

Tab. 4.3-1: Leitstrukturen (diastereomerenrein) und Derivate (*trans*-konfigurierte Diastereomere (\pm)) mit den gemessenen K_f -Werten an LmCPB2.8 in μM , der Zahl der Schweratome (HA) und den errechneten clogP -Werten und den daraus berechneten LE- und LLE-Werten – Reste in üblicher Abkürzung bzw. als Kette plus Rest z.B. OMeCy = Cyclohexylmethyl oder OMeNaph = Naphthalin-2-ylmethyl bzw. Säure = OH – Allgemeine Struktur: SG-(S)-Leu-(R)-Pro-Azi(R₁)(R₂)

Lab. Nr.	SG	<i>trans</i> (\pm) (S,S)/(R,R)	R ₁	R ₂	HA	clogP	LmCPB2.8 K_f [μM]	LE	LLE
PF349	Boc	(\pm)	OH	OEt	33	3.3	ni	-	-
PF382	Boc	(\pm)	OH	OrBu	35	4.0	ni	-	-
PF350	Boc	(\pm)	OH	OEtPh	39	4.8	0.44	0.223	1.53
PF345	Boc	(\pm)	OH	OMeCy	38	5.4	1.8	0.207	0.35
PF400	Boc	(\pm)	OH	OPrPh	40	5.2	ni	-	-
PF381	GlycAc	(\pm)	OBn	OBn	46	4.6	ni	-	-
PF326*	GlycAc	(\pm)	OBn	OBn	46	4.6	ni	-	-
PF270	Boc	(\pm)	OBn	OEt	40	5.3	ni	-	-
PF289	Boc	(\pm)	OBn	OrBu	42	6.0	ni	-	-
PF128**	Boc	(S)	OBn	OBn	45	6.3	ni	-	-
RV122C	Boc	(S,S)	OBn	OBn	45	6.4	1.7	0.176	-0.65
CS09	Boc	(R,R)	OBn	OBn	45	6.4	3.8	0.165	-1.00
PF180	Boc	(\pm)	OBn	OBn	45	6.4	2.8	0.169	-0.86
PF272	Boc	(\pm)	OBn	OEtPh	46	6.8	1.9	0.170	-1.09
PF257	Boc	(\pm)	OEtPh	OEtPh	47	7.2	1.6	0.169	-1.40
PF317	Boc	(\pm)	OBn	OPrPh	47	7.2	1.4	0.171	-1.32
PF294	Boc	(\pm)	OBn	OMeNaph	49	7.6	0.8	0.170	-1.50
PF362	Boc	(\pm)	OPrPh	OPrPh	49	8.0	0.9	0.169	-1.90
PF253	Boc	(\pm)	OBn	OMeCy	45	7.4	1.8	0.174	-1.62
PF284	Cbz	(\pm)	OMeCy	OMeCy	48	8.8	2.3	0.161	-3.13
PF258	Boc	(\pm)	OMeCy	OMeCy	45	8.3	0.8	0.186	-2.19

* Derivat **PF326** trägt anstelle des (S)-Leu (S)-Ile im Dipeptid

** Derivat **PF128** ist das Tripeptid mit (S)-Asp(OBn)₂ anstelle des Aziridin-2,3-dicarboxylats

Betrachtet man, wie in Kap. 4.1.5 bereits beschrieben, alleine die K_i -Werte der Inhibitoren an LmCPB2.8, so ist die Verbesserung der Hemmung innerhalb der Ester, aber auch von den Estern zu den Säuren bereits sichtbar. Welchen Umfang welche und Qualität diese Verbesserungen allerdings haben, wird jedoch erst durch das Miteinbeziehen der LE- und LLE-Werte deutlich.

Für die Ligandeneffizienz ergibt sich folgende Auftragung von pK_i gegen $1/HA$ (Abb. 4.3-2):

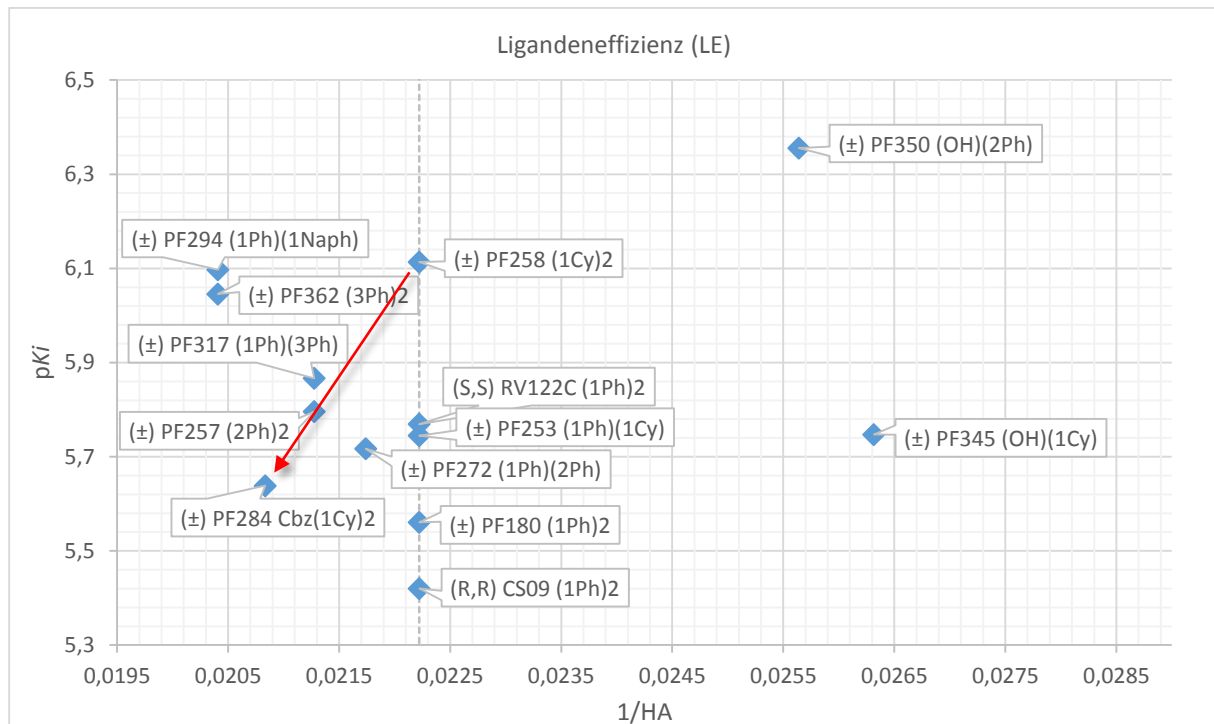


Abb. 4.3-2: Ligandeneffizienz (LE) als Auftragung der pK_i -Werte gegen die $1/HA$ -Werte mit gestrichelter Vergleichslinie der Derivate gleicher Anzahl an Schweratomen – Verbindungen sind nach Angabe der Stereoinformation (z.B. (R,R) für (2R,3R)-Aziridin-2,3-dicarboxylat, bzw. (±) für *trans*-konfiguriertes Diastereomerenpaar) als Labornummern mit Schutzgruppe (Cbz/ohne = Boc) und Resten (als Zahl $n = (CH_2)_n$ und Gruppe OH/Cy/Ph/Naph = Säure/Cyclohexyl/Phenyl/Naphthalin-2-yl) angegeben (z.B. (R,R) **CS09** (1Ph)2 für Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn)2)

Durch die Auftragung zeigt sich sehr anschaulich, dass die Halbestere **PF345** und **PF350** die deutlich bessere Hemmwirkung pro Schweratom erreichen. Sie finden sich in der rechten Hälfte, mit dem höchsten pK_i -Wert (**PF350**) und den höchsten $1/HA$ -Werten, wieder. Daneben zeigt sich durch die gezogene vertikale Vergleichslinie, dass das Cyclohexylmethylester-Analogon **PF258** im Vergleich mit den Leitstrukturen **RV122C** und **CS09** eine deutlich höhere Ligandeneffizienz, d.h. höhere Hemmwirkung bei gleicher Anzahl Schweratome, besitzt. Weiterhin ist zu erkennen, dass sich der Austausch der Schutzgruppe von der Boc- zur Cbz-Schutzgruppe (**PF258**: $pK_i = 6.11$, $1/HA = 0.0222$ und **PF284**: $pK_i = 5.56$, $1/HA = 0.0208$,

roter Pfeil) nachteilig auf die Ligandeneffizienz auswirkt. Das Cbz-Derivat zeigt im Vergleich die geringere Hemmung bei einer größeren Anzahl Schweratome.

Im Gegensatz zur Basis der LE-Werte wurde die Basis zur Ermittlung der LLE-Werte, der jeweilige clogP-Wert einer Substanz, nicht experimentell bestimmt. Somit können diese nicht als absolutes Bewertungskriterium herangezogen werden. Da die berechneten LLE-Werte aber sehr gut mit der Retentionsreihenfolge der Verbindungen korrelieren, kann der Vergleich der LLE-Werte untereinander dennoch wertvolle Informationen liefern (Abb. 4.3-3).

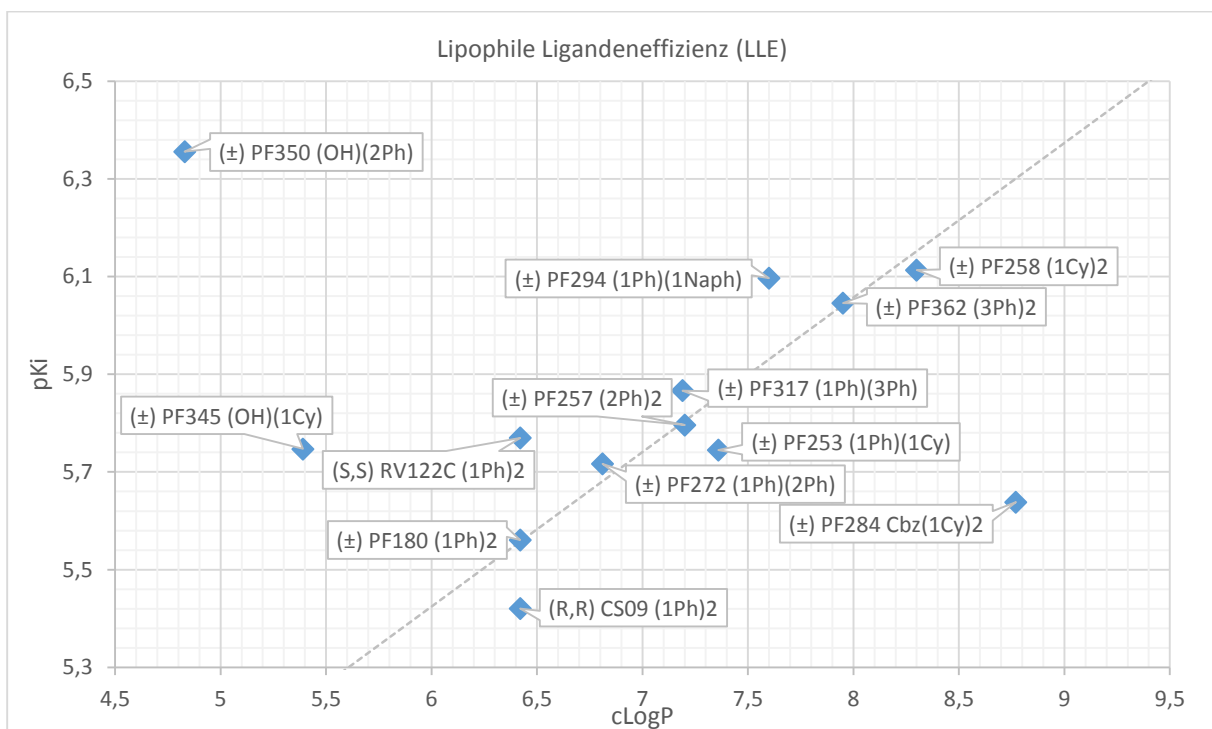


Abb. 4.3-3: Lipophile Ligandeneffizienz (LLE) als Auftragung der pK_i -Werte gegen die clogP-Werte mit gestrichelter Trendlinie durch die in der C-Kette verlängerten symmetrischen Derivate **PF180** ((±)PF180 (1Ph)2), **PF257** ((±)PF257 (2Ph)2) und **PF362** ((±)PF362 (3Ph)2) – Erklärung der Abkürzungen siehe Abb. 4.3-2 oben

Die Verbindungen mit den höchsten LLE-Werten, die Halbesten, finden sich im linken oberen Quadranten wieder. Sie erreichen damit innerhalb der untersuchten Bibliothek maximale Aktivität bei minimaler Lipophilie. Aus der Auftragung wird weiterhin ersichtlich, dass durch Verlängerung der C-Kette der Ester keine sprunghafte, sondern nur sukzessiv zunehmende Verbesserung erreicht wird. Alle Inhibitoren liegen entlang einer Geraden, d.h. eine erhöhte Lipophilie korreliert mit einer besseren Hemmung. Die Ausnahme macht hierbei, wie bereits bei der Ligandeneffizienz, das Derivat **PF284** mit Cbz-Schutzgruppe. Dieses zeigt auch hier im Vergleich mit **PF258**, welches die Boc-Schutzgruppe trägt, die schlechtere Ligandeneffizienz.

Für die Cyclohexylmethylester-Derivate (**PF253**, **PF258** und **PF284**) wurden, wie die HPLC-Retentionsreihenfolge in Kap. 3.3 aufzeigt, tendenziell zu geringe $\log P$ -Werte berechnet. Daher wird ihre Effizienz in dieser Auftragung als zu hoch eingeschätzt. Trotzdem erreichen sie nicht die Effizienz der Benzylester-Derivate, erscheinen also rechts der Trendlinie. Das Derivat **PF294** ist der einzige Diester, welcher links der Trendlinie liegt. Hier zeigt sich eine verbesserte Wechselwirkung zwischen Enzym und Ligand aufgrund des vergrößerten π -Systems des Naphthalin- an Stelle des Phenyl-Rests.

Um die Aussage über die Qualität der Verbindungen noch zu verbessern, bietet sich die kombinierte Auftragung des LE- gegen den LLE-Wert an (Abb. 4.3-4).

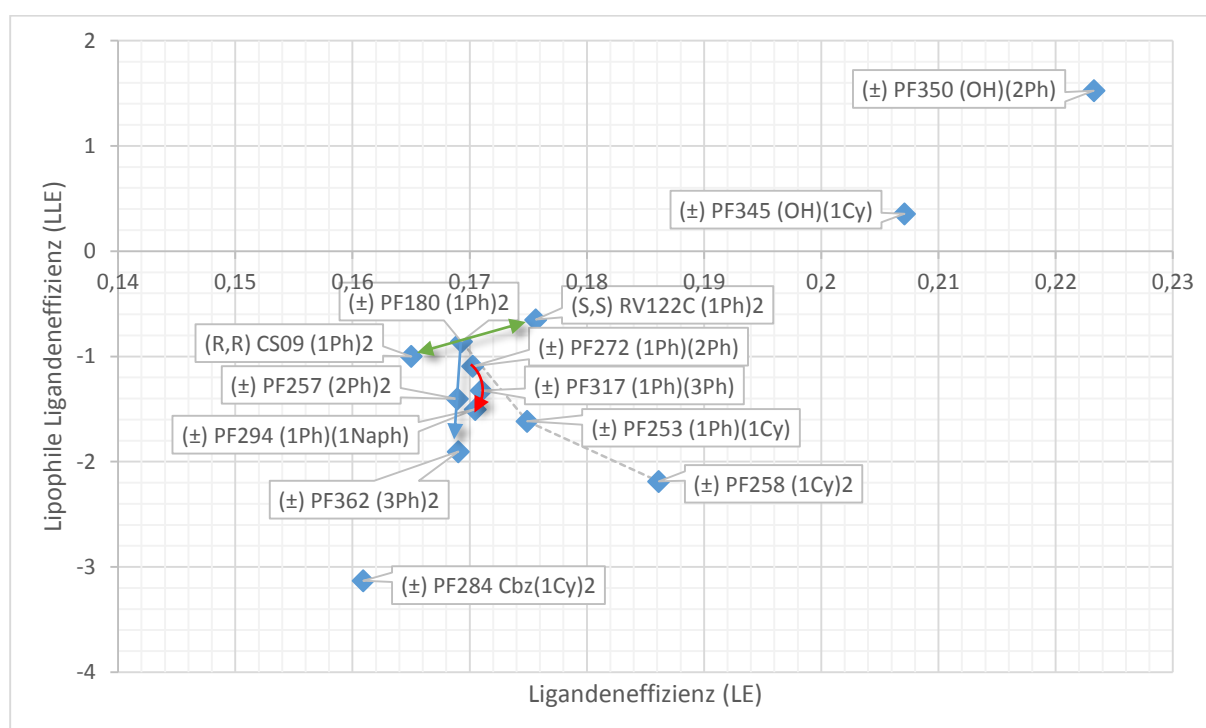


Abb. 4.3-4: Auftragung der Ligandeneffizienz gegen die lipophilen Ligandeneffizienz mit gestrichelter Verbindungslinien zwischen **PF180** ((±)PF180 1Ph₂), **PF253** ((±)PF253 1Ph₂) und **PF258** ((±)PF180 1Ph₂) – Erklärung der Abkürzungen siehe Abb. 4.3-2 oben

Im Vergleich mit den diastereomerenreinen Leitstrukturen **RV122C** und **CS09** – und dem Diastereomeregemisch **PF180** – finden sich die meisten neuen Diester-Derivate, symmetrische wie unsymmetrische, hauptsächlich in einem Quadranten zwischen $0.16 < LE < 0.18$ und $-2 < LLE < -1$ wieder, und zeigen damit bis auf **PF258** und **PF284** sowohl niedrigere LE- als auch LLE-Werte als die Leitstrukturen.

Auch hier ist zu erkennen, dass die Derivate mit Cyclohexylmethylester gegenüber den Benzylester-Derivaten (**PF258** im Vergleich mit **PF180**) keine vergleichbare lipophile Ligandeneffizienz erreichen, diesen bezüglich der Ligandeneffizienz aber überlegen sind. Dieser

Umstand verdeutlicht sich noch einmal durch die durch die gestrichelten Linien im Diagramm verbundenen Derivate **PF180**, **PF253** und **PF258**. **PF180** trägt zwei Benzylester und zeigt im Vergleich der drei Verbindungen den höchsten LLE-Wert bei gleichzeitig geringstem LE-Wert. **PF258** mit zwei Cyclohexylmethylestern zeigt umgekehrt den höchsten LE-Wert aber den geringsten LLE-Wert. Zuletzt liegt das Derivat **PF258**, welches je einen Benzyl- und Cyclohexylmethylester trägt, genau zwischen diesen beiden symmetrischen Derivaten.

Betrachtet man weiterhin die Ergebnisse innerhalb der Reihen mit verlängerter C-Kette mit den symmetrischen Verbindungen **PF180** ($K_i^{theor.} = 2.8 \mu\text{M}$), **PF257** ($K_i = 1.60 \mu\text{M}$) und **PF362** ($K_i = 0.9 \mu\text{M}$) (Abb. 4.3-4, blaue Linie) sowie den unsymmetrischen Verbindungen **PF272** ($K_i = 1.9 \mu\text{M}$), **PF317** ($K_i = 1.4 \mu\text{M}$) und **PF294** ($K_i = 0.8 \mu\text{M}$) (Abb. 4.3-4, rote Linie) wird klar, dass die in Kap. 4.1.5 beschriebene verbesserte Hemmung von LmCPB2.8 nur kontinuierlich durch die erhöhte Lipophilie im Enzymassay erreicht wird. Eine sprunghaft verbesserte Adressierung von Bindungstaschen scheint durch die, um je eine Einheit in der C-Kette, verlängerten bzw. größeren Ester-Reste nicht zu erfolgen. Durch eine entscheidend bessere Adressierung der Bindungstasche wäre eine mehr als nur proportional bessere Hemmwirkung bei zunehmender Lipophilie zu erwarten. Dies wäre bei einer z.B. flachen und komplett lipophilen Tasche dann der Fall, wenn neben dem Boden der Tasche zusätzlich auch die Wände für eine Wechselwirkung durch den in diese Tasche dirigierte Rest erreicht würden.

Die beiden aktiven Säuren (**PF350** aus **PF272** und **PF345** aus **PF253**) sind hingegen deutlich zu höheren LE- und LLE-Werten in den rechten oberen Quadranten verschoben. Sie zeigen also in beiden Bewertungskriterien eine deutliche Verbesserung der jeweiligen Effizienz. Bei der Ligandeneffizienz wird bei beiden Derivaten mehr als die zu erwartende ~15 %ige Effizienzsteigerung durch den Verlust von ca. ~15 % der Schweratome durch die Abspaltung des Benzyl-Rests erreicht (**PF253** LE = 0.174 auf **PF345** LE = 0.207 und von **PF272** LE = 0.170 auf **PF350** LE = 0.223). Auch bei der lipophilen Ligandeneffizienz wird im Gegensatz zu den Diester-Derivaten mehr als nur eine sukzessive Verbesserung erzielt. Die variierten Diester-Derivate lagen wie bereits beschrieben hauptsächlich in einem Bereich zwischen $-2 < \text{LLE} < -1$. Die Verbesserung der lipophilen Ligandeneffizienz durch Variation zu den Halbestern findet hingegen sprunghaft statt (**PF253** LLE = -1.62 auf **PF345** LLE = 0.35 und von **PF272** LLE = -1.09 auf **PF350** LLE = 1.53). Eine sprunghafte Verbesserung ist vor allem dann offensichtlich, wenn man sich vor Augen führt, dass bei der Darstellung der beiden Halbestern mit der Abspaltung des Benzylesters nicht nur eine lipophile Gruppe abgespalten, sondern mit der Freisetzung der Carboxy-Gruppe auch eine hydrophile Gruppe eingeführt wird. Die angestrebte Verbesserung der Hemmwirkung ist hier, durch die, bereits in den Kap. 1.6.2, 1.6.3, 2., und 3.2.1.3 thematisierte, neu gewonnene ionische Wechselwir-

kung der freien Carboxy-Funktion mit dem Histidin-Rest des katalytischen Zentrums, deutlich zu sehen.

Zuletzt soll die separate Auftragung der Leitstrukturen **RV122C** und **CS09** als diastereomerenreine Verbindungen betrachtet werden (Abb. 4.3-4, grüne Linie). **CS09** zeigt als (*R,R*)-konfiguriertes Derivat durch einen höheren K_i -Wert, also eine geringere Hemmwirkung, bei derselben Anzahl Schweratome und derselben Lipophilie wie das (*S,S*)-konfigurierte Derivat **RV122C**, die schlechteren LE- und LLE-Werte. Der Vorteil von **CS09** liegt aber in der sich aus der Konfiguration ergebenden Selektivität für LmCPB2.8 gegenüber Cruzain (siehe Kap. 1.6.4 und 3.2.1.5).

5. Vergleich und Diskussion der Ergebnisse

Bei der Analyse der synthetisierten Derivate der **PF**-Reihe im Docking konnten die bereits in früheren Arbeiten vermuteten (siehe Kap. 1.6.3) beiden möglichen Bindungsmodi, ein anti-Substrat und ein Substrat-ähnlicher (entgegengesetzter bzw. paralleler Verlauf der peptischen bzw. peptid-ähnlichen Grundstruktur des Inhibitors und der Substratbindespalte des Enzyms), wiedergefunden werden. Die eingehende Untersuchung der Diastereomerenpaare im Docking ergab weiterhin, dass für den anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus die (*R,R*)-, für den Substrat-ähnlichen Bindungsmodus die (*S,S*)-Konfiguration am Aziridin-Ring die bevorzugte sein sollte. Weiterhin konnte ein erstes Indiz für einen anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus gefunden werden. Dieser Bindungsmodus ist, passend zu den Ergebnissen dieser Verbindungsklasse in früheren Enzymtests,^{98,102} weniger sensitiv gegenüber Konfigurationsänderungen am Aziridin-Ring, als dies für einen Substrat-ähnliche Bindungsmodus vorausgesagt wird. Die zusätzliche Analyse eines bereits an Enzymen getesteten, (*R,R*)-konfigurierten Ausschnitts der **CS**-Reihe lieferte außerdem in der Reihe der Derivate **CS30**, **CS31** und **CS32** (mit Phg-, Phe- bzw. hPhe-Aminosäure) einen Trend, der nur durch einen anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus und den Aminosäureresten in der S₂-Bindungstasche zu erklären ist.

Um die Eignung von AutoDock Vina für die Vorhersage von Bindungsmodi dieser Verbindungsklasse und deren Affinität noch weiter zu bestätigen, sollen im Folgenden zuerst die ermittelten Trends der Ergebnisse des Dockings an Cruzain mit denen der Ergebnisse der Enzymtests verglichen werden. Erst daran soll sich der Vergleich der Ergebnisse an Cruzain mit denen der *Leishmania*-Protease LmCPB2.8 anschließen.

Im Vergleich der Trends an Cruzain zeigt sich eine recht gute Übereinstimmung der Ergebnisse der Enzymtests der Diastereomeregemische mit den Ergebnissen des Dockings (Abb. 5.-1, nächste Seite). Diese Übereinstimmung findet sich jedoch nur für die Docking-Strukturen mit (*R,R*)-Konfiguration und für einen anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus mit Bindung des jeweils bevorzugten Ester-Restes in die S₁-Bindungstasche. Das bedeutet, dass von den getesteten Diastereomeregemischen wahrscheinlich die Verbindung mit (*R,R*)-Konfiguration der mit (*S,S*)-Konfiguration bezüglich Enzymhemmung überlegen und damit ausschlaggebend für die sich ergebenden Trends ist.

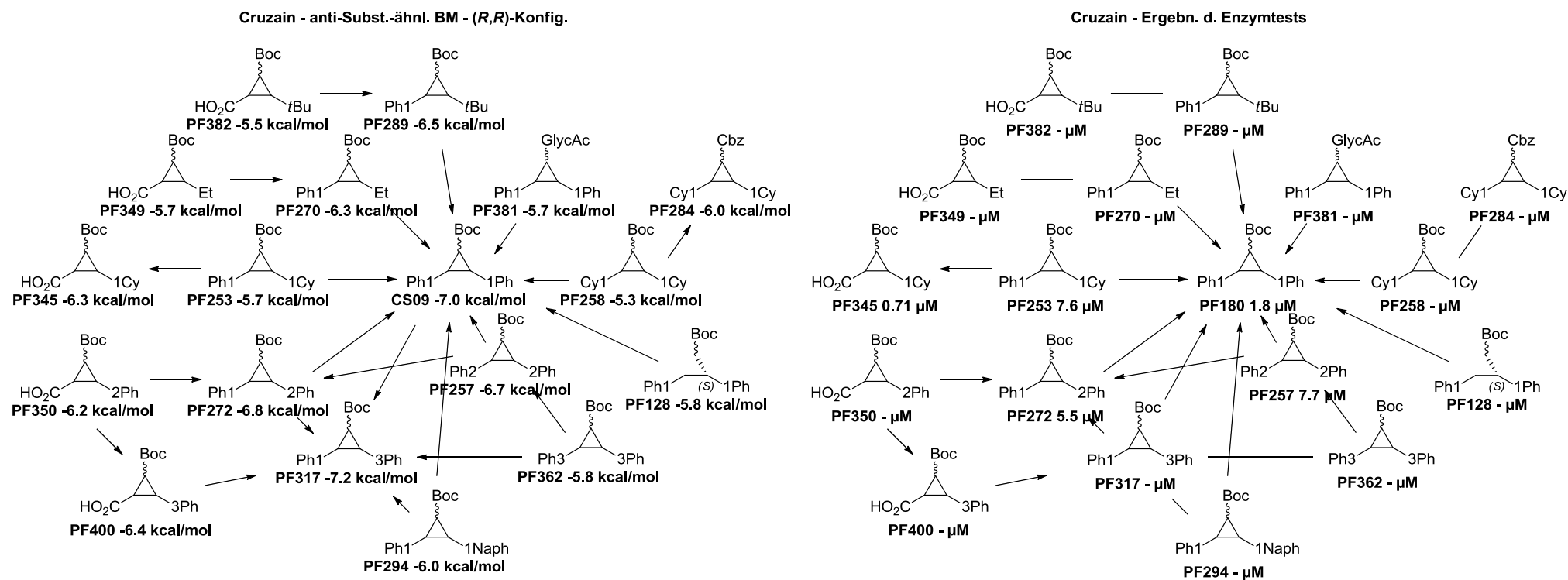


Abb. 5.-1: Vergleich der Ergebnisse des anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus (BM) an Cruzain im Docking für Verbindungen mit (R,R)-Konfiguration am Aziridin (bzw. (S)-Asp bei **PF128**) (links, berechnete Affinitäten in kcal/mol) mit den Ergebnissen der Enzymtests der Diastereomeregemische (rechts, K_i-Werte bzw. „- µM“ = keine Hemmung > 50 % bei 20 µM). Neben der Schutzgruppe in üblicher Abkürzung wird das Dipeptid als Wellenlinie und das Aziridin-2,3-dicarboxylat als Dreieck angegeben (Ausnahme: offenkettiges (S)-Asp bei **PF128**). Die Reste in 2- und 3-Position sind als Gruppe oder als Zahl plus Rest angegeben, wobei die Zahl für die Kettenlänge (CH₂)_x steht (z.B. 3Ph = 3-Phenylpropyl bzw. 1Naph = Naphthalin-2-ylmethyl). Die Pfeile markieren Trends und deuten jeweils eine Verbesserung der Hemmung durch die Strukturvariation an (z.B. **PF257** mit geringerer Affinität als **CS09** im Docking links und höherem K_i-Wert an Cruzain rechts).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt weiterhin auf, dass es für die Diester-Derivate eine berechnete energetische Grenze gibt, die über Aktivität bzw. Inaktivität im Enzymassay entscheidet. So zeigen alle Diester-Derivate, mit Ausnahme von **PF253** und **PF317**, die diese Grenze der Energie von -6.6 kcal/mol, die bei der Bindung an das Enzym laut Docking frei wird, unterschreiten, in den Enzymtests an Cruzain keine Hemmung > 50 % bei 20 μ M. Damit werden sie bereits im Docking korrekt als inaktiv vorhergesagt. Für die aktiven Derivate bestätigen sich die Trends bezogen auf die jeweils vorausgesagten direkten Vergleiche zweier Diester-Derivate.

Damit passen die in Kap. 3.2.1.3.2 für Cruzain herausgearbeiteten Trends für die symmetrischen Derivate und einen anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus mit:

PF258 (OMeCy) < **PF362** (OPrPh) < **PF180** (OBn) ~ **PF257** (OEtPh)

besser als für einen Substrat-ähnlichen Bindungsmodus, dem die Reihenfolge:

PF180 (OBn) < **PF362** (OPrPh) < **PF258** (OMeCy) < **PF257** (OEtPh)

vorausgesagt wurde. Außerdem findet sich auch für die unsymmetrischen Derivate und einen anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus mit:

PF270 (OEt), **PF289** (OtBu), **PF253** (OMeCy), **PF317** (OPrPh), **PF294** (OMeNaph) < **PF180** (OBn) < **PF272** (OEtPh)

die bessere Übereinstimmung, als das für einen Substrat-ähnlichen Bindungsmodus prognostiziert wird:

PF270 (OEt), **PF289** (OtBu), **PF253** (OMeCy) < **PF180** (OBn) < **PF272** (OEtPh), **PF317** (OPrPh), **PF294** (OMeNaph).

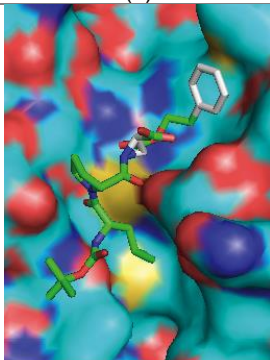
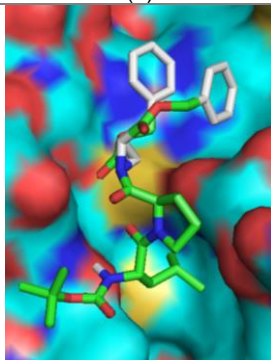
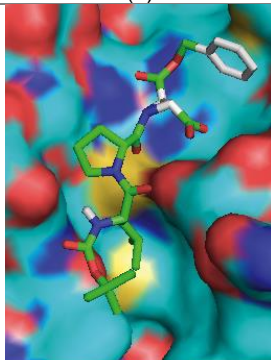
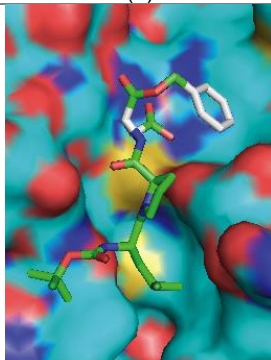
Gerade für einen Substrat-ähnlichen Bindungsmodus wurde durch Verlängerung der C-Kette eine stetige Verbesserung der Hemmung vorausgesagt, was sich in den Enzymtests an Cruzain nicht bestätigte.

Interessanterweise erscheint der 2-Phenylethyl-Rest im Docking dem Benzyl-Rest überlegen. In den energetisch günstigeren Bindungsposen wird nämlich der 2-Phenylethyl-Rest in die S_1 -Bindungstasche dirigiert, und nicht der Benzyl-Rest. Die für die Verbindungen berechneten Affinitäten fallen im Gegensatz dazu jedoch geringer aus. Auch in den Enzymassays bestätigt sich dessen Überlegenheit nicht. Dieser Zusammenhang zeigt sich sehr gut in der Reihe **PF180** (zwei Benzyl-Reste, links als **CS09** im Docking, Erklärung siehe über Abb. 5.-1, -7.0 kcal/mol, $K_i = 1.8$), **PF272** (ein 2-Phenylethyl-Rest, -6.8 kcal/mol, $K_i = 5.5$) und **PF257** (zwei 2-Phenylethyl-Reste, -6.7 kcal/mol, $K_i = 7.7$). Außerdem zeigt sich, dass die S_1 -Bindungstasche des Cruzains, Reste, die über die Kettenlänge des 2-Phenylethyl-Rests hinaus gehen (z.B. 3-Phenylpropyl, **PF362**), nicht aufnehmen kann. Dass auch die unsymmetrischen Derivate **PF317** und **PF294** niedrigere K_i -Werte zeigen – diese verfügen zumindest über einen in die S_1 -Bindungstasche passenden Benzyl-Rest – legt die Vermutung nahe,

dass die Phenylreste für eine gute Hemmung im Enzym, wie im Docking vorhergesagt, im *sandwich* π - π -stacking vorliegen müssen. Dies ist anscheinend nur bei Diester-Kombinationen möglich, bei denen kein Ester den Raumanpruch des 2-Phenylethyl-Rests überschreitet. Die Vermutung des benötigten *sandwich* π - π -stacking wäre zudem auch eine mögliche Erklärung für die Inaktivitäten der Derivate **PF270** (ein Ethyl-Rest) und **PF289** (ein *tert*-Butyl-Rest).

Bei den Halbester-Derivaten ist die beschriebene Grenze für Inaktivität von > -6.6 kcal/mol nicht anwendbar, bzw. erscheint zu hoch angesetzt. Neben den Derivaten **PF382** und **PF349**, denen mit einer Affinität > -6.6 kcal/mol korrekterweise keine Enzymhemmung < 50 % bei 20 μ M vorhergesagt wird, ist der Unterschied in den Aktivitäten zwischen **PF345**, **PF350** und **PF400** nicht direkt erklärbar. Nach den berechneten Affinitäten liegen diese mit -6.3 , -6.2 und -6.4 kcal/mol nahezu gleich auf. Beim Blick auf die entsprechenden anti-Substrat-ähnlichen Dockingposen in Kap. 3.2.1.3.3 zeigt sich aber, dass eine Anpassung der Halbester in den *active site cleft* im Docking erschwert ist. So wird die für die Halbester neu hinzugewonnene ionische Wechselwirkung zwischen der freien Carboxy-Funktion und dem Imidazolium-Ion des Histidins durch die Adressierung der S_1 -Bindungstasche durch den verbleibenden Ester-Rest im Docking verhindert, und somit nicht berücksichtigt (Tab. 5.-2 (1) am Beispiel von **PF350**). Diese Wechselwirkung läge im anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus genau an der Stelle, durch die bei den Diester-Derivaten die C-Ketten verlaufen und durch die die cyclischen Reste in die S_1 -Bindungstasche dirigiert werden (Tab. 5.-2 (2) am Beispiel von **CS09**).

Tab. 5.-2: Anti-Substrat-ähnliche Bindungsmodi der Inhibitoren **CS09** und **PF350** sowie der für ein Docking generierten Strukturen *trans*-Bn-H(*R,R*) und *cis*-(*R*)-Bn-(*S*)-H (siehe Kap. 3.2.1.3.3) unter Angabe der niedrigeren Distanz des Cys-Thiolats zum jeweiligen Azi-C-H, der niedrigeren Distanz der Carboxy-Funktion zum protonierten Imidazol des Histidins (Abstand der Schweratome in Å) und der entsprechenden Affinität (in kcal/mol)

PF350-(<i>R,R</i>) (1)	CS09 (<i>R,R</i>) (2)	<i>trans</i>-Bn-H(<i>R,R</i>) (3)	<i>cis</i>-(<i>R</i>)-Bn-(<i>S</i>)-H (4)
			
Cys- 4.9 Å – His ⁺ 6.8 Å -6.2 kcal/mol	Cys- 4.6 Å -7.0 kcal/mol	Cys- 5.3 Å – His ⁺ 6.6 Å -5.3 kcal/mol	Cys- 4.1 Å – His ⁺ 3.3 Å -6.2 kcal/mol

Im Docking der Halbester **PF345**, **PF350** und **PF400** zeigen sich so Bindungsposen, die den jeweiligen einen Ester-Rest analog zu den Diester-Derivaten ausrichten, und so auch eine

ionische Wechselwirkung verhindern. Daher werden für die berechneten Affinitäten die Beiträge dieser ionischen Wechselwirkung, wie beschrieben, auch nicht berücksichtigt, was die geringeren Affinitäten erklärt. Mit anderen Worten, die Bindungsposen müssen – die Halbestere zeigen in den Enzymtests deutlich verbesserte K_T -Werte – falsch sein. AutoDock Vina gewichtet die starke ionische Wechselwirkung entweder zu gering, oder eine Anpassung der Strukturen in den *active site cleft* ist für Bindungsposen mit ionischer Wechselwirkung so stark erschwert, dass deutlich geringere Affinitäten als für Bindungsposen ohne ionische Wechselwirkung errechnet werden.

Experimentell und auch mit früheren QM/MM-Rechnungen⁸⁸ konnte jedoch die Bedeutung der ionischen Wechselwirkung nachgewiesen werden. Da im anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus aber, wie bereits beschrieben, die ionische Wechselwirkung und die C-Kette (für eine günstige Adressierung des jeweiligen Ester-Rests in die S_1 -Bindungstasche) um denselben Raum konkurrieren, muss folglich von einer erschwerten Adressierung der S_1 -Bindungstasche durch die Ester-Reste gesprochen werden. Eine zu dieser Problematik passende Dockingpose konnte aber nur bei der, nur für ein Docking generierten, Struktur **trans-Bn-H-(R,R)** (Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OH)(OBn), siehe auch Kap. 3.2.1.3.3) gefunden werden (Tab. 5.-2 (3) oben). Für die (R,R)-konfigurierten Halbestere lässt sich daher folgern, dass sie einen im Vergleich mit den Diestern etwas versetzten Bindungsmodus aufweisen sollten. Grund hierfür ist die ionische Wechselwirkung die, wie bei der genannten Bindungspose ersichtlich, sozusagen als Anker wirkt. Für den jeweils verbleibenden Rest der Halbestere bedeutet das, dass dieser anders als bei den Diestern in die S_1 -Bindungstasche dirigiert werden muss. In den Enzymtests an Cruzain zeigt nur der Halbestere **PF345** Aktivität, **PF350** und **PF400** sind inaktiv. Anscheinend passt, im Gegensatz zu den Diestern, nur der Cyclohexylmethyl-Rest von **PF345** noch komplett in die S_1 -Bindungstasche. Der 2-Phenylethyl-Rest (**PF350**) wie auch der 3-Phenylpropyl-Rest (**PF400**) sind folglich sterisch zu anspruchsvoll, um ebenfalls die S_1 -Bindungstasche des Cruzains zu adressieren. An dieser Stelle sei bereits auf die laut Docking mögliche Optimierung durch Veränderung der *trans*- in die *cis*-Konfiguration verwiesen (Tab. 5.-2 (4) oben und Kap. 3.2.1.3.3 und 3.2.1.5).

Für die Variation der Schutzgruppen bestätigen sich weiterhin die berechneten relativen Trends. So zeigt das Derivat mit GlycAc-Schutzgruppe **PF381** im Vergleich mit der Boc-Schutzgruppe in **CS09** keine Hemmung. Dies ist insofern verwunderlich, da die Boc-Schutzgruppe nicht als essenziell für die Wechselwirkung mit dem Enzym angesehen wurde. Offensichtlich ist aber eine polare Gruppe an dieser Position kontraproduktiv für die Gesamtaffinität der Verbindung. Auch dass die Cyclohexylmethylester-Derivate **PF258** und **PF284** mit Boc-Schutzgruppe bzw. Cbz-Schutzgruppe inaktiv sind, passt zu den berechneten Enthalpien von > -6.6 kcal/mol.

Inaktiv in den Enzymassays sind neben der Verbindung **PF284** auch die Derivate **PF128** und **PF294**. Außerdem zeigt **PF253** nur geringe Aktivität. Die drei Verbindungen **PF253**, **PF284** und **PF294** wurden in Kap. 3.2.1.3.4 als K.O.-Kandidaten zur Unterscheidung der beiden möglichen Bindungsmodi bestimmt. Die experimentellen Ergebnisse passen somit sehr gut ins Konzept des anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus. Für den Substrat-ähnlichen Bindungsmodus wären hier zum Teil deutlich bessere Aktivitäten zu erwarten gewesen (Abb. 5.-3, nächste Seite). Die Inaktivität von **PF128** im Enzymassay hingegen ist ein Indiz dafür, dass der Aziridin-*warhead* essenziell für die Hemmung ist. Im Gegensatz zu **CS09/RV122C** kann am offenkettigen Tripeptid **PF128** kein nucleophiler Angriff des Cys-Thiolats an 2- bzw. 3-Position, wie für das Aziridin-2,3-dicarboxylat postuliert, erfolgen.

Mit den zuvor beschriebenen Erkenntnissen und auf der nächsten Seite gezeigten Ergebnissen den scheint ein anti-Substrat-ähnlicher Bindungsmodus dieser Verbindungsklasse immer wahrscheinlicher und ist deswegen Grundlage der Betrachtung der Trends, die für die Hemmung von LmCPB2.8 gefunden wurden. Da sich für Cruzain sehr gute Übereinstimmungen zwischen Theorie und Praxis ergeben und Cruzain im Docking nur als verwandtes Modellenzym zu Hilfe genommen wurde, erscheint der Vergleich zwischen den Ergebnissen der jeweiligen Enzymtests für die Analyse der sich ergebenden Unterschiede und Trends sinnvoller (Abb. 5.-4, übernächste Seite).

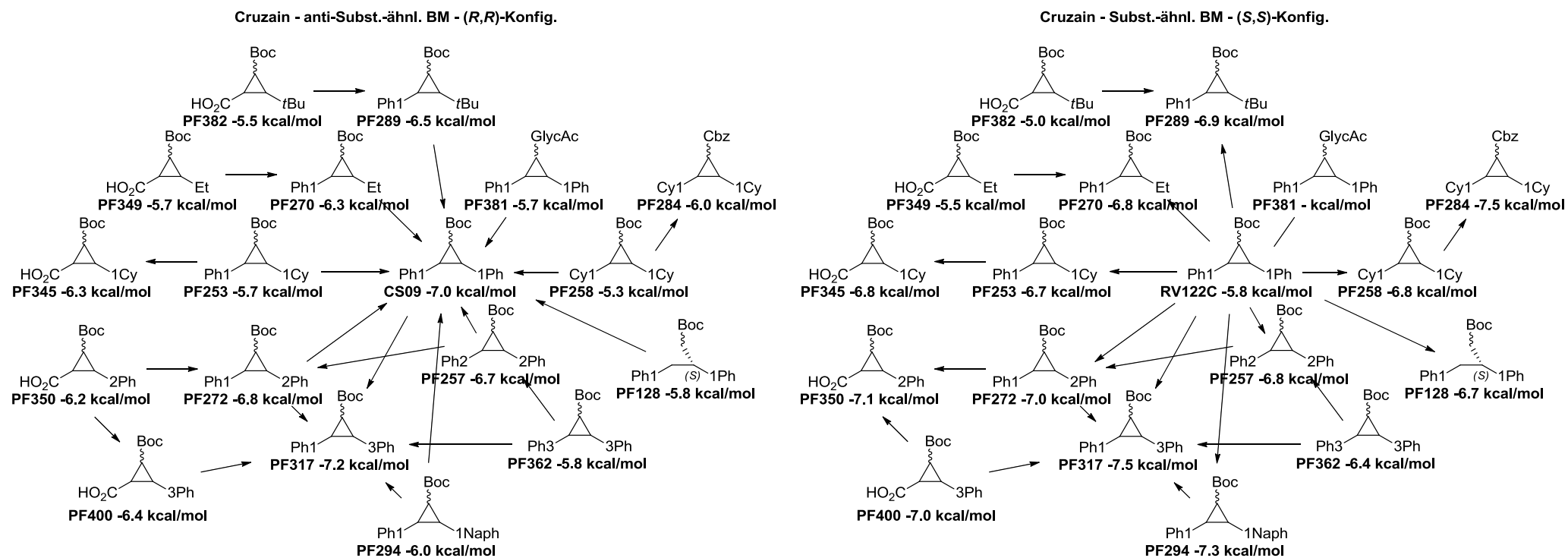


Abb. 5.-3: Vergleich der Ergebnisse an Cruzain für einen anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus (BM) für Verbindungen mit (R,R)-Konfiguration (links) mit den Ergebnissen für einen Substrat-ähnlichen Bindungsmodus für Verbindungen mit (S,S)-Konfiguration (rechts) am Aziridin (bzw. (S)-Asp bei **PF128**) mit berechneten Affinitäten (in kcal/mol) – Erklärung der Trendpfeile und Abkürzungen siehe Abb. 5.-1 oben

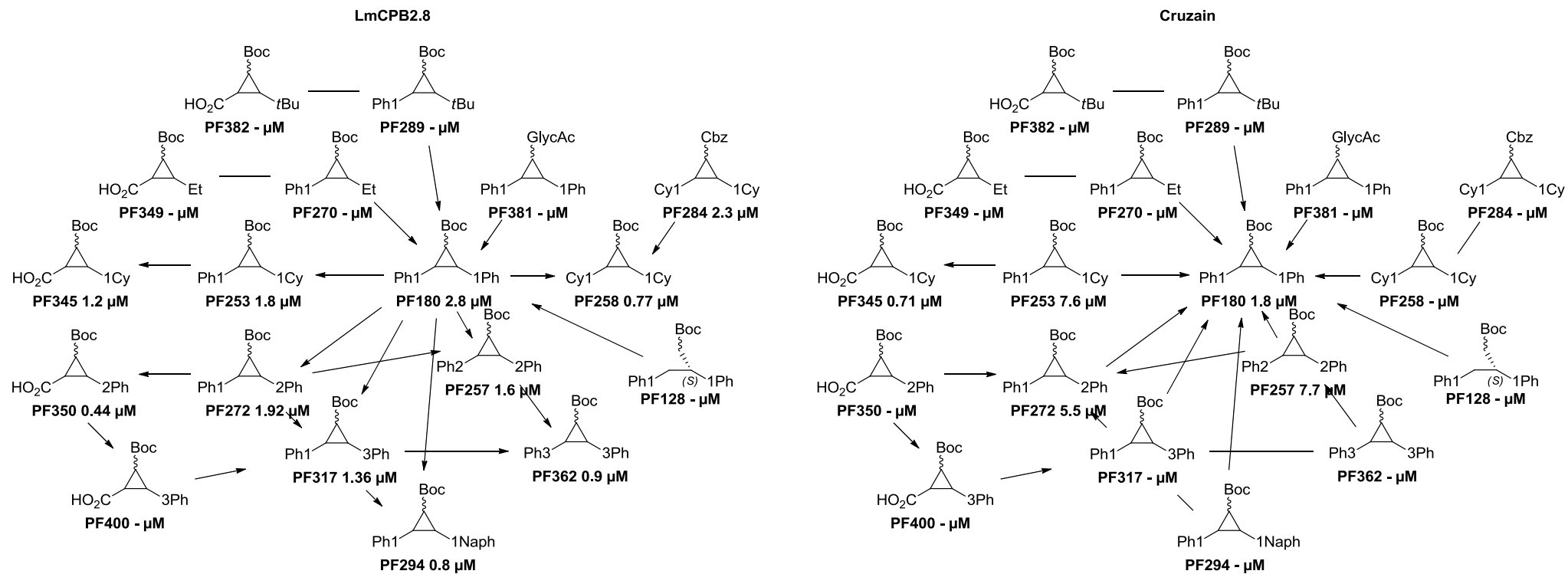


Abb. 5-4: Vergleich der Ergebnisse für die Hemmung von LmCPB2.8 (links) und Cruzain (rechts) – Erklärung der Trendpfeile und Abkürzungen siehe Abb. 5-1 oben

Bei der Betrachtung der Diester-Derivate fällt auf, dass, im Gegensatz zu Cruzain, an LmCPB2.8 sterisch sehr große Reste auch zu sehr niedrigen K_i -Werten führen (**PF294**, ein Naphthalin-2-ylmethyl-Rest: $K_i = 0.8 \mu\text{M}$, **PF362**, zwei 3-Phenylpropyl-Reste: $K_i = 0.9 \mu\text{M}$). Bezogen auf die unbekanntete 3D-Struktur von LmCPB2.8 bedeutet das, dass das Enzym – ein anti-Substrat-ähnlicher Bindungsmodus vorausgesetzt – eine tiefere S_1 -Bindungstasche als Cruzain aufweisen sollte. Dieser Trend zeigt sich auch bei den symmetrischen wie un-symmetrischen 2-Phenylethyl- und 3-Phenylpropylester-Derivaten **PF257**, **PF272** und **PF317**, die niedrige K_i -Werte zeigen. Weiterhin offenbart sich eine erhöhte Toleranz gegenüber Cyclohexyl-Resten, die die Derivate **PF253**, **PF258** und **PF284** anstatt der Phenyl-Reste der Leitstrukturen tragen. Aus den beiden letztgenannten Derivaten lässt sich auch eine relative Aussage bezüglich der vorausgerechneten Qualität der Schutzgruppen treffen. So bestätigt sich an der *Leishmania*-Protease LmCPB2.8 die Vermutung des Dockings an Cruzain, dass die Cbz- der Boc-Schutzgruppe unterlegen ist. Dies kann außerdem auch als weiteres Indiz für den anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus angesehen werden. Im Substrat-ähnlichen Bindungsmodus wäre aufgrund der berechneten Affinität eine deutlich bessere Hemmung zu erwarten gewesen (Abb. 5.-3, S. 148, und Kap. 3.2.1.3.4). Die Derivate mit Ethyl- (**PF270**) und *tert*-Butylester (**PF289**) bzw. GlycAc-Schutzgruppe (**PF381**) sowie das offenkettige Analogon **PF128** zeigen, wie an Cruzain, auch an LmCPB2.8 keine Aktivität.

Bezüglich der Selektivität zeigt sich, dass die Diester-Derivate mit steigender Länge der C-Kette bzw. mit steigendem sterischem Anspruch nur noch Aktivität an LmCPB2.8 zeigen. Dies ist sehr gut in der Reihe der Derivate mit verlängerter C-Kette (Tab. 5.-5, nächste Seite) zu erkennen. Die S_1 -Bindungstasche scheint in LmCPB2.8 tiefer zu sein als in allen anderen getesteten Enzymen.

Tab. 5.-5: K_i -Werte [μM] der nicht-zeitabhängigen Hemmung von Cathepsin-L (Cath-L), Cathepsin-B (Cath-B), Cruzain (Cruz), Falcipain-2 (Fal-2), LmCPB2.8 (LmCPB) und Rhodesain (Rho) sowie theoretische K_i -Werte des Diastereomerenpaars **PF180** – ni = no inhibition, $\text{IC}_{50} > 20 \mu\text{M}$

Lab. Nr.	SG	trans (\pm) (S,S)/(R,R)	R ₁	R ₂	Cath-L K_i [μM]	Cath-B K_i [μM]	Cruz K_i [μM]	Fal-2 K_i [μM]	LmCPB K_i [μM]	Rho K_i [μM]
RV122C	Boc	(S,S)	OBn	OBn	6.0	ni	0.9	209	1.7	1.2
CS09	Boc	(R,R)	OBn	OBn	ni	ni	ni	ni	3.8	1.7
PF180^{theor.*}	Boc	(\pm)	OBn	OBn	ni	ni	1.8 ^{theor.}	ni	2.8 ^{theor.}	1.5 ^{theor.}
PF272	Boc	(\pm)	OBn	OEtPh	ni	ni	5.5 \pm 0.2	ni	1.92 \pm 0.06	ni
PF257	Boc	(\pm)	OEtPh	OEtPh	ni	ni	7.7 \pm 0.7	ni	1.6 \pm 0.1	ni
PF317	Boc	(\pm)	OBn	OPrPh	ni	ni	ni	ni	1.36 \pm 0.05	ni
PF362	Boc	(\pm)	OPrPh	OPrPh	ni	ni	ni	ni	0.9 \pm 0.1	ni

* Das Diastereomerenpaar **PF180** wurde nicht getestet. Theoretischer Wert aus den Testergebnissen von **RV122C** und **CS09** (detaillierte Erklärung siehe Kap. 4.1.5).

Bei den Halbestere-Derivaten fällt auf, dass die an Cruzain inaktive Verbindung **PF350** eine sehr gute Hemmung von LmCPB2.8 erzielt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Vermutung, dass die S_1 -Bindungstasche in LmCPB2.8 tiefer ist. Das an Cruzain ebenfalls inaktive Derivat **PF400** zeigt hingegen keine Hemmung. Das ist bei erster Betrachtung verwunderlich, denn der Edukt-Diester **PF317** zeigt noch die zweitbeste Aktivität. Wie oben bereits für Cruzain beschrieben, wird durch die Freisetzung der Carboxy-Gruppe offensichtlich mit der ionischen Wechselwirkung zwischen Ligand und Enzym eine Interaktion geschaffen, die zwar die Affinität zum Enzym erhöht, für die Dirigierung des Ester-Restes in die S_1 -Bindungstasche aber hinderlich ist. Somit passt der Cyclohexylmethyl- wie auch der 2-Phenylethyl-, nicht aber der 3-Phenylpropyl-Rest, noch in diese. Dieser Umstand steht wie bereits erwähnt mit einem anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus im Einklang und kann somit als weiteres Indiz für diesen angesehen werden.

Wird die Betrachtung der Derivate mit freier Carboxy-Funktion auf alle getesteten Enzyme erweitert, zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Selektivität innerhalb der Papain-Familie (Tab. 5.-6).

Tab. 5.-6: Hemmkonstanten der zeitabhängigen Hemmung von Cathepsin-L (Cath-L), Cathepsin -B (Cath-B), Cruzain (Cruz), Falcipain-2 (Fal-2), LmCPB2.8 (LmCPB) und Rhodesain (Rho) – ni = no inhibition, $IC_{50} > 20 \mu\text{M}$ – $R_1 = \text{OH}$

Lab. Nr.	R ₂	Cath-L	Cath-B	Cruz	Fal-2	LmCPB	Rho
PF349	OEt	ni	ni	ni	ni	ni	ni
PF382	OtBu	ni	ni	ni	ni	ni	ni
PF345							
IC_{50}^* [μM]		14.3±4.7		4.1±1.2	0.97±0.03	3.5±0.8	1.59±0.02
k_f [min^{-1}]	OMeCy	1.02**	ni	0.229±0.003	0.343**	0.957**	0.598**
K_i [μM]		7.3±2.4***		0.711±0.015	0.447±0.015***	1.79±0.43***	0.121±0.002***
k_{2nd} [$\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$]		13939±517		322531±11089	76789±2147	53595±2030	494038±6941
PF350							
IC_{50}^* [μM]					2.7±0.5	9.3±1.7	2.14±0.03
k_f [min^{-1}]	OEtPh	ni	ni	ni	0.139**	0.084±0.004	0.291**
K_i [μM]					1.26±0.22***	0.441±0.022	0.163±0.003***
k_{2nd} [$\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$]					11100±939	190569±1638	178388±17140
PF400							
IC_{50}^* [μM]					62.0±8.0		
k_f [min^{-1}]	OPrPh	ni	ni	ni	0.960**	ni	ni
K_i [μM]					28.6±3.7***		
k_{2nd} [$\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$]					3349±48		

* IC_{50} aus dem linearen Teil der Umsatz-Zeit-Kurven ermittelt

** aus $k_{2nd} = \frac{k_f}{K_i}$ berechnet

*** siehe Kap. 4.1.3: Da $[I] \ll K_i$ wurde k_{2nd} über die Auftragung von k_{obs} gegen $[I]$ als Näherung bestimmt und K_i über die *Cheng-Prusoff*-Gleichung aus dem IC_{50} berechnet

Zeigt **PF349** mit einem Ethylester noch keine Aktivität > 50 % bei 20 μM , so erzielt **PF345** mit Cyclohexylmethyl-Rest bereits nennenswerte Aktivität. Aufgrund des bereits diskutierten, vermutlich noch zu geringen sterischen Anspruchs des Cyclohexylmethyl-Rests, ist **PF345** aber nur selektiv für Cathepsin-L-ähnliche Cysteinproteasen. Dies ändert sich hin zum Derivat **PF350**, welches den sterisch noch anspruchsvolleren 2-Phenylethyl-Rest trägt. **PF350** ist selektiver und hemmt so nur parasitäre Cathepsin-L-ähnliche Cysteinproteasen. Das nur um eine weitere Einheit in der C-Kette verlängerte Derivat **PF400**, wie auch das *tert*-Butyl-Derivat **PF382**, scheinen wiederum sterisch zu anspruchsvoll und zeigen keine bzw. nur sehr geringe Hemmwirkung.

Werden die drei Verbindungen mit der höchsten Aktivität und größten Selektivität der **PF**-Reihe mit den Leitstrukturen **RV122C** und **CS09** verglichen, zeigt sich eine Verbesserung der Selektivität. Ist **CS09** nur selektiv gegen parasitäre Cathepsin-L-ähnliche Cysteinproteasen, sind die meisten Derivate der **PF**-Reihe LmCPB2.8-selektive Verbindungen. Außerdem ist auch eine Verbesserung der Aktivität vom micro- in den nanomolaren Bereich festzustellen. Letzteres gilt für **PF362** als Vertreter der symmetrischen, **PF294** als Vertreter der unsymmetrischen Derivate und besonders für den Halbesther **PF350**.

Aus den Ergebnissen der Docking-Studien wurde auf eine tiefere S_1 -Bindungstasche in LmCPB2.8 im Vergleich mit Cruzain geschlossen. Dies wirft nun aber Fragen bezüglich des aus der Analyse der **CS**-Reihe ermittelten Trends auf, welcher für einen anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus spricht (siehe auch Kap. 3.2.1.4). Hier wurde nämlich ein Substrat-ähnlicher Bindungsmodus deswegen ausgeschlossen, weil nur die S_1 -, nicht aber die S_1 -Bindungstasche die Aminosäure-Reste der Derivate (Phg-, Phe- bzw. hPhe) aufnehmen konnte. Im Falle einer tieferen S_1 -Bindungstasche in der *Leishmania*-Protease LmCPB2.8 könnte diese Tasche aber auch z.B. den Rest des hPhe-Derivats **CS32** aufnehmen. Dies ließe dann wiederum die Vermutung eines Substrat-ähnlichen Bindungsmodus zu. Die aus den Docking-Studien der **PF**-Derivate als K.O.-Kandidaten herausgefilterten Verbindungen und deren Ergebnisse in den Enzymtests, wie auch die Ergebnisse der Halbesther, sprechen aber eindeutig gegen einen solchen Substrat-ähnlichen Bindungsmodus.

Um die Vermutung der tieferen S_1 -Bindungstasche in LmCPB2.8 weiter zu untermauern wurde mittels der MOE-Software¹⁹² ein Homologiemodell aus der Sequenz der *Leishmania*-Protease LmCPB2.8 (P36400, UniProtKB-Nummer¹⁹³) und der Kristallstruktur von Cruzain (1ME4⁶⁶, PDB-Datenbank³⁴⁻³⁷) erstellt (L. Irsheid, unveröffentl. Ergebnisse). Aus der Überlagerung der 3D-Strukturen dieses Homologiemodells und Cruzain konnten – wie aus dem Vergleich der Sequenzen bereits zu erwarten war – keine entscheidenden Unterschiede in den beteiligten Aminosäure abgeleitet werden, die eine tiefere S_1 -Bindungstasche in LmCPB2.8 vermuten lassen (Abb. 5.-7). Jedoch befindet sich Trp-310 im Homologiemodell, relativ zu Trp-309 in Cruzain, um 0.5 Å niedriger in der S_1 -Bindungstasche (Abb. 5.-7, orangener Kreis, Tryptophan in LmCPB2.8 in blau, in Cruzain in rot eingefärbt). Grund hierfür ist die zu Trp-139 in Cruzain im Homologiemodell unterschiedliche Aminosäure Phe-270, die sich darunter innerhalb des Enzyms befindet (Abb. 5.-7, blauer Kreis, blaues Phenylalanin in LmCPB2.8, rotes Tryptophan in Cruzain). Insgesamt ergibt sich so im Homologiemodell mehr Raum für größere Reste. Ein weiterer Grund für eine abweichende Toleranz von größeren Resten zwischen Cruzain und LmCPB2.8 könnte sich aus den aufgezeigten Unterschieden für die in der S_1 -Bindungstasche stabilisierten Wassermoleküle ergeben.

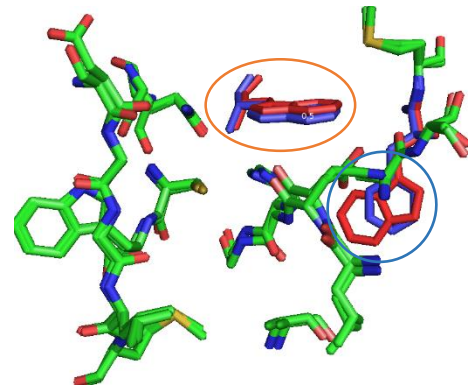
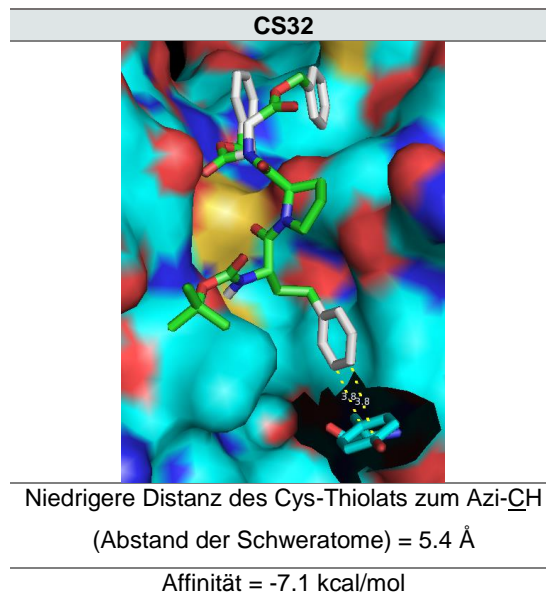


Abb. 5.-7: Ausschnitt der Überlagerung der S_1 -Bindungstasche mit Unterschieden zwischen dem erstellten Homologiemodell von LmCPB2.8 (blau) und Cruzain (rot)

Bei einem ersten Docking am Homologiemodell zeigen sich außerdem für die S₂-Bindungstasche neue Erkenntnisse. So sollte diese nicht nur mit geringerem energetischen Aufwand (einfachere Verdrängung von Wassermolekülen im Vergleich zu Cruzain siehe Kap. 3.2.1.4) sterisch anspruchsvollere Reste aufnehmen können, sondern es sollte für die jeweiligen aromatischen Reste der Ester der **CS**-Derivate **CS31**, **CS32** und **CS33** in LmCPB2.8 auch ein energetisch günstiges *edge-to-face* π - π -stacking mit Tyr-209 möglich sein (Tab. 5.-8). Dies ist neben der vorhandenen Selektivität auch eine mögliche Erklärung für die niedrigen K_f -Werte dieser Verbindungen an LmCPB2.8. Außerdem liefert ein fehlendes *edge-to-face* π - π -stacking der Cyclohexyl-Derivate **CS28** und **CS29** eine mögliche Erklärung für deren Inaktivität in den Enzymtests an LmCPB2.8.

Tab. 5.8: Mögliches *edge-to-face* π - π -stacking der aromatischen Reste der **CS**-Derivate (am Beispiel von **CS32**) mit Tyr-209 des LmCPB2.8 Homologiemodells



In der Analyse der an LmCPB2.8 aktiven Derivate sollen im Folgenden, neben der jeweiligen Symmetrie der Verbindung, die Ergebnisse der bereits diskutierten Selektivität aus den Enzymtests, der Tests auf Zytotoxizität sowie die LE- und LLE-Werte betrachtet werden (Abb. 5.-9).

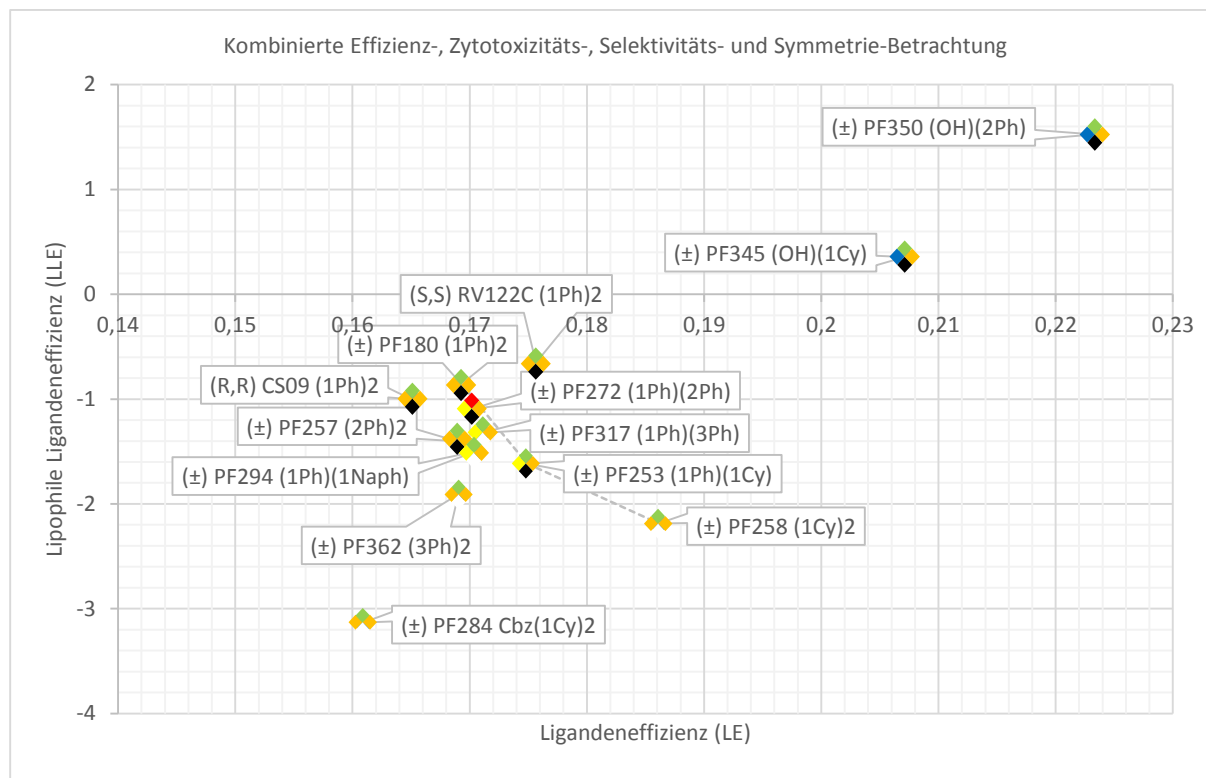


Abb. 5.-9: Kombinierte Effizienz-, Zytotoxizitäts-, Selektivitäts- und Symmetrie-Betrachtung der im Enzymassay an LmCPB2.8 aktiven Derivate – Farbcode der Raute: Oben, Zytotoxizität: grün = nicht zytotoxisch, rot = zytotoxisch; unten, Selektivität: weiß = selektiv für LmCPB2.8, schwarz = hemmt weitere Enzyme; links und rechts, Rest am Aziridin: orange/orange = symmetrisch, zwei Ester, gelb/orange = unsymmetrisch, zwei Ester, blau/orange = eine freie Carboxy-Funktion, ein Ester – Verbindungen sind nach Angabe der Stereoinformation (z.B. (R,R) für (2R,3R)-Aziridin-2,3-dicarboxylat, bzw. (±) für *trans*-konfiguriertes Diastereomerenpaar) als Labornummern mit Schutzgruppe (Cbz/ohne = Boc) und Resten (als Zahl n = (CH₂)_n und Gruppe OH/Cy/Ph/Naph = Säure/Cyclohexyl/Phenyl/Naphthalin-2-yl) angegeben (z.B. (R,R) **CS09** (1Ph)₂ für Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn)₂)

In der Gesamtbetrachtung für die Auswahl einer zukünftigen Leitstruktur bzw. für Empfehlungen zur weiteren Optimierung dieser Substanzklasse lässt sich für die Diester-Derivate bereits jetzt festhalten, dass längere/größere Reste gewählt werden sollten. Diese zeigen eine verbesserte Aktivität und Selektivität gegenüber LmCPB2.8, wenn auch bei geringeren Ligandeneffizienzen. Letztere sollten sich erst wieder durch das gezielte Herstellen von direkten Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein verbessern lassen, was aktuell durch die fehlende Röntgenstruktur erschwert wird. Vergleicht man die symmetrischen mit den unsymmetrischen Diester-Verbindungen, zeigen die symmetrischen zwar die niedrigeren K_i -Werte, dies aber bei schlechteren Effizienzen. Einige unsymmetrische Diester-Derivate zeigen außerdem eine gewisse Toxizität. Der Vorteil der unsymmetrischen Diester-Verbindungen mit Benzylester liegt weiterhin in der Hydrolysebarkeit zu den entsprechenden Halbestern. Entsprechend synthetisierte Halbestern zeigen keine Toxizität, erzielen

aber, aufgrund der neu ausgebildeten ionischen Wechselwirkung der frei werdenden Carboxy-Funktion mit dem Histidin, eine deutlich verbesserte Hemmung von LmCPB2.8. Bei kleineren Ester-Resten geht die Selektivität von der Diester-Verbindung zum Halbester hin verloren. Durch größere Reste (2-Phenylethyl, **PF350**) lässt sich bis zu einem gewissen Grad erneut Selektivität erzielen. Im Gegensatz zum Diester-Edukt **PF317** zeigt aber der sterisch noch anspruchsvollere 3-Phenylpropyl-Rest im Halbester **PF400** keine Aktivität mehr an LmCPB2.8.

Als neue Leitstrukturen sollten demnach die drei Verbindungen **PF362**, **PF294** und **PF350** angesehen werden. Auf Stufe der Diester gilt es, durch Variation der Ester-Reste, zum einen die Tiefe und zum anderen die chemisch-physikalischen Eigenschaften der zu adressierenden Bindungstasche besser zu bestimmen. Denkbar sind hier Reste mit geringeren Freiheitsgraden (z.B. Benzofuran, Benzothiophen) oder Aromaten mit unterschiedlichen Substituenten (z.B. Halogene, Methyl-, Nitro-Gruppe etc.) (Abb. 5.-10).

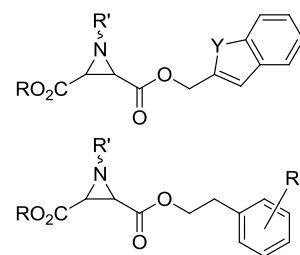


Abb. 5.-10: Mögliche erste Weiterentwicklungen der Diester-Leitstrukturen

Weiterhin lässt der Vergleich der *cis*- und *trans*-3-Benzoyloxycarbonylaziridin-2-carbonsäure-

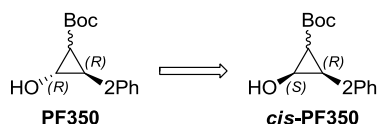


Abb. 5.-11: Anzustrebende Konfigurationsänderung der 3-Benzoyloxycarbonylaziridin-2-carbonsäure-Derivate – Legende siehe Abb.

5.-1 oben

Derivate im Docking weiteres Optimierungspotential vermuten. Für einen Bindungsmodus mit geringen Abständen zwischen dem Cys-Thiolat und den Aziridins sowie der Carboxy-Funktion zum Histidin-Rest ist laut Docking die (2*S*,3*R*)- der (2*R*,3*R*)-Konfiguration am Aziridin überlegen. Interessant wäre daher der Vergleich der Aktivitäten in den Enzymassays zwischen **PF350** und ***cis*-PF350**

(Abb. 5.-11). Der Weg der Darstellung des *cis*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylats, welches als Baustein in der Synthese für ***cis*-PF350** benötigt wird, konnte dafür in der vorliegenden Arbeit bereits etabliert werden.

Möglicherweise ließe sich bei den *cis*-konfigurierten 3-Carbonylaziridin-2-carbonsäure-Derivaten außerdem durch die Verlängerung der C-Kette analog **PF400** auch die Selektivität innerhalb der Halbester verbessern.

Ferner sind die unterschiedlichen Erkenntnisse dieser Arbeit möglicherweise in einem Molekül vereinbar. An den Derivaten der **CS**-Reihe konnte eine Affinitäts- und Selektivitätssteigerung durch anspruchsvolle, aromatische Reste anstelle des (S)-Leucins durch z.B. (S)-homophenylalanin (**CS32**) gezeigt werden. Diese sollten laut Analyse der Sequenz und des Ho-

mologiemo­dells von LmCPB2.8 mit geringerem energetischen Aufwand als z.B. bei Cruzain in die S_2 -Bindungstasche dirigiert werden. Da sich die Bindungs­posen der **CS**-Derivate kaum von denen der **PF**-Derivate unterscheiden, liegen die Benzylester von z.B. **CS32** wie die Diester-Derivate der **PF**-Reihe im *sandwich* π - π -stacking in der S_1 -Bindungstasche vor (Abb. 5.-8, S. 154). An den Derivaten der **PF**-Reihe konnte ebenfalls eine Affinitäts- und Selektivitätssteigerung durch anspruchsvolle, aromatische Reste anstelle der Benzylester gezeigt werden. Durch den Vergleich der Ergebnisse der Enzymtests an Cruzain und LmCPB2.8 und durch das Homologiemo­dell von LmCPB2.8 konnte auf eine tiefere S_1 -Bindungstasche in LmCPB2.8 geschlossen werden, in die die Diester-Reste dirigiert werden. Die Verknüpfung beider Erkenntnisse liefert z.B. in der Struktur Boc-(S)-hPhe-(R)-Pro-(±)-Azi(OPrPh)₂ jedoch einen potentiellen Inhibitor, der aufgrund seiner Lipophilie u.A. schlechte LLE-Werte und damit sehr wahrscheinlich auch eine geringe *drug likeness* aufweisen sollte.

Die Halbestere zeigen ebenfalls eine deutlich verbesserte Affinität. Sie sind aber nicht in der Lage die Selektivität ihrer Edukt-Diester aufrechtzuerhalten – vermutlich aufgrund eines leicht versetzten Bindungsmodus – auch wenn sterisch anspruchsvolle Reste die Selektivität in gewissem Maß hin zu LmCPB2.8-selektiven Verbindungen verbessern. Dieser Nachteil der, den Diestern von der Affinität und Hydrophilie her überlegenen Halbestere ließe sich aber möglicherweise durch den eingangs beschriebenen Tausch der Aminosäuren ausgleichen. Für eine solche Struktur (hier am Beispiel von Boc-(S)-hPhe-(R)-Pro-Azi(OH)(OEtPh)) denkbare Wechselwirkungen mit dem Enzym sind in Abb. 5.-12 gezeigt. Die Frage der günstigeren Konfiguration am Aziridin stellt sich allerdings auch hier.

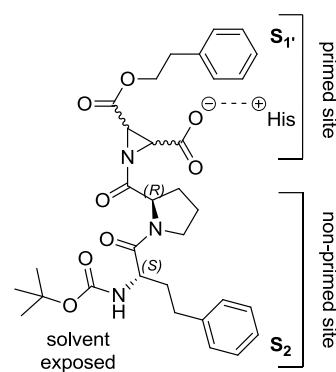


Abb. 5.-12: Kombination der Erkenntnisse aus den Ergebnissen mit den Inhibitoren der **CS**- und **PF**-Reihen: Ein potentieller Inhibitor mit anspruchsvollen Resten im Dipeptid und am Ester sowie einer freien Carboxy-Funktion am Aziridin

6. Zusammenfassung

Motivation

Die Leishmaniose gehört als eine der „vernachlässigten tropischen Erkrankungen“ zu den chronischen, schwächenden und auch stigmatisierenden Krankheiten. Sie wird durch parasitäre Protozoen ausgelöst. Weltweit sind ca. 12 Mio. Menschen infiziert, ca. 70 Tausend erliegen ihr jährlich. Die aktuelle Therapie wird überschattet von Toxizitäts- und Teratogenitätsproblemen der verfügbaren Arzneimittel, deren niedriges Ansprechen bei Koinfektionen und von aufkommenden Resistenzen. Ein immer besseres Verständnis der Krankheitsprozesse sowie Veröffentlichungen von parasitären Protein-Kristall-Strukturen beschleunigen die Forschung in Richtung neuer Medikamente. So wurden Papain-ähnliche Cysteinproteasen auch in verschiedenen *Leishmania*-Arten identifiziert. Bekannt ist, dass Cysteinproteasen wesentliche Virulenzfaktoren für Leishmanien sind, die das Immunsystem des Wirts zum Vorteil des Parasiten manipulieren können. So lieferte die Hemmung dieser Peptidasen bereits vielversprechende Ergebnisse sowohl *in vitro*, in Gewebekulturmodellen, als auch *in vivo*. Das macht sie zu potentiellen Therapie-*targets*. Aufgrund der evolutionären Verwandtschaft der Enzyme sind die parasitären Cysteinproteasen strukturell den humanen jedoch sehr ähnlich. Die Herausforderung bei der Entwicklung antiparasitärer Wirkstoffe, basierend auf der Hemmung dieser Proteasen, besteht deshalb darin, sehr selektive Inhibitoren zu entwickeln, die die Wirtsproteasen nicht, oder nur in einem vertretbaren Rahmen, inhibieren.

Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Weiterentwicklung der Aziridin-2,3-dicarbonsäure-basierten Cysteinproteaseinhibitoren **RV122C** bzw. **CS09** hinsichtlich Selektivität und Aktivität gegenüber der parasitären Cathepsin-L-ähnlichen Cystein-Protease LmCPB2.8 durch Design, incl. Docking, Synthese und Testung. Dabei sollten die, laut postulierten möglichen Bindungsmodi von **RV122C**, für die Bindung in das Enzym nicht essenziellen Gruppen - ein Benzylester sowie die Boc-Schutzgruppe - ausgetauscht werden. Neben der Darstellung symmetrischer Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierter Inhibitoren mit verschiedenen Diestern, dem Tausch der Boc-Schutzgruppe bzw. der Entschützung des *N*-terminalen Amins zu einer freien NH₂-Funktion, sollte das Hauptaugenmerk auf die Einführung einer freien Carboxy-Funktion am Aziridin gelegt werden (Abb. 6.-1). Das Ziel hierbei liegt im Generieren einer ionischen Wechselwirkung zwischen der Carboxy-Funktion und dem Histidinium-Rest des katalytischen Zentrums. Diese Wechselwirkung erhöht die Hemmwirkung nachweislich in anderen Inhibitoren, z.B. den strukturell verwandten Inhibitoren mit Epoxid-Ring. Bei allen Inhibitoren

handelt es sich dabei um potenziell irreversible, kovalente und kompetitive Inhibitoren. Deren Hemmwirkung sollte mit Hilfe fluorimetrischer Enzymassays bestimmt werden. Gegebenenfalls sollten auch weitere biologische Testungen durchgeführt werden. Aus den Ergebnissen sollten ferner Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden.

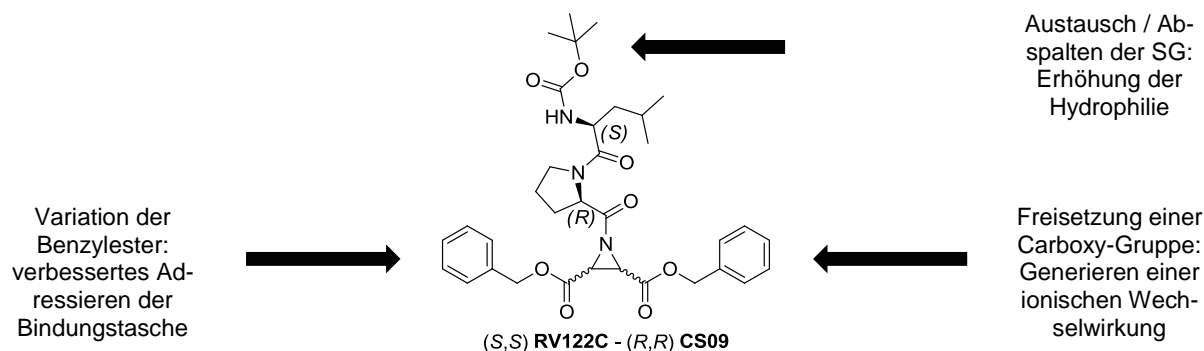


Abb. 6.-1: Struktur von **RV122C** bzw. **CS09** und geplante Modifikationen

Synthetische Darstellung der trans-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Inhibitoren

Zur Darstellung der symmetrischen, zwei gleiche Ester am racemischen *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylat tragenden, Derivate wurde die bekannte Syntheseroute der Michael-Addition von *S,S*-Diphenylsulfimin (DPSI) an symmetrische Fumarate genutzt. Für unsymmetrische, verschiedene Ester tragende Derivate wurde ein neuer Weg der Darstellung gefunden. So lassen sich (*2E*)-But-2-endoate mit gemischten Estern aus Maleinsäureanhydrid bzw. (*2Z*)-Monoestermaleat darstellen. Die Isomerisierung während der Veresterung zu entweder unsymmetrischen (*2Z*)- oder (*2E*)-But-2-endoaten ist dabei über die Äquivalente an DMAP, die Reaktionszeit und die Temperatur steuerbar. Der Ringschluss erfolgt analog durch die Michael-Addition mit DPSI. In die durch Standard-Peptidkupplungsreagenzien synthetisierten Peptidbausteine wurde die hydrophile GlycAc-Schutzgruppe (2-(2-Methoxyethoxy)acetyl) neu eingeführt. Die Fragmentkupplung der Dipeptide und Aziridine zu Tripeptiden erfolgte mit PPA als Kupplungsreagenz, die Darstellung der 3-Carbonylaziridin-2-carbonsäure-basierten Inhibitoren anschließend hydrolytisch aus den Benzylestern. Tab. 6.-2 zeigt die Übersicht der Inhibitoren.

Tab. 6.-2: Übersicht der dargestellten Inhibitoren mit Labornummer (Lab. Nr.), Schutzgruppe (SG), Aminosäuren (AS₁ & AS₂), *warhead* (WH: Azi = diastereomerenreines *trans*-konfiguriertes Aziridin-2,3-dicarboxylat mit Abgabe der absoluten Information oder als *trans*-konfiguriertes Diastereomerenpaar: (±)), Resten in üblicher Abkürzung bzw. als Kette plus Rest (z.B. OMeCy = Cyclohexylmethyl oder OMeNaph = Naphthalin-2-ylmethyl bzw. Säure = OH) und *K_i*-Werten [in μM] an LmCPB2.8. Veränderungen zur jeweils vorgehenden Verbindung sind **fett** angezeigt. – ni = no inhibition, *K_i* > 100 μM – Allgemeine Struktur: SG-(S)-Caa-(R)-Pro-WH(R₁)(R₂)

#	Lab. Nr.	SG	AS ₁	AS ₂	WH	R ₁	R ₂	LmCPB [μM]
1	RV122C	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(S,S)-Azi	OBn	OBn	1.7
2	CS09	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(R,R)-Azi	OBn	OBn	3.8
3	PF180	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	OBn	2.8 ^{theor.*}
4	PF128	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(S)-Asp	OBn	OBn	ni
5	PF381	GlycAc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	OBn	ni
6	PF326	GlycAc	(S)-Ile	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	OBn	ni
7	PF258	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OMeCy	OMeCy	0.77±0.05
8	PF284	Cbz	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OMeCy	OMeCy	2.3±0.2
9	PF257	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OEtPh	OEtPh	1.6±0.1
10	PF362	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OPrPh	OPrPh	0.9±0.1
11	PF270	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	OEt	ni
12	PF349	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OH	OEt	ni
13	PF289	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	O^tBu	ni
14	PF382	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OH	O ^t Bu	ni
15	PF253	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	OMeCy	1.8±0.4
16	PF345	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OH	OMeCy	nd
17	PF272	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	OEtPh	1.92±0.06
18	PF350	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OH	OEtPh	0.441±0.022
19	PF317	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	OPrPh	1.36±0.05
20	PF400	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OH	OPrPh	ni
21	PF294	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	OMeNaph	0.8±0.3

* Das Diastereomerenpaar **PF180** wurde nicht getestet. Theoretischer Mittelwert der *K_i*-Werte aus den Testergebnissen der diastereomerenreinen Leitstrukturen **RV122C** und **CS09** (detaillierte Erklärung siehe Kap. 4.1.5).

Die Freisetzung des *N*-terminalen freien Amins erwies sich weiterhin als nicht durchführbar. Selbst die Wahl von vergleichsweise milden Reaktionsbedingungen (Hydrogenolyse), um die Cbz-Schutzgruppe zu entfernen, resultierte in der Abspaltung des *N*-unsubstituierten Aziridins vom Peptid. Vermutet wird hier ein intramolekularer 6-exo-trig Angriff (Abb. 6.-3).

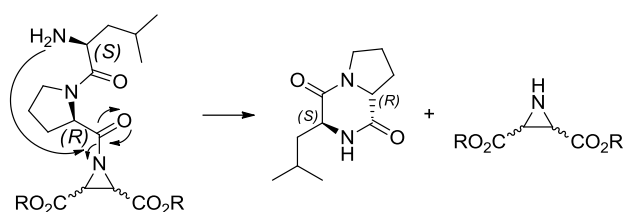


Abb. 6.-3: Möglicher intramolekularer Ringschluss unter Abspaltung des *N*-unsubstituierten Aziridins vom Peptid –
R = Cyclohexylmethyl

Molekulares Docking der **PF**- und **CS**-Derivate

Zunächst wurde das Programm AutoDock Vina für die Vorhersage von Bindungsmodi für Cysteinproteaseinhibitoren der Papainfamilie anhand veröffentlichter Kristallstrukturen getestet. Danach wurden die **PF**-Derivate im Docking an Cruzain als verwandtes Modellenzym für LmCPB2.8 untersucht. Dabei konnten die bereits in früheren Arbeiten vermuteten zwei Bindungsmodi, ein anti-Substrat und ein Substrat-ähnlicher wiedergefunden werden (entgegengesetzter bzw. paralleler Verlauf der peptischen bzw. peptid-ähnlichen Grundstruktur des Inhibitors und der Substratbindespalte des Enzyms). Die Untersuchung der Diastereomerenpaare zeigte weiterhin, dass für den anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus die (*R,R*)-, für den Substrat-ähnlichen Bindungsmodus die (*S,S*)-Konfiguration am Aziridin-Ring die bevorzugte ist. Der anti-Substrat-ähnliche Bindungsmodus ist dabei im Vergleich im Docking, passend zu den Ergebnissen dieser Verbindungsklasse in früheren Enzymtests, weniger sensitiv gegenüber Konfigurationsänderungen am Aziridin-Ring. Weiterhin wurden Trendanalysen innerhalb der Derivat-Reihen für einen Vergleich mit den späteren Enzymtests durchgeführt, und K.O.-Kandidaten zur Unterscheidung zwischen den Bindungsmodi herausgefiltert. Die Analyse von bereits getesteten **CS**-Derivaten ergab in der Reihe **CS30**, **CS31** und **CS32** durch Adressierung der S_2 -Bindungstasche außerdem einen weiteren Hinweis für einen anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus. Die Gesamtbetrachtung der Dockingergebnisse lieferte Hinweise für folgende zwei Optimierungsmöglichkeiten: 1. Tausch der hydrophilen GlycAc-(2-(2-Methoxyethoxy)acetyl) gegen z.B. die weniger hydrophile PyAc-Schutzgruppe (2-(Pyridin-4-yl)acetyl) sowie 2. Änderung der Konfiguration von *trans*- zu *cis*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten.

Synthetische Darstellung eines *cis*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylats als Konsequenz des Dockings

Synthetisch war kein Weg zu unsymmetrischen, *N*-unsubstituierten, *cis*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten aus der Literatur bekannt. Der Ringschluss zum *cis*-Aziridin-2,3-dicarboxylat führt aber nur über die *syn*-Azidoalkohole, die als Intermediate der stereoselektiven Syntheseroute erhalten werden. Da aber die Einführung zweier verschiedener Ester auf dieser Syntheseroute nicht möglich war, musste der Weg der oben beschriebenen But-2-endoate mit verschiedenen Estern mit der stereoselektiven Syntheseroute verknüpft werden. Als zielführend erwies sich die Umwandlung der (2*Z*)-But-2-endoate über *cis*-vicinale Dihydroxylierung in *anti*-Tartrate, welche das Grundgerüst der stereoselektiven Syntheseroute für die *syn*-Azidoalkohole darstellen (Abb. 6.-4). Die Verknüpfung des so dargestellten racemischen *cis*-Aziridin-2,3-dicarboxylats mit verschiedenen Estern in 2- und 3-Position mit dem entsprechenden Dipeptid konnte im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht mehr realisiert werden.

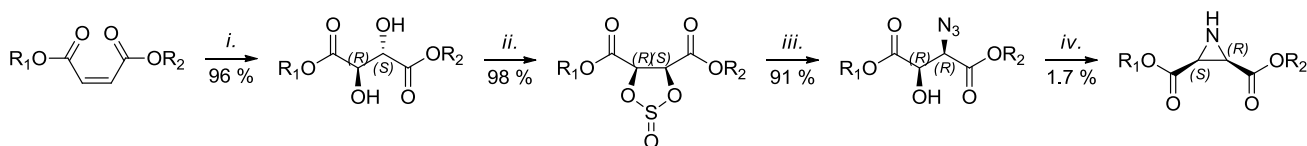


Abb. 6.-4: Syntheseroute der Darstellung von racemischen *cis*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten aus unsymmetrischen (2*Z*)-But-2-endoaten – Informationen über ebenfalls entstehende Isomere sind für eine bessere Übersichtlichkeit weggelassen – $R_1 = \text{Benzyl}$, $R_2 = 2\text{-Phenylethyl}$

i. 0.2 mol % $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.1 Äq. NMO, 0.75 Äq. Zitronensäure, $t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ [1:1], 12 h RT; *ii.* 1.1 Äq. SOCl_2 , DMF_{kat} , DCM, 1 h 0 °C, 2 h RT, 1 h reflux; *iii.* 2.0 Äq. NaN_3 , DMF_{abs} , 72 h RT; *iv.* 2.0 Äq. NaN_3 , DMF_{abs} , 72 h RT; *v.* 1.1 Äq. PPh_3 , DMF, 4.5 h 83 °C

Ergebnisse der Enzymassays und biologischen Untersuchungen

Die dargestellten Verbindungen wurden in Enzymassays an den Cysteinproteasen Cathepsin-B, -L, Cruzain, Falcipain-2, LmCPB2.8 und Rhodesain auf ihre inhibitorische Aktivität getestet. Dabei zeigte sich sowohl bei den symmetrischen wie unsymmetrischen Derivaten mit größeren Ester-Resten erhöhte Aktivität bei gleichzeitig verbesserter Selektivität. Dies trifft besonders für die Diester-Derivate **PF317**, **PF294** und **PF362** zu. Sie sind selektiv gegenüber LmCPB2.8 bei K_i -Werten im niederen micromolaren Bereich (**PF317** $K_i = 1.36 \pm 0.05 \mu\text{M}$) bzw. liegen an der Grenze zum nanomolaren Bereich (**PF294** $K_i = 0.8 \pm 0.3 \mu\text{M}$ und **PF362** $K_i = 0.9 \pm 0.1 \mu\text{M}$). Die Halbesten zeigen ebenfalls eine deutlich verbesserte inhibitorische Aktivität mit K_i -Werten im nanomolaren Bereich, zeigen jedoch im Gegensatz zu den

Diester-Derivaten keine Selektivität innerhalb der Cathepsin-L-ähnlichen Cysteinproteasen. Nur **PF350** ($K_i = 0.441 \mu\text{M}$ an LmCPB2.8) ist selektiv für parasitäre Cathepsin-L-ähnliche Cysteinproteasen. Weiterhin erwiesen sich zum einen (wider Erwarten) der Austausch der Schutzgruppe sowie zum anderen (erwartungsgemäß) die Substitution des *warheads* als kontraproduktiv für die Enzymhemmung. Letzteres ist im Einklang mit dem Postulat, dass das Aziridin-2,3-dicarboxylat essenziell für eine Hemmung ist. Am offenkettigen Tripeptid **PF128** ohne *warhead* ((S)-Asp anstelle von (±)-Azi) kann kein nucleophiler Angriff des Cys-Thiolats an 2- bzw. 3-Position erfolgen.

Im Rahmen der interdisziplinären Zusammenarbeit des Sonderforschungsbereichs 630 wurden die Verbindungen außerdem auf antiparasitäre Aktivität an Leishmanien und Trypanosomen sowie auf ihre Zytotoxizität getestet. An den Leishmanien zeigen nur die Derivate mit kürzerer C-Kette, die in den Enzymassays größtenteils nicht aktiv sind, Aktivität. Diese scheint aber auf ihre Zytotoxizität zurückzuführen zu sein. Die Derivate mit verlängerter C-Kette, die in den Enzymassays sehr aktiv sind, zeigen hingegen keine nennenswerte anti-leishmaniale Aktivität. Die meisten Verbindungen zeigen allerdings antitrypanosomale Aktivität, wobei das nicht toxische Derivat **PF284** mit einem IC_{50} von $1.73 \mu\text{M}$ (48 h), bzw. $2.55 \mu\text{M}$ (72 h) hervorzuheben ist.

Ergebnisse des Vergleichs des Dockings mit den Enzymtests an Cruzain

Im Vergleich der Ergebnisse des Dockings an Cruzain mit den Ergebnissen der Enzymassays an Cruzain konnte eine recht gute Übereinstimmung für den anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus gefunden werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die (R,R)-Konfiguration im Diastereomerenpaar der (S,S)-Konfiguration auch in der Enzymhemmung überlegen und damit ausschlaggebend für die sich ergebenden Trends ist. Neben den K.O.-Kandidaten **PF253**, **PF284** und **PF294**, deren Inaktivitäten nur in das Konzept des anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus passen – für den Substrat-ähnlichen Bindungsmodus wären hier im Vergleich mit den Leitstrukturen zum Teil deutlich bessere Aktivitäten zu erwarten gewesen –, lassen sich nur so auch die relativen Trends zwischen den Diester-Derivaten erklären. So zeigen nur die Diester-Derivate mit kurzer C-Kette zum aromatischen Rest in den Enzymtest an Cruzain hohe Aktivitäten. Die Derivate mit verlängerter C-Kette zum aromatischen Rest sind inaktiv an Cruzain, passend zu den geringeren Affinitäten im Docking.

Die Analyse der Ergebnisse, die mit den Halbestern erhalten wurden, gestaltet sich hingegen schwieriger. Hier passen die Docking-Ergebnisse und Ergebnisse der Enzymtests weniger gut zusammen. Im Docking wird die ionische Wechselwirkung zwischen der freien Carboxy-Funktion und dem Imidazol des Histidins durch die Adressierung der S_1 -Bindungstasche

wegen des verbleibenden Ester-Rests verhindert, und somit nicht berücksichtigt. AutoDock Vina gewichtet die starke ionische Wechselwirkung entweder zu gering, oder eine Anpassung der Strukturen in den *active site cleft* ist für Bindungsposes mit ionischer Wechselwirkung so stark erschwert, dass deutlich geringere Affinitäten als für Bindungsposes ohne ionische Wechselwirkung errechnet werden. Da jedoch experimentell eine ionische Wechselwirkung nachgewiesen werden konnte, muss von einer erschweren Adressierung der S_1 -Bindungstasche durch die Ester-Reste ausgegangen werden. Aus einer zu dieser Problematik passenden, im Docking ermittelten Bindungspose zur Struktur **trans-Bn-H-(R,R)** (Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OH)(OBn), siehe Kap. 3.2.1.3.3) lässt sich folgern, dass die Halbestere, im Vergleich mit den Diestern, aufgrund der ionischen Wechselwirkung, einen etwas versetzten Bindungsmodus aufweisen müssen. So zeigt sich aus den Ergebnissen der Enzymtests an Cruzain, dass nur noch der Cyclohexylmethyl-Rest von **PF345** komplett in die S_1 -Bindungstasche passt. In diesem Zusammenhang sei noch einmal auf die bereits erwähnte Optimierungsmöglichkeit in der Konfigurationsänderung von den *trans*- zu den *cis*-3-Carbonyl-aziridin-2-carbonsäuren verwiesen, was sich für die Halbestere positiv auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k_i auswirken sollte.

Ergebnisse des Vergleichs der Enzymtests an Cruzain und LmCPB2.8

Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass, im Gegensatz zu Cruzain, an LmCPB2.8 sterisch sehr große Ester-Reste (**PF294** und **PF362**) auch zu sehr niedrigen K_i -Werten führen. Bezogen auf die unbekannt 3D-Struktur von LmCPB2.8 sollte das bedeuten, dass – ein anti-Substrat-ähnlicher Bindungsmodus vorausgesetzt – das Enzym eine tiefere S_1 -Bindungstasche als Cruzain aufweist. Die sterisch sehr anspruchsvollen 3-Phenylpropyl- bzw. Naphthalin-2-ylmethyl-Reste führen zu einer besseren Hemmung von LmCPB2.8. Außerdem sind diese Derivate selektiv innerhalb der Cathepsin-L-ähnlichen Cysteinproteasen für LmCPB2.8. Die Kenntnis dieser entscheidenden Strukturinformation sollte die Weiterentwicklung der Inhibitoren dieser Substanzklasse als selektive antileishmaniale Wirkstoffe erleichtern. Aufgrund der offensichtlich tieferen S_1 -Bindungstasche zeigt der an Cruzain inaktive Inhibitor **PF350** mit 2-Phenylethyl-Rest an der *Leishmania*-Protease LmCPB2.8 eine sehr gute Hemmung ($K_i = 0.441 \mu\text{M}$).

Ergebnisse des Vergleichs von Cruzain und dem LmCPB2.8 Homologiemodell

Der Vergleich der Strukturen von Cruzain und dem LmCPB2.8-Homologiemodell zeigt in LmCPB2.8 mit Phe-270 unterhalb der S₁-Bindungstasche eine sterisch weniger anspruchsvolle Aminosäure als das mit Trp-139 in Cruzain der Fall ist. Dadurch kommt Trp-310 der *Leishmania*-Protease im Vergleich 0.5 Å tiefer in der S₁-Bindungstasche zu liegen, wodurch in LmCPB2.8 mehr Raum für größere Reste geschaffen wird. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Enzymtests an Cruzain und LmCPB2.8 und den Ergebnissen des Dockings für einen anti-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus, in dem die Ester-Reste in die S₁-Bindungstasche dirigiert werden. So sind **PF**-Derivate mit großen Ester-Resten selektiv für LmCPB2.8 und zeigen an Cruzain keine Aktivität. Für die S₂-Bindungstasche sind Unterschiede bereits aus der Sequenz bekannt. Im Gegensatz zu Cruzain, das durch Asp-69, Glu-208 und Ser-210 laut Kristallstruktur zwei Wassermoleküle in der S₂-Bindungstasche stabilisiert, befinden sich in LmCPB2.8 an dieser Stelle mit Leucin, Tyrosin und Valin lipophile und aromatische Aminosäuren. Wassermoleküle sollten sich folglich mit geringerem energetischen Aufwand aus dieser lipophilen Tasche verdrängen lassen, wodurch die S₂-Bindungstasche zwar nicht unbedingt tiefer ist, im Vergleich zu Cruzain aber leichter sterisch anspruchsvolle und lipophile Reste aufnehmen kann. Im Homologiemodell zeigt sich bei einem ersten Docking eines **CS**-Derivats in der S₂-Bindungstasche außerdem ein mögliches, energetisch günstiges *edge-to-face* π - π -stacking des aromatischen Rests des Dipeptids mit Tyr-209. Die **CS**-Derivate mit großen Aminosäuren wie Phe, hPhe oder Trp sind laut den Enzymassays selektiv innerhalb der Cathepsin-L-ähnlichen Proteasen der Papain-Familie gegenüber LmCPB2.8, was damit erklärt werden kann.

Effizienzbetrachtung der Verbindungen mit antileishmanialer Aktivität

In der medizinischen Chemie hat sich bei der Beurteilung der Effizienz von Wirkstoffen die Berechnung der *ligand efficiency* (LE) und der *ligand lipophilic efficiency* (LLE) etabliert. Diese, zum einen auf der Summe der Nicht-Wasserstoffatome (*heavy atom count*), zum anderen auf dem clogP-Wert (*calculated logP*) beruhenden, Effizienzwertbetrachtungen sollen im Folgenden mit den Aussagen über Selektivität, Zytotoxizität und Struktur bzw. Symmetrie verknüpft werden (Abb. 6.-5). Die empfohlenen Richtwerte liegen dabei bei einem LE-Wert > 0.3 und einem LLE-Wert > 5. Die Verbindungen mit den höchsten Effizienzen befinden sich somit im rechten oberen Quadranten des nachfolgenden Diagramms.

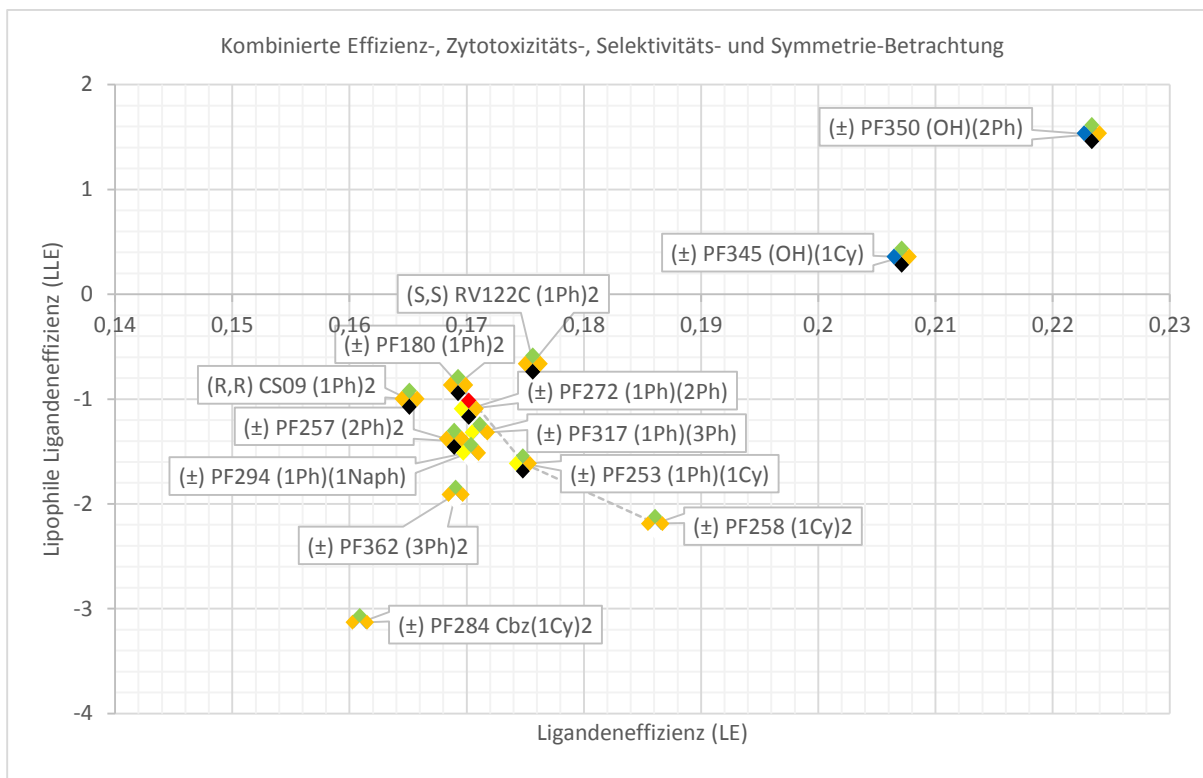


Abb. 6.-5: Kombinierte Effizienz-, Zytotoxizitäts-, Selektivitäts- und Symmetrie-Betrachtung der im Enzymassay an LmCPB2.8 aktiven Derivate – Farbcode der Raute: oben, Zytotoxizität: grün = nicht zytotoxisch, rot = zytotoxisch; unten, Selektivität: weiß = selektiv für LmCPB2.8, schwarz = hemmt weitere Enzyme; links und rechts, Rest am Aziridin: orange/orange = symmetrisch, zwei Ester, gelb/orange = unsymmetrisch, zwei Ester, blau/orange = eine freie Carboxy-Funktion, ein Ester – Verbindungen sind nach Angabe der Stereoinformation (z.B. (R,R) für (2R,3R)-Aziridin-2,3-dicarboxylat, bzw. (±) für *trans*-konfiguriertes Diastereomerenpaar) als Labornummern mit Schutzgruppe (Cbz/ohne = Boc) und Resten (als Zahl n = (CH₂)_n und Gruppe OH/Cy/Ph/Naph = Säure/Cyclohexyl/Phenyl/Naphthalin-2-yl) angegeben (z.B. (R,R) **CS09** (1Ph)₂ für Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(R,R)-Azi(OBn)₂)

Für die Auswahl zukünftiger Leitstrukturen lässt sich zusammenfassen:

- Längere/größere aromatische Reste verbessern die Aktivität und Selektivität gegenüber LmCPB2.8
- Symmetrische Diester zeigen bei ähnlichen Molekulargewichten die niedrigeren K_i Werte an LmCPB2.8 im Vergleich zu den unsymmetrischen Diestern
- Unsymmetrische Diester zeigen bei gleichem Molekulargewicht die besseren Ligandeneffizienzen als die symmetrischen Diester
- Unsymmetrische Diester zeigen bei geringerer Kettenlänge teilweise Zytotoxizität an Makrophagen, unsymmetrische Halbester-Derivate nicht
- Unsymmetrische Diester mit einem Benzylester lassen sich zu Halbester-Derivaten umsetzen, die eine deutlich verbesserte Aktivität u.A. an LmCPB2.8 zeigen

- Halbester-Derivate zeigen im Vergleich zu ihren Leitstrukturen verbesserte K_i -Werte im nanomolaren Bereich
- Kürzere/kleinere zyklische Reste an den Halbestern sind nicht in der Lage die Selektivität ihrer Edukt-Diester aufrechtzuerhalten
- Mit der Vergrößerung des sterischen Anspruchs des in den Halbestern verbleibenden Ester-Rests lässt sich die Selektivität in gewissem Maß hin zu LmCPB2.8-selektiven Verbindungen verbessern
- Die Vergrößerung des in den Halbestern verbleibenden Ester-Rests zum 3-Phenylpropyl-Rest führt bei den *trans*-konfigurierten 3-Benzyloxycarbonylaziridin-2-carbonsäure-Derivaten zum fast vollständigen Verlust jeglicher Aktivität an Cathepsin-L-ähnlichen Cysteinproteasen

Als neue Leitstrukturen sollten demnach die drei Verbindungen **PF362**, **PF294** und **PF350** angesehen werden. Auf Stufe der Diester sollten die in Abb. 6.-6 dargestellten Ester erste Kandidaten sein, da mit diesen überprüft werden kann, inwieweit der Ester-Rest vergrößert werden kann. Außerdem besteht laut Docking Optimierungspotential durch eine Konfigurationsänderung von *trans*- zu *cis*-konfigurierten 3-Benzyloxycarbonylaziridin-2-carbonsäure-Derivaten (Abb. 6.-7).

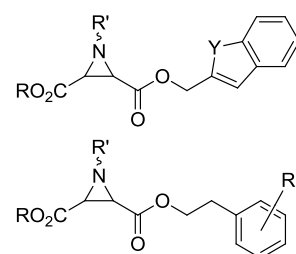


Abb. 6.-6: Mögliche erste Weiterentwicklungen der Diester-Leitstrukturen

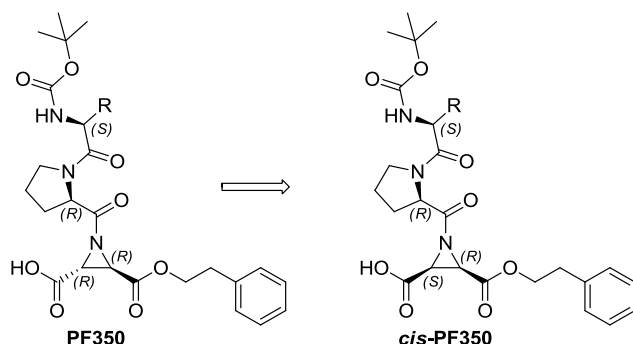


Abb. 6.-7: Anzustrebende Konfigurationsänderung der 3-Benzyloxycarbonylaziridin-2-carbonsäure-Derivate

Der Weg der Darstellung des *cis*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylats, welches als Baustein in der Synthese für **cis-PF350** benötigt wird, konnte dafür in der vorliegenden Arbeit bereits etabliert werden.

7. Summary

Motivation

Leishmaniasis as one of the „neglected tropical diseases“ is a chronic, debilitating and stigmatizing disease. It is caused by parasitic protozoa. Worldwide approximately 12 million people are infected, with about 70 thousand deaths every year. The current therapy is overshadowed by toxicity and teratogenicity caused by the available drugs, their low response in co-infections and emerging drug resistancies. An increased understanding of disease processes, as well as publications of parasitic protein crystal structures accelerate the research towards new drugs. Papain-like cysteine proteases have also been identified in various *Leishmania* species. It is known that cysteine proteases are important virulence factors for *Leishmania* that can manipulate the host immune system to the advantage of the parasite. Thus, inhibition of these peptidases already showed promising results *in vitro*, in tissue culture models, and *in vivo*. This makes them promising new potential therapeutic targets. However, the parasitic cysteine proteases are structurally very similar to the human ones because of their evolutionary relatedness. Therefore, the challenge in the development of anti-parasitic drugs based on the inhibition of these proteases is to develop highly selective inhibitors that do not, or only weakly inhibit host proteases.

Objectives

The aim of this work was the optimization of the aziridine-2,3-dicarboxylic acid-based cysteine protease inhibitors **RV122C** and **CS09** regarding their affinity and selectivity against the parasitic cathepsin L-like cysteine protease LmCPB2.8 by design, incl. molecular docking, synthesis and testing. According to the postulated binding mode of **RV122C** one benzyl ester and the Boc protecting group are not necessary for productive interactions with the enzyme. Consequently the benzyl esters should be exchanged to prepare new symmetrical aziridine-2,3-dicarboxylate-based inhibitors with different ester moieties. Additionally, the Boc protecting group should be exchanged or removed to release a free NH₂-function at the *N*-terminal amine. But the main focus should be placed on the introduction of a free carboxy function at the aziridine (Fig. 7.-1). By this an ionic interaction between the carboxylic acid function and the histidinium residue of the catalytic centre could be generated. This interaction has been shown to increase the inhibitory effect in other inhibitors, for example the structurally related epoxide-based inhibitors. All synthesized substances are designed as irreversible, covalent and competitive inhibitors. Their inhibitory activity should be determined using fluorimetric enzyme assays, and cell-based assays.

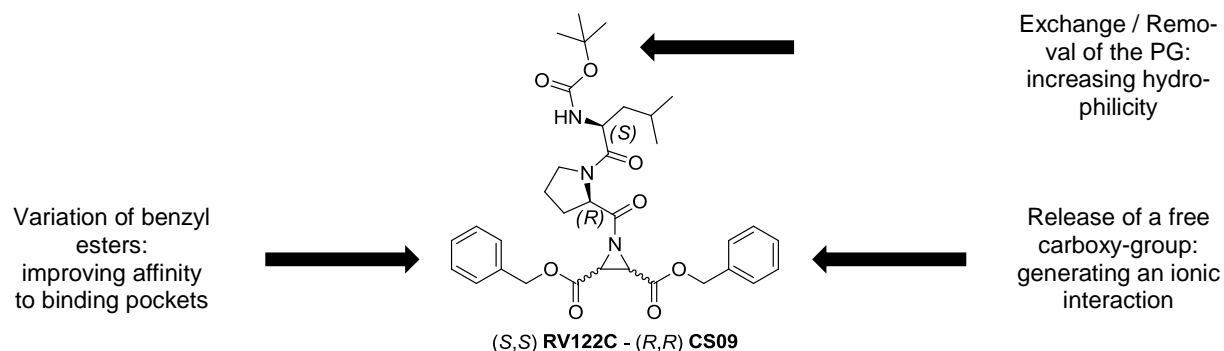


Fig. 7.-1: Structure of **RV122C** and **CS09** and planned modifications – PG = protecting group

Synthesis of the trans-configured aziridine-2,3-dicarboxylate-based inhibitors

The synthesis of the symmetrical derivatives with two identical esters at the racemic aziridine-2,3-dicarboxylate, was carried out by the known Michael addition of *S,S*-Diphenylsulfimine (DPSI) to symmetric fumarates. For asymmetric derivatives with two different esters a new synthesis had to be established. It has been shown that starting from (2*Z*)-maleate halfesters (*E*)-but-2-endoates with two different esters could be generated. Isomerization during esterification to either asymmetric (2*Z*)- or (2*E*)-configured but-2-endoates could be controlled by de- or increasing the equivalents of DMAP used, the reaction time and the temperature. The following ring closure was carried out by the Michael addition of DPSI to the double bond. The peptide building blocks were synthesized by standard peptide coupling reagents and the hydrophilic GlycAc protecting group (2-(2-methoxyethoxy)acetyl) was introduced. For the fragment coupling of the dipeptides and aziridines to tripeptides PPA was used as coupling reagent. Subsequently 3-carboxylaziridine-2-carboxylic acid-based inhibitors were obtained by hydrogenolysis of the benzyl esters. See Table 7.-2 for the overview of all inhibitors.

Tab. 7.-2: Overview of synthesised inhibitors including lab numbers (Lab. Nr.), protecting group (PG), amino acids AS₁ & AS₂, warhead (WH: Azi = diastereomerically pure *trans*-configured aziridine-2,3-dicarboxylate with absolute configuration at the aziridine ring carbons, or as a pair of *trans*-configured diastereomers: (±)), ester moieties in the usual abbreviation or as chain plus group (e.g. OMeCy = cyclohexylmethyl oder OMeNaph = naphthalen-2-ylmethyl or acid = OH) and *K_i*-values [in μM] against the *Leishmania* cysteine peptidase LmCPB2.8. Changes to each preceding compound are displayed in bold. – ni = no inhibition, *K_i* > 100 μM – general structure PG-(S)-Caa-(R)-Pro-WH(R₁)(R₂)

#	Lab. Nr.	PG	AS ₁	AS ₂	WH	R ₁	R ₂	LmCPB [μM]
1	RV122C	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(S,S)-Azi	OBn	OBn	1.7
2	CS09	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(R,R)-Azi	OBn	OBn	3.8
3	PF180	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	OBn	2.8 ^{theor.*}
4	PF128	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(S)-Asp	OBn	OBn	ni
5	PF381	GlycAc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	OBn	ni
6	PF326	GlycAc	(S)-Ile	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	OBn	ni
7	PF258	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OMeCy	OMeCy	0.77±0.05
8	PF284	Cbz	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OMeCy	OMeCy	2.3±0.2
9	PF257	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OEtPh	OEtPh	1.6±0.1
10	PF362	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OPrPh	OPrPh	0.9±0.1
11	PF270	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	OEt	ni
12	PF349	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OH	OEt	ni
13	PF289	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	OtBu	ni
14	PF382	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OH	OtBu	ni
15	PF253	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	OMeCy	1.8±0.4
16	PF345	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OH	OMeCy	nd
17	PF272	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	OEtPh	1.92±0.06
18	PF350	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OH	OEtPh	0.441±0.022
19	PF317	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	OPrPh	1.36±0.05
20	PF400	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OH	OPrPh	ni
21	PF294	Boc	(S)-Leu	(R)-Pro	(±)-Azi	OBn	OMeNaph	0.8±0.3

* The pair of diastereomers **PF180** was not tested. The shown *K_i*-value is the average of the determined *K_i*-values of the diastereomerically pure lead structures **RV122C** and **CS09** (details see Chap.4.1.5).

Experiments to release the *N*-terminal free amine failed. Even the choice of comparable mild reaction conditions (hydrogenolysis) in order to remove the Cbz protecting group resulted in the removal of the *N*-unsubstituted aziridine from the peptide. One possible explanation would be an intramolecular 6-exo-trig attack (Fig. 7.-3).

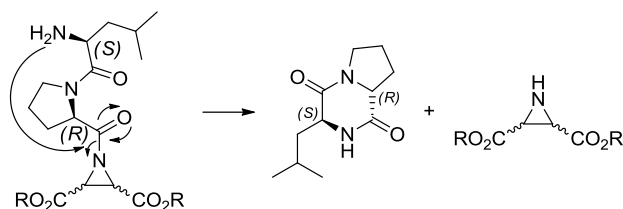


Fig. 7.-3: Possible intramolecular 6-exo-trig attack resulting in the removal of the *N*-unsubstituted aziridine from the peptide – R = Cyclohexylmethyl

Molecular docking of the **PF**- and **CS**-derivatives

First, the program AutoDock Vina was tested for the prediction of binding modes for the cysteine protease papain using published crystal structures. Then, docking calculations were performed with the **PF**-derivatives and the protease cruzain which served as a related model enzyme for LmCPB2.8. As a result the previously proposed two binding modes, an anti-substrate-like and a substrate-like could be confirmed (inverse or parallel orientation of the peptic or peptide-like structure of the inhibitor and the substrate binding cleft of the enzyme). Furthermore, it could be shown that for an anti-substrate-like binding mode the (*R,R*)- and for an substrate-like binding mode the (*S,S*)-configuration at the aziridine ring should be preferred. According to the docking results an anti-substrate-like binding mode reacts less sensitive to configuration changes at the aziridine ring than a substrate-like binding mode. These results match to the results found in earlier enzyme assays of this class of compounds. Furthermore, trend analyses were performed within the series of derivatives for comparison with the results of the enzyme assays. Additionally knockout candidates could be determined to distinguish between the two possible binding modes. The analysis of the already tested **CS**-derivatives (**CS30**, **CS31** and **CS32**) also confirmed an anti-substrate-like binding mode by addressing the S_2 -binding pocket. Further optimization possibilities which could be concluded: 1. exchange of the hydrophilic GlycAc- (2-(2-methoxyethoxy)acetyl) against e.g. the less hydrophilic PyAc-protecting group (2-(pyridine-4-yl)acetyl) and 2. changing the configuration from *trans*- to *cis*-configured aziridine-2,3-dicarboxylates.

Synthesis of a *cis*-configured aziridine-2,3-dicarboxylate as a consequence of the docking results

The synthesis of asymmetric, *N*-unsubstituted, *cis*-configured aziridine-2,3-dicarboxylates is not known from literature. However, the ring closure to the *cis*-aziridine-2,3-dicarboxylate is only possible using *syn*-azido alcohols which are obtained as intermediates within the synthesis of aziridine-2,3-dicarboxylates using the stereoselective synthesis route. However the introduction of two different esters on this synthetic route was not possible. Therefore the above described synthesis of but-2-endoates with two different esters had to be linked to the stereoselective synthesis route. It was shown that (*2Z*)-but-2-endoates can be used to synthesize *anti*-tartrates by a *cis*-vicinal dihydroxylation. These *anti*-tartrates then can be used for the preparation of *syn*-azido alcohols using the stereoselective synthesis route (Fig. 7.-4). The coupling of the newly prepared racemic *cis*-configured aziridine-2,3-dicarboxylate with two different esters in 2- and 3-position with the corresponding dipeptide, however could not be realized during this work.

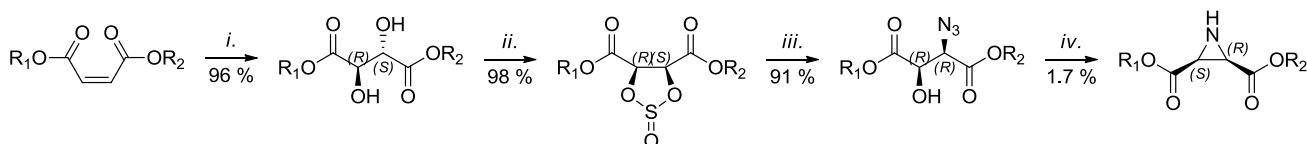


Fig. 7.-4: Preparation of racemic *cis*-configured *N*-unsubstituted aziridine-2,3-dicarboxylates from asymmetric (*2Z*)-But-2-endoates – Also formed isomers have been omitted for clarity – R₁ = Benzyl, R₂ = 2-Phenylethyl

i. 0.2 mol % K₂OsO₄·H₂O, 1.1 Eq. NMO, 0.75 Eq. citric acid, *t*BuOH:H₂O [1:1], 12 h RT; *ii.* 1.1 Eq. SOCl₂, DMF_{kat}, DCM, 1 h 0 °C, 2 h RT, 1 h reflux; *iii.* 2.0 Eq. NaN₃, DMF_{abs}, 72 h RT; *iv.* 2.0 Eq. NaN₃, DMF_{abs}, 72 h RT; *v.* 1.1 Eq. PPh₃, DMF, 4.5 h 83 °C

Results of enzyme assays and biological studies

All compounds have been tested in enzyme assays for their inhibitory activity against the cysteine proteases cathepsin-B, -L, cruzain, falcipain-2, LmCPB2.8 and rhodesain. It was found that derivatives with larger ester moieties both, symmetrical and asymmetrical showed increased activity with improved selectivity. That is especially the case for the diester derivatives **PF317**, **PF294** and **PF362**. They are selective against LmCPB2.8 with *K_i*-values in the low micromolar (*K_i* = **PF317** 1.36 ± 0.05 μM) or even nanomolar range (**PF294** *K_i* = 0.8±0.3 μM and **PF362** *K_i* = 0.9±0.1 μM). The monoesters also show an improved inhibitory activity with *K_i*-values in the nanomolar range, but, in contrast to the diester-derivatives, are no longer selective within the cathepsin-L-like cysteine proteases with the exception of **PF350** (*K_i* = 0.441 μM against LmCPB2.8). Furthermore the exchange of the protecting group (unexpectedly) as well as the substitution of the warhead (as expected) resulted in loss of inhibition.

The latter is consistent with the postulate that the aziridine-2,3-dicarboxylate is essential for an inhibitory effect. At the open-chain analogue **PF128** without warhead ((S)-Asp instead of (±)-Azi) obviously no nucleophilic attack of the Cys thiolate can take place at the 2- or 3-position.

Within the Collaborative Research Center 630 of the University of Würzburg the compounds were tested for their antiparasitic activity against *Leishmania* and trypanosomes and for cytotoxicity. Only derivatives with a short carbon chain show antileishmanial activity. Since these compounds are inactive against the enzyme, the antileishmanial activity seems to be due to their cytotoxicity. The derivatives with elongated carbon chain, which are active in the enzyme assays, however show no significant antileishmanial activity. In contrast, most compounds show antitrypanosomal activity, with **PF284** with an EC₅₀ of 1.73 μM (48 h) and 2.55 μM (72 h) as most active compound.

Comparison of the docking results with the results of the enzyme assays against cruzain

Comparing the results of the docking on cruzain with the results of the enzyme assays against cruzain, a pretty good match was found for an anti-substrate-like binding mode. Apparently, the (*R,R*)-configuration within the diastereomers is superior to the (*S,S*)-configuration in case of the enzyme inhibition and thus decisive for the resulting trends. In addition to that the knockout candidates **PF253**, **PF284** and **PF294** are not active against the enzyme which only fits the concept of an anti-substrate-like binding mode – for a substrate-like binding mode one would have expected significantly better activities compared to the lead structures – this binding mode is also able to explain the relative trends between the diester derivatives. Thus only diester derivatives with a short carbon chain linking an aromatic moiety show high activities in the enzyme assays against cruzain. Derivatives with an elongated carbon chain linking an aromatic moiety don't show activity in the enzyme assays against cruzain, which matches their docking results predicting low affinities.

The analysis of the results obtained with the monoesters, however, is more difficult. An ionic interaction, between the free carboxy function and the imidazole of the histidine residue, is prevented by the remaining ester moiety addressing the S₁-binding pocket, and thus not considered by the docking algorithm. AutoDock Vina either weights the strong ionic interaction as too small, or an adaptation of the structures into the active site cleft is much more difficult for binding poses with ionic interaction resulting in significantly lower calculated affinities. However, experimentally an ionic interaction was confirmed. A possible binding pose was only found for the structure of **trans-Bn-H-(*R,R*)** (Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*R,R*)-Azi(OH)(OBn), see Chap. 3.2.1.3.3). From this result it can be concluded that the monoesters should show a slightly shifted binding mode compared to the diesters due to their new

ionic interaction. Obviously, then only the cyclohexylmethyl moiety of **PF345** fits completely into the S_1 -binding pocket. A possible optimization arising from these findings would be the change of the aziridine ring from *trans* to *cis* which should accelerate the irreversible reaction inactivating the enzyme characterized by k_i for monoesters.

Results of the comparison of the enzyme assays against Cruzain and LmCPB2.8

In contrast to the results with cruzain sterically very large ester groups (**PF294** and **PF362**) exhibit very low K_i -values at LmCPB2.8. Regarding the unknown 3D structure of LmCPB2.8 this should mean that – in case of an anti-substrate-like binding mode – this enzyme has a deeper S_1 -binding pocket compared to cruzain. The sterically very demanding 3-phenylpropyl or naphthalene-2-ylmethyl moieties lead to a better inhibition of LmCPB2.8. Additionally, these derivatives are selective within the cathepsin L-like cysteine proteases for LmCPB2.8. With this structural information, the future development of inhibitors of this class as selective antileishmanial agents should be facilitated. Due to the deeper S_1 -binding pocket **PF350** bearing a 2-phenylethyl moiety shows very good inhibition of the *Leishmania* protease LmCPB2.8 ($K_i = 0.441 \mu\text{M}$).

Results of the comparison of the structures of cruzain and the LmCPB2.8 homology model

The comparison of the structures of cruzain and the LmCPB2.8 homology model shows that in LmCPB2.8 with Phe-270 a sterically less demanding amino acid can be found below the S_1 -binding pocket compared to Trp-139 in cruzain. Thereby Trp-310 of the *Leishmania*-protease is located 0.5 \AA deeper in the S_1 -binding pocket which creates more space for larger residues in LmCPB2.8. This is consistent with the results of the enzyme assays against cruzain and LmCPB2.8 and the results of the docking for an anti-substrate-like binding mode, in which the ester groups are directed into the S_1 -binding pocket. Thus, **PF**-derivatives with large ester moieties are selective for LmCPB2.8 and show no activity against cruzain. For the S_2 -binding pocket differences are already known from the sequence. According to the crystal structure two water molecules are stabilized in the S_2 -binding pocket of cruzain by Glu-208, Ser-210 and Asp-69. In contrast lipophilic and aromatic amino acids (leucine, tyrosine and valine) are found in the S_2 -binding pocket of LmCPB2.8. Consequently water molecules should be displaced easier in LmCPB2.8 leaving a S_2 -binding pocket which is not necessarily deeper but able to take up bulky and lipophilic moieties more easily compared to cruzain. First docking experiments of a **CS**-derivative and the homology model of LmCPB2.8 reveal a possible energetically favorable edge-to-face π - π -stacking of the aromatic residue of the dipeptide with Tyr-209. Thus, the experimentally found selectivity of the **CS**-derivatives with

large amino acids such as Phe, hPhe or Trp within the cathepsin L-like proteases of the papain family for LmCPB2.8 can be explained by the docking computations.

Efficiency analysis of compounds with antileishmanial activity

In medicinal chemistry, the calculation of ligand efficiency (LE) and lipophilic ligand efficiency (LLE) has been established in assessing the efficiency of active ingredients. These efficiency value considerations, based on the number of non-hydrogen atoms (heavy atom count) for LE and on the clogP value (calculated logP) for LLE, are linked to information about selectivity, cytotoxicity and structure/symmetry (Fig. 7.-5). Recommended reference values are LE-value > 0.3 and LLE-value > 5. Compounds with higher efficiencies therefore are found in the upper right quadrant.

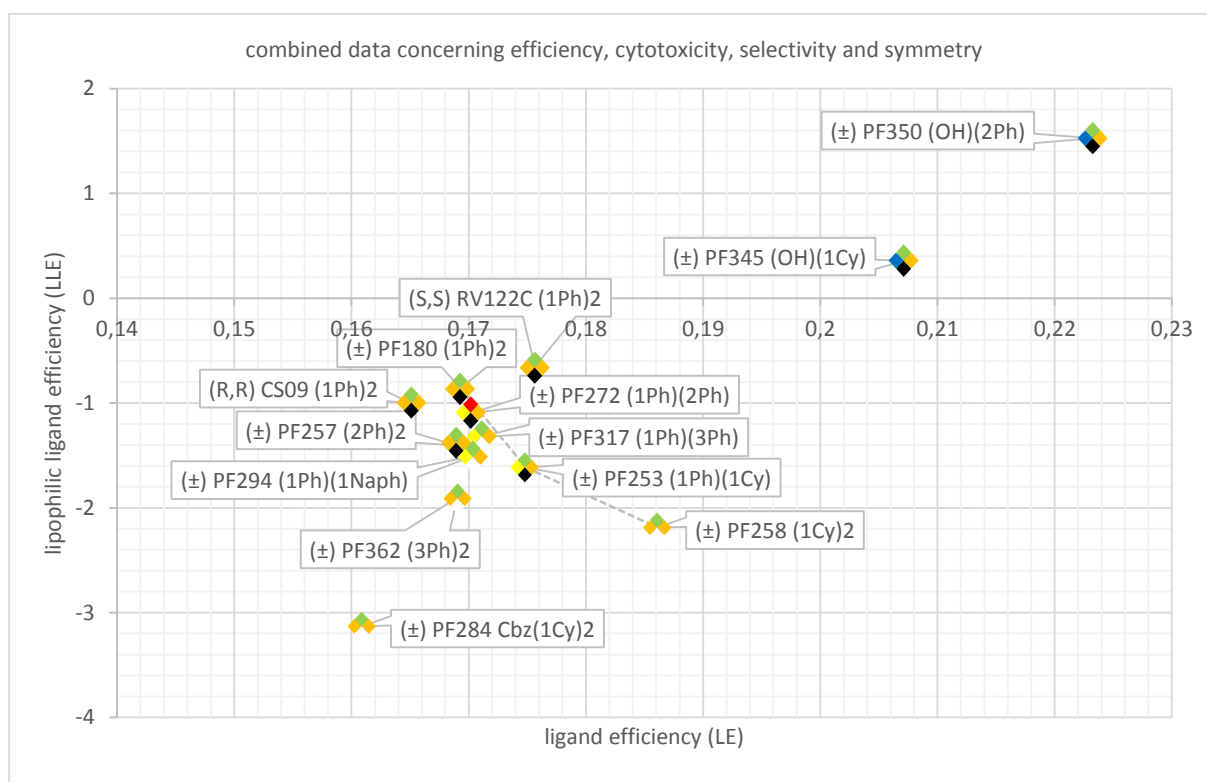


Fig. 7.-5: Combined data concerning efficiency, cytotoxicity, selectivity and symmetry of all derivatives with anti-leishmanial activity – colour code of the rhombus: top, cytotoxicity: green = no cytotoxicity, red = cytotoxic, bottom, selectivity: white = selective against LmCPB2.8, black = inhibits additional enzymes, left and right, moiety at the aziridine: orange/orange = symmetric, two ester, yellow/orange = asymmetric, two esters, blue/orange = one free carboxy-function, one ester – Compounds are stated with stereo information (e.g. *(R,R)* stands for *(2R,3R)*-aziridine-2,3-dicarboxylate or (\pm) stands for a pair of *trans*-configured diastereomers) about as lab number with protecting group (Cbz/without = Boc) and moieties (as number $n = (\text{CH}_2)_n$ and/or group OH/Cy/Ph/Naph = acid/cyclohexyl/phenyl/naphthalen-2-yl) (e.g. *(R,R)* **CS09** (1Ph)₂ stands for Boc-*(S)*-Leu-*(R)*-Pro-*(R,R)*-Azi(OBn)₂)

For the selection of future lead compounds it can be summarized that:

- extended/larger aromatic moieties improve activity and selectivity towards LmCPB2.8
- at similar molecular weights symmetrical diesters show lower K_i -values at LmCPB2.8 than symmetrical ones, but
- asymmetrical diester show better ligand efficiencies compared to symmetrical diesters
- in contrast to monoesters, asymmetrical diesters with short carbon chain partially show cytotoxicity against macrophages
- asymmetrical diesters with a benzyl ester can be converted to monoester derivatives, which show significantly improved activity i.a. against LmCPB2.8
- monoester derivatives show improved K_i -values in the nanomolar range compared to their lead structures with two ester groups
- shorter/smaller cyclic moieties at the monoesters are not selective in contrast to their diesters
- increasing the steric demand of the remaining ester moiety in the monoesters increases the selectivity towards LmCPB2.8, but
- increase of that ester moiety to the 3-phenylpropyl group as largest ester moiety used in the present studies leads to an almost complete loss of any activity against cathepsin L-like cysteine proteases.

Consequently the following three compounds should be considered as new lead structures: **PF362**, **PF294** and **PF350**. As diester, the compounds shown in Fig. 7.-6 should be the first candidates. With these candidates it can be determined to what extent the ester moiety can be increased. Additionally, according to the docking results the configuration should be changed from *trans*- to

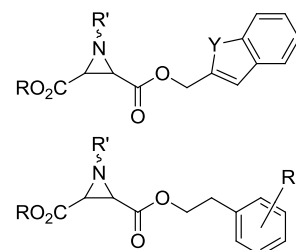


Fig. 7.-6: Possible first further developments of diester lead structures

cis-3-carboxylaziridine-2-carboxylic acid derivatives (Fig. 7.-7).

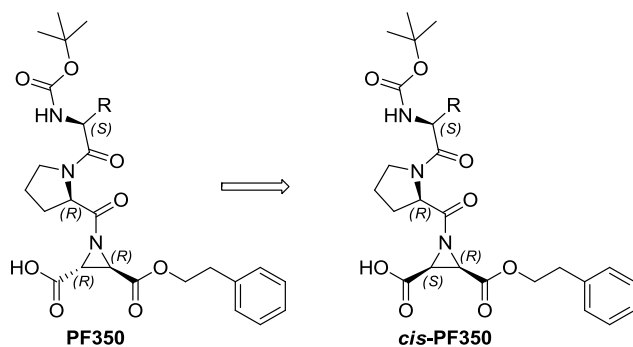


Fig. 7.-7: A change of the configuration of 3-benzyloxycarbonylaziridine-2-carboxylic acid derivatives should be aimed at

The synthesis of a *cis*-configured aziridine-2,3-dicarboxylate needed as building block for the synthesis of ***cis*-PF350** has already been established in this work.

EXPERIMENTALTEIL

8. Allgemeine Vorbemerkungen

8.1 Verwendete Messgeräte

Schmelzpunktmessungen (Smp.)

Die Schmelzpunkte wurden in offener Kapillare an folgenden Schmelzpunktgeräten gemessen:

- Melting Point SMP 10 der Firma *BIBBY SCIENTIFIC LIMITED STONE*
- FP5 der Firma *Mettler*
- SMP3 der Firma *Stuart*

Die so bestimmten Werte sind unkorrigiert.

Infrarotspektroskopie (IR)

Die Infrarotspektren wurden unverdünnt an einem Nicolet Avatar 330 Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer der Firma *Thermo electron corporation* aufgenommen. Die Messung erfolgte mittels ATR-Technik (*attenuated total reflection*) an einem Diamantkristall. Die Angabe der Werte erfolgt in Wellenzahlen $\tilde{\nu}[\text{cm}^{-1}]$. Die Kennzeichnung der Intensitäten erfolgt mit den Abkürzungen w (*weak*), m (*middle*) und s (*strong*).

Polarimetrie ($[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}}$)

Spezifische Drehwerte $[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}}$ wurden an dem Polarimeter des Typs P3000 der Firma *A. Krüss Optronic* bestimmt (Natrium-D-Linie: $\lambda = 589 \text{ nm}$). Die Konzentration wird in g/100 mL Lösemittel angegeben. Die jeweilige Messtemperatur wird mit angegeben.

Magnetische Kernresonanzspektroskopie ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$)

Die NMR-Spektren wurden an folgenden Magnetresonanzspektrometern gemessen:

- Avance III 400-Magnetresonanzspektrometer der Firma *Bruker Biospin GmbH*, bei einer Frequenz von 400 MHz und einer Magnetfeldstärke von 9.4 Tesla
- Avance III HD 300-Magnetresonanzspektrometer der Firma *Bruker Biospin GmbH*, bei einer Frequenz von 300 MHz und einer Magnetfeldstärke von 7.05 Tesla
- Fourier 300-Magnetresonanzspektrometer der Firma *Bruker Biospin GmbH*, bei einer Frequenz von 300 MHz und einer Magnetfeldstärke von 7.05 Tesla

Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben, die Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz). Als interner Standard dienten bei allen NMR-Spektren die Restprotonensignale der eingesetzten deuterierten Lösungsmittel.

- CDCl_3 ($^1\text{H-NMR}$: $\delta = 7.26$ ppm, $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 77.16$ ppm)
- MeOD ($^1\text{H-NMR}$: $\delta = 4.87$ ppm, $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 49.00$ ppm)

Die Multiplizitäten der Signale werden in folgenden Abkürzungen wiedergegeben: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dublett, ddd = Dublett von Dublett von Dublett, t = Triplett, dt = Dublett von Triplett, td = Triplett von Dublett, q = Quartett, m = Multipllett, b = breit, „dd“ = pseudo-Dublett von Dublett, „t“ = pseudo-Triplett.

Die Zuordnung der NMR-Signale erfolgte über DEPT45-, DEPT90-, DEPT135-Spektren und 2D-Korrelationsspektren (COSY-, HMQC- und HMBC-Spektren). Die Reinheit der Endprodukte wurde, falls nicht anders erwähnt, mittels $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt.

Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die ESI-MS-Spektren wurden an einem Ultima 3 Micromass Flash Waters-Spektrometer der Firma *QTOF* aufgenommen.

8.2 Analytische und chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden DC-Fertigfolien aus

- Aluminium, beschichtet mit 0.20 mm Kieselgel 60 F254 bzw. Kieselgel RP C18 der Firma *Merck*
- ALUGRAM Xtra SIL G/UV254, beschichtet mit 0.20 mm Kieselgel 60 mit Fluoreszenz-Indikator UV254 der Firma *Merck*

verwendet. Zur Detektion der Substanzen diente die Fluoreszenzlösung bei 254 nm, die Eigenfluoreszenz bei 366 nm und das Anfärbeverhalten der Substanzen gegenüber Iod-dampf, gesättigter wässriger Kaliumpermanganat-Lösung, Dragendorff-Reagenz (Amine), Ehrlichs Reagenz (Amine, Aziridine), Ninhydrin-Lösung (Aminosäuren, Peptide) und Seebach-Reagenz (Alkohole).

Säulenchromatographie (SC)

Als Säulenfüllmaterial wurde

- Kieselgel 60 (0.063-0.2 mm) der Firma *Merck*
- MN Kieselgel 60 M, Korngröße 0.040-0.063 mm oder 0.063-0.2 mm der Firma *Macherey-Nagel*

verwendet. Die Säulen wurden nass befüllt. Die Laufmittelzusammensetzung für DC und SC sind in Volumenprozent angegeben. Je nach Trennproblem wurden Säulen verschiedener Durchmesser und Länge verwendet.

Analytische bzw. semipräparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Verwendet wurde eine HPLC-Anlage der Firma *Varian* des Typs ProStar, bestehend aus einem analytischen/präparativen Linear Upsacle HPLC-System (0.05-50 ml/min bei maximalen 275 bar Gegendruck mit ScaleUp-Mast), einem 2-Kanal UV-Detektor und einem präparativen Autosampler. Die Substanzdetektion erfolgte bei 220 nm und bei 254 nm.

Für die analytischen Trennprobleme wurde eine Säule des Typs

- *Phenomenex Hyperclone 5u ODS (C18) 120A (250mm x 4.6mm) 5 Micron*

und für die semipräparativen Trennprobleme wurde eine Säule des Typs

- *VARIAN DYNAMAX 250x21.4 MM (LxID) Microsorb 60-8 C18*

verwendet.

Die Methoden der analytischen wie präparativen Analysen sind in Tabellen 8.2-1 bzw 8.2-2 angegeben.

Es wurden die folgenden Fließmittel

- A = Millipore V3 Wasser
- B = Acetonitril HPLC gradient grade + 0.1 % Ameisensäure

verwendet.

Tab. 8.2-1: Verwendete Methode für die analytische HPLC

<i>Methode</i>	<i>T [min]</i>	<i>A [%]</i>	<i>B [%]</i>	<i>Flow [ml/min]</i>
A	0	70	30	1
	25	5	95	1
	30	5	95	1
	35	70	30	1

Tab. 8.2-2: Verwendete Methoden für die semipräparative HPLC

Methode	T [min]	A [%]	B [%]	Flow [ml/min]
P-I	0	70	30	10
	25	5	95	10
	38	5	95	10
P-IIa	0	50	50	5
	35	5	95	5
	45	5	95	5
	50	50	50	5
P-IIb	0	50	50	5
	30	30	70	5
	40	5	95	5
	47	5	95	5
P-IIIa	0	40	60	7
	20	5	95	7
	30	5	95	7
P-IIIb	0	40	60	7
	20	40	60	7
	25	5	95	7
	42	5	95	7
P-IV	0	30	70	7
	16	5	95	7
	35	5	95	7
	40	30	70	7
	46	30	70	7
P-V	0	25	75	7
	13	5	95	7
	36	5	95	7

8.3 Verwendete Chemikalien und Sprühreagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von *Acros Organics*, *Alfa Aesar*, *AllessaChemie*, *Ba-chem*, *Fluka*, *Iris Biotech*, *Merck*, *Roth* oder *Sigma-Aldrich* bezogen.

Dragendorff-Reagenz: Sprühreagenz zum Anfärben von tertiären Aminen.

Zusammensetzung: 0.85 g basisches Bismutnitrat, 10 ml Eisessig in 40 ml Wasser. Anschließend besprühen mit 40%iger Kaliumiodid-Lösung in Ethanol.

Ehrlich-Reagenz: Hellgelbes Sprühreagenz zum Anfärben von Aminen, Aziridinen.

Zusammensetzung: 1 g 4-(*N,N*-Dimethylamino)benzaldehyd in 100 ml konz. Salzsäure/Methanol (3:1). Detektion durch Erhitzen auf ca. 130 °C.

Ninhydrin-Lösung: Hellgelbes Sprühreagenz zum Anfärben von Aminosäuren, Peptiden.

Zusammensetzung: 0.3 g Ninhydrin, 3 ml Eisessig in 100 ml iso-Propanol. Detektion durch Erhitzen auf ca. 130 °C.

Seebach-Reagenz: Gelbes Tauchreagenz zum Anfärben der Epoxide.

Zusammensetzung: 0.83 g Cer(IV)-sulfat-Tetrahydrat, 2.08 g Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat, 8.3 ml konz. Schwefelsäure in 75 ml Wasser. Detektion durch Erhitzen auf ca. 130 °C.

8.4 Arbeitsmethoden

Wenn nicht anders beschrieben wurden durch Destillation gereinigte Lösungsmittel verwendet. Andernfalls kamen destillativ gereinigte und getrocknete (Kaliumhydroxid, Molekularsieb 4 Å, Calciumchlorid, Natriumsulfat, Kaliumcarbonat) Lösungsmittel zum Einsatz. Absolute Lösungsmittel wurden durch mehrstündiges Refluxieren über gängigen Trockenmitteln (Natrium, Phosphorpentoxid, Kaliumcarbonat, Kaliumhydroxid, Molekularsieb 4 Å) nach Literaturangaben hergestellt und anschließend über Molekularsieb 4 Å, Kaliumhydroxid oder Natrium aufbewahrt oder alternativ kommerziell erworben. Als Schutzgase wurden Stickstoff sowie Argon verwendet.

8.5 Fluorimetrische Enzymassays

Die fluorimetrischen Enzymassays wurden entweder an einem

- Cary Eclipse Fluorimeter der Firma *Varian* bei 25 °C

oder an einem

- Infinite F200 Pro Fluorimeter der Firma *Tecan* bei 20 °C

gemessen. Beide Fluorimeter verfügen über Mikrotiterplatten-Leseeinheiten und Heizelemente und es wurden weiße 96-Well-Mikrotiterplatten verwendet. Die Anregungswellenlänge lag bei 380 nm und die Detektionswellenlänge bei 480 nm.

Das Screening an den Enzymen erfolgte bei einer Inhibitorkonzentration von jeweils 20 µM bei einer Messzeit von 5 min. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus unabhängigen Doppelbestimmungen. Die jeweils auch doppelt vermessene Negativkontrolle erfolgte ohne Zugabe von Inhibitor, und die Steigungen des linearen Teils der Umsatz-Zeit-Kurven (Fluoreszenzzunahme pro Zeit) entsprechen 100 % Enzymaktivität. Die Messungen mit Inhibitoren entsprechen den Restenzymaktivitäten, ebenfalls jeweils doppelt bestimmt.

Für Inhibitoren, die eine Hemmung > 50 % im Screening zeigten, wurden Verdünnungsreihen gemessen. Für die Verdünnungsreihen wurden je sieben Endkonzentrationen zwischen 0 und 20 µM gewählt, womit, mit der Negativkontrolle (ohne Zugabe von Inhibitor), acht Inhibitorkonzentrationen je doppelt vermessen wurden.

Die folgende Tabelle 8.5-1 zeigt die allg. Assayzusammensetzungen der Screenings und Verdünnungsreihen: Volumina der jeweils verwendeten Puffer, Enzyme (gelöst in Enzympuffer), Substrate (gelöst in DMSO), Inhibitoren (gelöst in DMSO) für ein Gesamtvolumen von 200 µl.

Tab. 8.5-1: Assayzusammensetzungen der Screenings und Verdünnungsreihen

Screening	180 µl Puffer, 5 µl Enzym, 5 µl Substrat, 10 µl DMSO bzw. 2 mM Inhibitor
Verdünnungsreihe	185 µl Puffer, 5 µl Enzym, 5 µl Substrat, 5 µl DMSO aus 0-2 mM Inhibitor

Die folgende Tabelle 8.5-2 zeigt die verwendeten Enzyme, Substrate und verwendeten Puffer (und Zusammensetzungen).

Tab. 8.5-2: Verwendete Enzyme, Substrate und Puffer

Cathepsin L	
Substrat	Z-Phe-Arg-AMC * HCl (6.25 μ M), $K_m = 6.5 \mu$ M
Enzypuffer	Tris-Puffer (pH 6.5): 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2mM DTT
Assaypuffer	Tris-Puffer (pH 6.5): 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
Cathepsin B	
Substrat	Z-Phe-Arg-AMC * HCl (100 μ M), $K_m = 150 \mu$ M
Enzypuffer	Tris-Puffer (pH 6.5): 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2mM DTT
Assaypuffer	Tris-Puffer (pH 6.5): 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
Falcipain-2	
Substrat	Z-Phe-Arg-AMC * HCl (25 μ M), $K_m = 21.5 \mu$ M
Enzypuffer	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5 mM DDT
Assaypuffer	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
Rhodesain	
Substrat	Z-Phe-Arg-AMC * HCl (10 μ M), $K_m = 826.5 \mu$ M
Enzypuffer	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5 mM DDT
Assaypuffer	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
Cruzain	
Substrat	Z-Phe-Arg-AMC * HCl (5 μ M), $K_m = 1.5 \mu$ M
Enzypuffer	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5 mM DDT
Assaypuffer	Acetat-Puffer (pH 5.5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
LmCPB2.8	
Substrat	Z-Phe-Arg-AMC * HCl (10 μ M), $K_m = 5.0 \mu$ M
Enzypuffer	Phosphat-Puffer (pH 6.5): Lösung 1: 50 mM KH_2PO_4 wfr., 5 mM DTT; Lösung 2: 50 mM Na_2HPO_4 wfr., 5 mM EDTA
Assaypuffer	Phosphat-Puffer (pH 6.5): Lösung 1: 50 mM KH_2PO_4 wfr.; Lösung 2: 50 mM Na_2HPO_4 wfr., 5 mM EDTA

Produzenten der in Enzymassays verwendete Enzyme und Substrate sind in Tabelle 8.5-3 aufgelistet.

Tab. 8.5-3: Enzyme und Substrate

Cathepsin L (human)	Calbiochem
Cathepsin B (human)	Calbiochem
Cathepsin S (human)	Enzo Life Sciences
Falcipain-2 (<i>Plasmodium falciparum</i>)	M. Stempka, AK Schirmeister, Universität Würzburg
Rhodesain (<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>)	U. Dietzel, AK Kisker, Universität Würzburg
Cruzain (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	Dr. P. Selzer, Universität Tübingen
LmCPB2.8 (<i>Leishmania mexicana</i>)	Prof. Dr. J. Mottram, University of Glasgow, UK
Z-Phe-Arg-AMC	Bachem

9. Allgemeine synthetische Methoden

9.1 Darstellung und Funktionalisierung der But-2-endoate: Methoden 1-3

Methode 1a

Darstellung von 4-Benzoyloxy-4-oxo-(2Z)-but-2-ensäure

Zu einer Suspension von 1.0 Äq. Maleinsäureanhydrid und 1.0 Äq. Benzylalkohol werden bei 0 °C schrittweise 1.1 Äq. Triethylamin zugetropft. Nach 1 h Rühren bei RT wird das Reaktionsgemisch mit Wasser verdünnt und 3 x mit DCM gewaschen. Die wässrige Phase wird anschließend mit verd. HCl auf pH = 1 angesäuert und 3 x mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden 2 x mit verd. HCl gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Das Produkt kann ohne weitere Aufreinigung umgesetzt werden.

Methode 1b

Darstellung von 4-Benzylamino-4-oxo-(2Z)-but-2-ensäure

Zu einer Lösung von 1.0 Äq. Maleinsäureanhydrid und 1.0 Äq. Benzylamin in THF werden bei 0 °C schrittweise 1 mol-% Triethylamin zugetropft. Nach 1 h Rühren bei RT wird das Solvens i. Vak. entfernt, das Reaktionsgemisch in DCM gelöst und 3 x mit 10%iger Zitronensäure und 1 x mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird mit Na₂SO₄ getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Das Produkt kann ohne weitere Aufreinigung umgesetzt werden.

Methode 1c

Darstellung von 4-Benzoyloxy-4-oxo-(2E)-but-2-ensäure

Zu einer Lösung von 1.0 Äq. (2E)-dibenzyl-but-2-endionat in THF werden bei 0 °C 1.0 Äq. in Form einer 0.5 M Lithiumhydroxid-Lsg. zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0 °C, 5 d bei RT gerührt. Die wässrige Phase wird anschließend mit verd. HCl auf pH = 1 angesäuert und 3 x mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden 5 x mit 10%iger HCl gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase mit Na₂SO₄ wird das Solvens i. Vak. entfernt. Das Produkt kann ohne weitere Aufreinigung umgesetzt werden.

Methode 2**Säurekatalysierte Darstellung symmetrischer (2E)-but-2-endioate**

Zu einer Lösung von 1.0 Äq. Fumarsäure und 2.5 Äq. Alkohol in Toluol werden 0.1 Äq. *para*-Toluolsulfonsäure Monohydrat zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 18 h am Wasserabscheider unter Rückfluss erhitzt, bis kein Wasser mehr entsteht. Der Rückstand wird in EA aufgenommen und 3 x mit ges. NaHCO₃-Lsg. und 2 x mit Wasser gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Das so erhaltene Produkt wird säulenchromatographisch gereinigt.

Methode 3a**Darstellung von N,N-Dibenzyl-(2E)-but-2-endiamid mittels DCC/DMAP**

Zu einer Lösung von 1.0 Äq. Disäure, 2.5 Äq. Amin und 0.4 Äq. DMAP in DCM werden bei 0 °C schrittweise 2.0 Äq. DCC zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0 °C, mind. 72 h bei RT gerührt und der Niederschlag anschließend abfiltriert. Die Lösung wird 1 x mit 10%iger HCl, 2 x mit ges. NaHCO₃-Lsg. und 1 x mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung mit Na₂SO₄ wird das Solvens i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt.

Methode 3b**Darstellung unsymmetrischer (2E)-But-2-endioate aus 4-Benzyloxy-4-oxo-(2Z)-but-2-ensäure**

Analog Methode 3a mit 1.0 Äq. Halbester, 1.0 Äq. Alkohol, 0.8 Äq. DMAP und 1.1 Äq. DCC.

Methode 3c**Darstellung von (2Z)-But-2-endioaten aus 4-Benzyloxy-4-oxo-(2Z)-but-2-ensäure**

Analog Methode 3a mit 1.0 Äq. Säure, 0.95 Äq. Alkohol, 0.1 Äq. DMAP und 1.1 Äq. DCC. Max. 18 h bei 0 °C rühren.

9.2 Peptidkupplungen: Methoden 4-5

Methode 4a

DCC/HOBt vermittelte Peptidkupplung

Zu einer Lösung von 1.0 Äq. *N*-geschützter AS, 1.0 Äq. *C*-geschützter AS, 2.0 Äq. NMM und 1.0 Äq. HOBt in THF werden bei 0 °C schrittweise 1.05 Äq. DCC zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0 °C, 24 h bei RT gerührt und der Niederschlag anschließend abfiltriert. Die Lösung wird in EA aufgenommen und 1 x mit ges. NaHCO₃-Lsg., 1 x mit 10%iger Zitronensäure und erneut 1 x mit ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase mit Na₂SO₄ wird das Solvens i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt.

Methode 4b

DCC/HOBt vermittelte Peptidkupplung

Analog Methode 4a mit Aufnahme des Niederschlags in DCM und Waschen mit 3 x ges. NaHCO₃-Lsg.

Methode 5

PPA vermittelte *N*-Acylierung der Aziridin-2,3-dicarboxylate

Zu einer Lösung von 1.0 Äq. *N*-geschütztem Dipeptid und 1.0 Äq. Aziridin-2,3-dicarboxylat werden bei 0 °C schrittweise 3.0 Äq. PPA zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0 °C, 24-72 h bei RT gerührt. Die Lösung wird in EA aufgenommen und 2 x mit halbges. NaHCO₃-Lsg. und 1 x mit Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden 2 x mit EA extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen daraufhin noch 1 x mit halbges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase mit Na₂SO₄ wird das Solvens i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie und anschließender semipräparativer HPLC gereinigt.

9.3 AS-Schutzgruppenchemie: Methoden 6-11

Methode 6

Einführung der Benzylesterschutzgruppe

Analog Methode 2 mit 1.0 Äq. Säure und 3.9 Äq. Benzylalkohol.

Methode 7

Entfernung der Benzylesterschutzgruppe mittels Hydrogenolyse

Eine Lösung des Benzylesters in Methanol (100 mg/ml) wird mit 103 mg/mmol Pd/C (10 %) versetzt. Das Gemisch wird unter kräftigem Rühren 5-30 min bei 5 bar H₂ im Autoklaven hydrogenolysiert. Nach Abfiltrieren des Katalysators über Celite® wird das Solvens i. Vak. entfernt. Das Produkt kann ohne weitere Aufreinigung umgesetzt werden.

Methode 8

Einführung der Methylesterschutzgruppe

Zu einer Lösung von 1.0 Äq. AS in Methanol werden bei 0 °C langsam 1.3 Äq. Thionylchlorid zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 18 h bei RT gerührt und anschließend das Solvens i. Vak. entfernt. Das Produkt kann ohne weitere Aufreinigung umgesetzt werden.

Methode 9

Entfernung der Methylesterschutzgruppe mittels Verseifung

Zu einer Lösung von 1.0 Äq. Ester in Wasser/Methanol [1:1] werden bei 0 °C 1.1 Äq. 1 M Lithiumhydroxid-Lsg. zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 1 h bei 0 °C, 18 h bei RT gerührt. Die wässrige Phase wird anschließend mit verd. HCl auf pH = 1 angesäuert und 3 x mit DCM extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase mit Na₂SO₄ wird das Solvens i. Vak. entfernt. Das Produkt kann ohne weitere Aufreinigung umgesetzt werden.

Methode 10

Einführung der Cbz-Schutzgruppe

Zu einer Lösung von 1.0 Äq. AS in THF werden bei 0 °C 3.0 Äq. 1.5 N Na₂CO₃-Lsg. gegeben. Anschließend werden 1.1 Äq. Benzylchloroformiat in THF zugetropft, und das Reaktionsgemisch 2 h bei 0 °C, 18 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Wasser wird die wässrige Phase anschließend mit verd. HCl-Lsg. auf pH = 1 angesäuert und 3 x mit EA extrahiert. Die

vereinigten organischen Phasen werden 2 x mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Das Produkt kann ohne weitere Aufreinigung umgesetzt werden.

Methode 11a

Einführung der GlycAc-Schutzgruppe

Analog Methode 4a mit 1.0 Äq. C-geschützter AS und 1.0 Äq. 2-(2-Methoxyethoxy)essigsäure sowie 2.1 Äq. NMM unter Verzicht auf HOBT.

Methode 11b

Einführung der PyAc-Schutzgruppe

Analog Methode 4a mit 1.0 Äq. C-geschützter AS, 1.0 Äq. 4-Pyridinessigsäure * Hydrochlorid und 3 Äq. NMM.

9.4 Darstellung von Aziridin-2,3-dicarboxylaten: Methoden 12-13

Methode 12

Aziridin-Synthese aus But-2-endioaten mittels DPSI

1.0 Äq. But-2-endioat und 1.2 Äq. DPSI werden bei 83 °C 24 h in Toluol (25 ml/g DPSI) gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. wird das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt.

Methode 13a

Dihydroxylierung von But-2-endioaten zu Tartraten

Zu einer Lösung aus 1.0 Äq. Maleinat und 0.75 Äq. Zitronensäure gelöst in Wasser/*tert*-Butanol [1:1] werden 0.2 mol% Kaliumosmat(VI)dihydrat und direkt danach 1.1 Äq. NMO (50% in Wasser) zugegeben. Das Reaktionsgemisch färbt sich leicht grün und wird bis zur vollständigen Entfärbung 12 h bei RT gerührt. Das Solvens wird i. Vak. entfernt, die wässrige Phase mit verd. HCl auf pH = 1 angesäuert und 3 x mit EA extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Das Produkt kann ohne weitere Aufreinigung umgesetzt werden.

Methode 13b**Darstellung der Dioxathiolane aus Tartraten**

1.0 Äq. Tartrat wird in DCM gelöst, im Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit 0.26 mol% DMF versetzt. Unter Rühren werden 1.1 Äq. Thionylchlorid langsam zugetropft. Durch die Reaktionsmischung wird zur Entfernung der entstehenden Salzsäure Stickstoff geleitet. Nach 1 h wird das Eisbad entfernt und die Lösung wird 2 h bei RT und anschließend 1 h bei 50 °C gerührt. Das überschüssige Thionylchlorid und das Lösungsmittel werden i. Vak. entfernt. Das Produkt kann ohne weitere Aufreinigung umgesetzt werden.

Methode 13c**Darstellung der Azidoalkohole aus Dioxathiolanen**

Es werden 1.0 Äq. des Dioxathiolans und 2.0 Äq. Natriumazid in DMF suspendiert, wobei eine Rotfärbung zu beobachten ist. Das Reaktionsgemisch wird 20 h bei RT gerührt, dann EA und Wasser im Verhältnis 2:1 zugegeben. Anschließend wird 60 h bei RT gerührt und daraufhin die wässrige Phase 3 x mit EA und die vereinigten organischen Phasen 3 x mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wird mit Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Das Produkt kann ohne weitere Aufreinigung umgesetzt werden.

Methode 13d**Staudinger-Reaktion: Vom Azidoalkohol zum Aziridin**

1.0 Äq. des Azidoalkohols wird in DMF abs. gelöst, auf 0 °C abgekühlt und in kleinen Portionen mit insgesamt 1.1 Äq. Triphenylphosphan versetzt. Die Reaktionsmischung wird anschließend 4.5 h bei 83 °C gerührt. Nach Erreichen des Reaktionsendes wird EA zugegeben und mit halbges. NaCl-Lsg. extrahiert. Die wässrige Phase wird 2 x mit EA und die organische Phase 2 x mit halbges. NaCl-Lsg. gewaschen. Anschließend wird die wässrige Phase erneut 4 x mit Ethylacetat und die vereinigten organischen Phasen werden zuletzt mit halbges. NaCl-Lsg. extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Solvens i. Vak. entfernt. Das dunkelbraune, zähflüssige Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt.

9.5 Diverse Synthesen: Methoden 14-15

Methode 14

Dibromierung von 4-Benzoyloxy-4-oxo-*N*-Benzyl-(2*E*)-but-2-enamid mit Brom

Zu einer Lösung von 1.0 Äq. But-2-endioat gelöst in DCM wird innerhalb von 1 h 1.1 Äq. Brom in DCM zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 16 h bei RT gerührt und anschließend 3 x mit ges. Na₂S₂O₃-Lsg. gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden 2 x mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen 1 x mit ges. Na₂S₂O₃-Lsg. und 1 x mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird mit Na₂SO₄ getrocknet, das Solvens i. Vak. entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt.

Methode 15

Epoxidierung von (2*Z*)-But-2-endioaten mit *tert*-Butylhydroperoxid

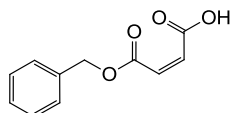
Unter Argonatmosphäre werden bei -78 °C zu einer Lösung von 1.5 Äq. einer wasserfreien Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Hexan (6 M) 1.1 Äq. einer Lösung von *n*-Butyllithium in *n*-Hexan (1.6 M) gegeben und die Lösung 5 min gerührt. Nach Zugabe von 1.0 Äq. Maleat in THF abs wird das Reaktionsgemisch 10 h bei RT gerührt. Anschließend wird Na₂SO₃-Lsg. zugegeben und weitere 30 min bei RT gerührt. Die wässrige Phase wird 3 x mit EA extrahiert, die vereinigten organischen Phasen 2 x mit Wasser und 1 x mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet, das Solvens i. Vak. entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt.

10. Synthetisierte Verbindungen

10.1 (2S,3S)+(2R,3R)-Aziridin-2,3-dicarboxylate

10.1.1 But-2-ensäuren

4-Benzoyloxy-4-oxo-(2Z)-but-2-ensäure



Laborkürzel: PF059.15A
 Bezeichnung: Maleinsäuremonobenzylester
 Molekularmasse: 206.19 g/mol

Methode: 1a.

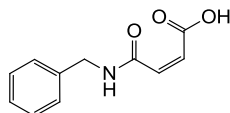
Ansatz: 24.5 g, 250 mmol (1.0 Äq.) Maleinsäureanhydrid;
 27.0 g, 250 mmol (1.0 Äq.) Benzylalkohol;
 27.8 g, 275 mmol (1.1 Äq.) Triethylamin.

Ausbeute: 44.6 g, 216 mmol, 86 %, farbloser Feststoff.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.47-7.33 (m 5 H, Ar-CH), 6.50 (d, 1 H, C²H, ³J = 12.8 Hz), 6.40 (d, 1 H, C³H, ³J = 12.8 Hz), 5.31 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.¹⁹⁴

4-Benzylamino-4-oxo-(2Z)-but-2-ensäure



Laborkürzel: PF117.58A
 Bezeichnung: Maleinsäuremonobenzylamid
 Molekularmasse: 205.21 g/mol

Methode: 1b.

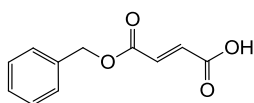
Ansatz: 9.80 g, 100 mmol (1.0 Äq.) Maleinsäureanhydrid;
 10.7 g, 100 mmol (1.0 Äq.) Benzylamin;
 101 mg, 1.0 mmol (0.001 Äq.) Triethylamin;
 120 ml Dichlormethan.

Ausbeute: 19.6 g, 96.0 mmol, 96 %, farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400 MHz), δ [ppm] = 15.66 (s, 1 H, CO_2H), 7.42-7.29 (m, 5 H, Ar-CH), 6.71 (s, 1 H, NH), 6.38 (d, 1 H, C^3H , $^3J = 12.8$ Hz), 6.22 (d, 1 H, C^2H , $^3J = 12.8$ Hz), 4.57 (d, 2 H, CONHCH_2Ph , $^3J = 5.8$ Hz).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.¹⁹⁵

4-Benzylloxy-4-oxo-(2E)-but-2-ensäure



Laborkürzel: PF021.01E
Bezeichnung: Fumarsäuremonobenzylester
Molekularmasse: 206.19 g/mol

Methode: 1c.

Ansatz: 1.00 g, 3.37 mmol (1.0 Äq.) (2E)-Dibenzyl-but-2-endioat;
141 mg, 3.37 mmol (1.0 Äq.) Lithiumhydroxid * Monohydrat;
13 ml THF.

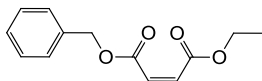
Ausbeute: 153 mg, 742 μmol , 22 %, farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 400 MHz), δ [ppm] = 7.44-7.29 (m 5 H, Ar-CH), 6.98, (d, 2 H, C^2H , $^3J = 15.8$ Hz), 6.88 (d, 1 H, C^3H , $^3J = 15.8$ Hz), 5.25 (s, 2 H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.¹⁹⁶

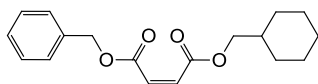
10.1.2 (2Z)-But-2-endioate

1-Benzyl-4-ethyl-(2Z)-but-2-endioat



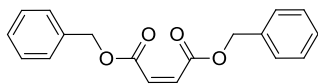
Laborkürzel: PF262.97A
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 234.25 g/mol

- Methode: 3c.
- Ansatz: 5.00 g, 24.2 mmol (1.0 Äq.) Maleinsäuremonobenzylester;
 1.06 g, 23.0 mmol (0.95 Äq.) Ethanol;
 5.00 g, 24.2 mmol (1.0 Äq.) DCC;
 296 mg, 2.42 mmol (0.1 Äq.) DMAP;
 100 ml Dichlormethan.
- R_f: 0.47 (Petrolether/Ethylacetat [4:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 2.29 g, 9.75 mmol, 42 %, farbloses Öl.
- ESI-MS: ber. f. C₁₃H₁₄O₄, 234.09; gef.: 257.10 [M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2982 (w), 1715 (s), 1634 (w), 1405 (m), 1213 (m), 1151 (s), 1025 (w), 808 (w), 730 (w), 694 (s).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.55-7.30 (m, 5 H, Ar-CH), 6.26 (s, 2 H, CH=CH), 5.18 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.17 (q, 2 H, CO₂CH₂CH₃, ³J = 14.3, 7.2 Hz), 1.25 (t, 3 H, CO₂CH₂CH₃, ³J = 7.1 Hz).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 165.28, 165.07 (CO), 135.23 (Ar-C_q), 130.58, 129.18 (CH=CH), 128.63, 128.59, 128.52 (Ar-CH), 67.13 (CO₂CH₂Ph), 61.33 (CO₂CH₂CH₃), 14.01 (CO₂CH₂CH₃).

1-Benzyl-4-cyclohexylmethyl-(2Z)-but-2-endioat

Laborkürzel: PF309.17D
Bezeichnung: -
Molekularmasse: 302.36 g/mol

- Methode: 3c.
- Ansatz: 7.50 g, 36.3 mmol (1.0 Äq.) Maleinsäuremonobenzylester;
3.94 g, 34.5 mmol (0.95 Äq.) Cyclohexylmethanol;
7.50 g, 36.3 mmol (1.0 Äq.) DCC;
444 mg, 3.63 mmol (0.1 Äq.) DMAP;
125 ml Dichlormethan.
- R_f: 0.90 (Petrolether/Ethylacetat [2:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 3.40 g, 11.2 mol, 31 %, gelbliches Öl.
- ESI-MS: ber. f. C₁₈H₂₂O₄, 302.15; gef.: 325.14 [M+Na]⁺, 326.16 [M+H+Na]⁺, 627.34 [2M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2921 (s), 2847 (m), 1719 (s), 1638 (w), 1446 (w), 1401 (s), 1200 (m), 1157 (s).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.45-7.33 (m, 5 H, Ar-CH), 6.27 (s, 2 H, CH=CH), 3.92 (d, 2 H, CO₂CH₂Cy, ³J = 6.6 Hz), 1.86-1.61 (m, 6 H, 2 x Cy-2-CH_{eq}H, 2 x Cy-3-CH_{eq}H, 1 x Cy-1-CH, 1 x Cy-4-CH_{eq}H), 1.35-1.09 (m, 3 H, 2 x Cy-3-CHH_{ax}, Cy-4-CHH_{ax}), 1.04-0.84 (m, 2 H, 2 x Cy-2-CHH_{ax}).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 165.37, 165.06 (CO), 135.22 (Ar-C_q), 130.39, 129.23 (CH=CH), 128.55, 128.60, 128.60 128.47 (Ar-CH), 70.45 (CO₂CH₂Cy), 67.11 (CO₂CH₂Ph) 36.84 (Cy-1-CH), 29.56 (Cy-2-CH₂), 26.31 (Cy-4-CH₂), 25.61 (Cy-3-CH₂).

Dibenzyl-(2Z)-but-2-endioat

Laborkürzel: PF309B
Bezeichnung: -
Molekularmasse: 296.32 g/mol

Methode: 3c.

Ansatz: 1.0 g, 4.85 mmol (1.0 Äq.) Maleinsäuremonobenzylester;
498 mg, 4.60 mmol (0.95 Äq.) Benzylalkohol;
1.00 g, 4.85 mmol (1.0 Äq.) DCC;
59.2 mg, 485 µmol (0.1 Äq.) DMAP;
25 ml Dichlormethan.

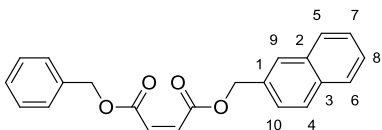
R_f: 0.71 (Petrolether/Ethylacetat [2:1]).

SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].

Ausbeute: 521 mg, 1.75 mmol, 36 %, farbloses Öl.

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.45-7.28 (m, 10 H, Ar-CH), 6.29 (s, 2 H, CH=CH), 5.14 (s, 2 H, 2 x CO₂CH₂Ph).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.¹⁹⁷¹⁹⁸

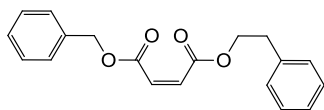
4-Benzyl-1-(naphthalin-2-ylmethyl)-(2Z)-but-2-endioat

Laborkürzel: PF277c.109A

Bezeichnung: -

Molekularmasse: 346.38 g/mol

- Methode: 3c.
- Ansatz: 5.00 g, 24.2 mmol (1.0 Äq.) Maleinsäuremonobenzylester;
 3.64 g, 23.0 mmol (0.95Äq.) Naphthalin-2-ylmethanol;
 5.00 g, 24.2 mmol (1.0 Äq.) DCC;
 296 mg, 2.42 mmol (0.1 Äq.) DMAP;
 100 ml Dichlormethan.
- R_f: 0.35 (Petrolether/Ethylacetat [4:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 2.22 g, 6.41 mmol, 52 %, farbloses Öl.
- ESI-MS: ber. f. C₂₂H₁₈O₄, 346.18; gef.: 369.11 [M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3056 (w), 2941 (m), 2851 (w), 1723 (s), 1638 (s), 1597 (w), 1397 (m), 1204 (m), 1155 (s), 980 (m), 812 (m), 747 (m), 690 (m).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.91-7.78 (m, 4 H, Naph-6-CH, Naph-4-CH, Naph-5-CH, Naph-9-CH), 7.54-7.48 (m, 2 H, Naph-7-CH, Naph-8-CH), 7.45 (dd, 1 H, Naph-10-CH, ³J = 8.5, 1.7 Hz), 7.37-7.30 (m, 5 H, Ph-CH), 6.32 (s, 2 H, CH=CH), 5.32 (s, 2 H, CO₂CH₂Naph), 5.15 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 165.10, 165.06 (CO), 135.14 (Ph-C_q), 133.23 (Naph-C_q), 133.18 (Naph-C_q), 132.60 (Naph-C_q), 129.95, 129.93 (CH=CH), 128.67, 128.63, 128.57, 128.51, 128.47, 128.08, 127.80, 127.78 (Ar-CH), 126.46, 126.42, 126.10 (Naph-CH), 67.33 (CO₂CH₂Naph), 67.20 (CO₂CH₂Ph).

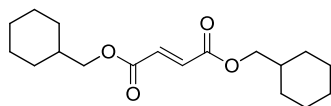
1-Benzyl-4-(2-phenylethyl)-(2Z)-but-2-endioat

Laborkürzel: PF306.114A
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 310.34 g/mol

- Methode: 3c.
- Ansatz: 7.50 g, 36.3 mmol (1.0 Äq.) Maleinsäuremonobenzylester;
 4.22 g, 34.5 mmol (0.95 Äq.) 2-Phenylethanol;
 7.50 g, 36.3 mmol (1.0 Äq.) DCC;
 444 mg, 3.63 mmol (0.1 Äq.) DMAP;
 125 ml Dichlormethan.
- R_f: 0.37 (Petrolether/Ethylacetat [4:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 5.42 g, 17.4 mmol, 50 %, farbloses Öl.
- ESI-MS: ber. f. C₁₉H₁₈O₄, 310.12; gef.: 333.12 [M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3060 (w), 3035 (w), 2953 (w), 1723 (s), 1642 (w), 1499 (w), 1454 (w), 1401 (m), 1209 (m), 1151 (s), 988 (m), 747 (m), 694 (s).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.35-7.04 (m, 10 H, Ar-CH), 6.18, 6.14 (je d, 2 H, CH=CH, ³J = 9.7 Hz), 5.10 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.23 (t, 2 H, CO₂CH₂CH₂, ³J = 7.2 Hz), 2.83 (t, 2 H, CO₂CH₂CH₂, ³J = 7.2 Hz).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 165.23, 165.02 (CO), 137.55, 135.28 (Ar-C_q), 130.42, 129.43 (CH=CH), 128.98, 128.69, 128.62, 128.57, 126.71 (Ar-CH), 67.18 (CO₂CH₂Ph), 65.74 (CO₂CH₂CH₂), 34.84 (CO₂CH₂CH₂).

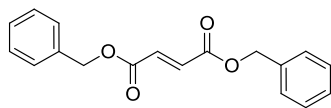
10.1.3 (2E)-But-2-endioate

10.1.3.1 Symmetrische (2E)-But-2-endioate

Bis(cyclohexylmethyl)-(2E)-but-2-endioat

Laborkürzel: PF191.68A
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 308.41 g/mol

- Methode: 2.
- Ansatz: 5.00 g, 43.1 mmol (1.0 Äq.) Fumarsäure;
 12.3 g, 107 mmol (2.5 Äq.) Cyclohexylmethanol;
 820 mg, 4.31 mmol (0.1 Äq.) *para*-Toluolsulfonsäure * Monohydrat;
 25 ml Benzol.
- Rf: 0.73 (Dichlormethan).
- SC: Dichlormethan.
- Ausbeute: 13.2 g, 43.0 mmol, 99 %, farbloser Feststoff.
- ESI-MS: ber. f. C₁₈H₂₈O₄, 308.20; gef.: 309.23 [M+H]⁺, 331.22, [M+Na]⁺ 639.44, [2M+Na]⁺.
- Smp: 64 °C.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2917 (s), 2851 (s), 1707 (s), 1662 (w), 1446 (m), 1384 (w), 1298 (s), 1217 (w), 1155 (s), 1000 (s), 976 (s), 943 (m), 886 (m), 771 (s).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 6.85 (s, 2 H, CH=CH), 4.01 (d, 4 H, 2 x CO₂CH₂Cy, ³J = 6.5 Hz), 1.79-1.72 (m, 12 H, 4 x Cy-2-CH_{eq}H, 4 x Cy-3-CH_{eq}H, 2 x Cy-1-CH, 2 x Cy-4-CH_{eq}H), 1.35-1.10 (m, 6 H, 4 x Cy-3-CHH_{ax}, 2 x Cy-4-CHH_{ax}), 1.06-0.94 (m, 4 H, 4 x Cy-2-CHH_{ax}).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 100 MHz), δ [ppm] = 165.13 (CO), 133.59 (CH=CH), 70.43 (CO₂CH₂Cy), 37.05 (Cy-1-CH), 29.60 (Cy-2-CH₂), 26.29 (Cy-4-CH₂), 25.61 (Cy-3-CH₂).

Dibenzyl-(2E)-but-2-endioat

Laborkürzel: PF027.11A
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 296.32 g/mol

Methode: 2.

Ansatz: 34.8 g, 300 mmol (1.0 Äq.) Fumarsäure;
 68.1 g, 630 mmol (2.5 Äq.) Benzylalkohol;
 2.85 g, 15.0 mmol (0.1 Äq.) *para*-Toluolsulfonsäure * Monohydrat;
 180 ml Benzol.

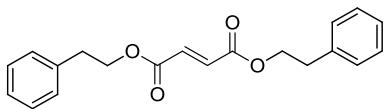
R_f: 0.70 (Dichlormethan).

SC: Dichlormethan.

Ausbeute: 88.8 g, 299 mmol, > 99 %, gelbliches Öl.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.42-7.32 (m, 10 H, Ar-CH), 6.93 (s, 2 H, CH=CH), 5.23 (s, 2 H, 2 x CO₂CH₂Ph).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.¹⁹⁹⁻²⁰¹

Bis(2-phenylethyl)-(2E)-but-2-endioat

Laborkürzel: PF189.67A
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 324.37 g/mol

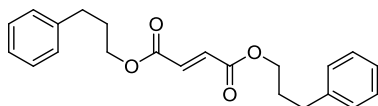
Methode: 2.

Ansatz: 5.00 g, 43.0 mmol (1.0 Äq.) Fumarsäure;
 13.1 g, 107 mmol (2.5 Äq.) 2-Phenylethanol;
 820 mg, 4.31 mmol (0.1 Äq.) *para*-Toluolsulfonsäure * Monohydrat;
 25 ml Toluol.

R_f: 0.83 (Dichlormethan).

SC:	Dichlormethan.
Ausbeute:	13.4 g, 41.5 mmol, 96 %, farbloser Feststoff.
ESI-MS:	ber. f. C ₂₀ H ₂₀ O ₄ , 324.14; gef.: 347.15 [M+Na] ⁺ .
Smp:	77 °C.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3080 (w), 3060 (w), 2958 (w), 2937 (w), 2896 (w), 2864 (w), 1703 (s), 1450 (m), 1307 (s), 1155 (s).
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 400 MHz), δ [ppm] = 7.35-7.29 (m, 5 H, Ar-CH), 7.25-7.20 (m, 5 H, Ar-CH), 6.81 (s, 2 H, CH=CH), 4.41 (t, 4 H, 2 x CO ₂ CH ₂ CH ₂ , ³ J = 7.0 Hz), 2.99 (t, 4 H, 2 x CO ₂ CH ₂ CH ₂ , ³ J = 7.0 Hz).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 100 MHz), δ [ppm] = 164.89 (CO), 137.45 (Ar-C _q), 133.64 (CH=CH), 128.94, 128.63, 126.76 (Ar-CH), 65.84 (CO ₂ CH ₂ CH ₂), 34.99 (CO ₂ CH ₂ CH ₂).

Bis(3-phenylpropyl)-(2E)-but-2-endioat



Laborkürzel:	PF195.70A
Bezeichnung:	-
Molekularmasse:	352.42 g/mol

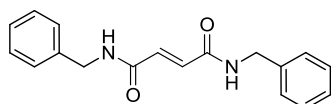
Methode:	2.
Ansatz:	5.00 g, 43.0 mmol (1.0 Äq.) Fumarsäure; 14.6 g, 107 mmol (2.5 Äq.) 3-Phenyl-1-Propanol; 820 mg, 4.31 mmol (0.1 Äq.) <i>para</i> -Toluolsulfonsäure * Monohydrat; 25 ml Toluol.
R _f :	0.76 (Dichlormethan).
SC:	Dichlormethan.
Ausbeute:	15.0 g, 42.6 mmol, 99 %, farbloser Feststoff.
ESI-MS:	ber. f. C ₂₂ H ₂₄ O ₄ , 352.17; gef.: 353.27 [M+H] ⁺ , 375.16 [M+Na] ⁺ .
Smp:	37-38 °C.

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3035 (w), 2953 (w), 2900 (w), 1711 (s), 1495 (m), 1458 (m), 1364 (m), 1286 (s), 1143 (s), 1004 (s), 955 (s), 759 (s), 714 (s), 698 (s).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.22 (m, 4 H, Ar-CH), 7.12 (m, 6 H, Ar-CH), 6.76 (s, 2 H, CH=CH), 4.14 (t, 4 H, 2 x OCH₂CH₂, ³J = 6.5 Hz), 2.70-2.59 (m, 4 H, 2 x CH₂CH₂Ph), 2.01-1.88 (m, 4 H, 2 x OCH₂CH₂).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 165.02 (CO), 140.95 (Ar-C_q), 133.62 (CH=CH), 128.54, 128.43, 126.15 (Ar-CH), 64.74 (CO₂CH₂CH₂), 32.16 (CH₂CH₂Ph), 30.08 (CO₂CH₂CH₂).

***N,N*-Dibenzyl-(2*E*)-but-2-endiamid**



Laborkürzel: PF194.69A
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 294.35 g/mol

Methode: 3a.

Ansatz: 5.00 g, 43.7 mmol (1.0 Äq.) Fumarsäure;

7.66 g, 71.5 mmol (1.6 Äq.) Benzylamin;

17.7 g, 86.1 mmol (2.0 Äq.) DCC;

2.10 g, 17.2 mmol (0.4 Äq.) DMAP;

50 ml Dichlormethan.

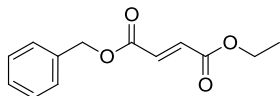
R_f: 0.47 (Ethylacetat).

SC: Dichlormethan.

Ausbeute: 1.62 g, 5.50 mmol, 15 %, gelblicher Feststoff.

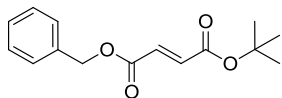
¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 8.63 (br s, 2 H, 2 x NH), 7.42-7.27 (m, 10 H, Ar-CH), 6.13 (s, 2 H, CH=CH), 4.48 (d, 4 H, 2 x CONHCH₂Ph, ³J = 5.7 Hz).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^{202,203}

10.1.3.2 Unsymmetrische (2*E*)-But-2-endioate1-Benzyl-4-ethyl-(2*E*)-but-2-endioat

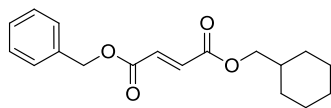
Laborkürzel: PF261.96A
Bezeichnung: -
Molekularmasse: 234.25 g/mol

- Methode: 3b.
- Ansatz: 2.50 g, 17.3 mmol (1.0 Äq.) Fumarsäuremonoethylester;
1.78 g, 17.3 mmol (1.0 Äq.) Benzylalkohol;
3.93 g, 19.0 mmol (1.1 Äq.) DCC;
212 mg, 1.73 mmol (0.1 Äq.) DMAP,
100 ml Dichlormethan.
- R_f: 0.7 (Petrolether/Ethylacetat [4:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 2.91 g, 12.4 mmol, 71 %, farbloses Öl.
- ESI-MS: ber. f. C₁₃H₁₄O₄, 234.09; gef.: 235.07 [M+H]⁺, 236.09 [M+2H]⁺, 257.10 [M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3064 (w), 3035 (w), 2978 (w), 1711 (s), 1642 (w), 1454 (w), 1368 (w) 1290 (s), 1254 (s), 1147 (s), 1033 (m), 976 (m), 690 (m).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.46-7.30 (m, 5 H, Ar-CH), 6.89 (s, 2 H, CH=CH), 5.23 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.25 (q, 2 H, CO₂CH₂CH₃, ³J = 7.1 Hz), 1.31 (t, 3 H, CO₂CH₂CH₃, ³J = 7.1 Hz).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 164.90, 164.82 (CO), 135.29 (Ar-C_q), 134.16, 133.31 (CH=CH), 128.69, 128.56, 128.39 (Ar-CH), 67.10 (CO₂CH₂Ph), 61.41 (CO₂CH₂CH₃) 14.14 (CO₂CH₂CH₃).

1-Benzyl-4-*tert*-butyl-(2*E*)-but-2-endioat

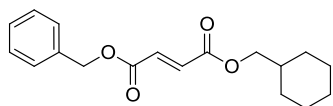
Laborkürzel: PF048.21A
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 262.30 g/mol

- Methode: 3b.
- Ansatz: 20.0 g, 97.0 mmol (1.0 Äq.) Maleinsäuremonobenzylester;
 7.19 g, 97.0 mmol (1.0 Äq.) *tert*-Butanol;
 22.0 g, 106 mmol (1.1 Äq.) DCC;
 9.48 g, 77.6 mmol (0.8 Äq.) DMAP;
 250 ml Dichlormethan.
- R_f: 0.75 (Dichlormethan).
- SC: Cyclohexan/Ethylacetat [19:1].
- Ausbeute: 13.9 g, 53.1 mmol, 54 %, farblose Flüssigkeit.
- ESI-MS: ber. f. C₁₅H₁₈O₄, 262.12; gef.: 285.12 [M+Na]⁺, 301.10 [M+K]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2974 (m), 1711 (s), 1638 (w), 1499 (w), 1454 (m), 1368 (m), 1290 (s), 1249 (m), 1135 (s), 972 (s), 841 (w), 751 (w).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.42-7.32 (m, 5 H, Ar-CH), 6.80 (s, 2 H, CH=CH), 5.23 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph), 1.50 (s, 9 H, C(CH₃)₃).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 100 MHz), δ [ppm] = 165.04 (CO₂CH₂Ph), 164.02 (CO₂C(CH₃)₃), 136.07 (CH=CH), 135.34 (Ar-C_q), 132.25 (CH=CH), 128.63, 128.47, 128.32 (Ar-CH), 81.96 (C(CH₃)₃), 69.96 (CO₂CH₂Ph), 27.96 (C(CH₃)₃).

1-Benzyl-4-cyclohexylmethyl-(2E)-but-2-endioat

Laborkürzel: PF013.09A
Bezeichnung: -
Molekularmasse: 302.36 g/mol

- Methode: 3c.
- Ansatz: 568 mg, 2.75 mmol (1.0 Äq.) Fumarsäuremonobenzylester;
314 mg, 2.75 mmol (1.0 Äq.) Cyclohexylmethanol;
624 mg, 3.02 mmol (1.1 Äq.) DCC;
33.5 mg, 2.75 μ mol (0.1 Äq.) DMAP;
20 ml Dichlormethan.
- R_f: 0.56 (Petrolether/Ethylacetat [4:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 230 mg, 760 μ mol, 27 %, farbloses Öl.
- ESI-MS: ber. f. C₁₈H₂₂O₄, 302.15; gef.: 325.16 [M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3072 (w), 3031 (w), 2925 (s), 2847 (m), 1715 (s), 1638 (w), 1499 (w), 1450 (m), 1372 (w), 1290 (s), 1249 (m), 1217 (m), 1143 (s), 1078 (w), 1004 (s), 967 (w), 771 (w), 747 (w), 694 (s), 665 (w).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.43-7.28 (m, 5 H, Ar-CH), 6.90 (s, 2 H, CH=CH), 5.24 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.01 (d, 2 H, CO₂CH₂Cy, ³J = 6.5 Hz), 1.86-1.55 (m, 6 H, 2 x Cy-2-CH_{eq}H, 2 x Cy-3-CH_{eq}H, 1 x Cy-1-CH, 1 x Cy-4-CH_{eq}H), 1.39-1.09 (m, 3 H, 2 x Cy-3-CHH_{ax}, 1 x Cy-4-CHH_{ax}), 1.09-0.87 (m, 2 H, 2 x Cy-2-CHH_{ax}).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 165.01, 164.86 (CO), 135.29 (Ar-C_q), 134.22, 133.23 (CH=CH), 128.71, 128.59, 128.45 (Ar-CH), 70.51 (CO₂CH₂Cy), 67.14 (CO₂CH₂Ph), 37.06 (Cy-1-CH), 29.62 (Cy-2-CH₂), 26.33 (Cy-4-CH₂), 25.66 (Cy-3-CH₂).



Laborkürzel: PF042.16E
Bezeichnung: -
Molekularmasse: 302.36 g/mol

Methode: 3b.

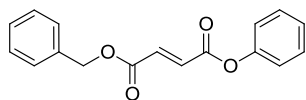
Ansatz: 10.0 g, 48.5 mmol (1.0 Äq.) Maleinsäuremonobenzylester;
5.54 g, 48.5 mmol (1.0 Äq.) Cyclohexylmethanol;
11.1 g, 53.6 mmol (1.1 Äq.) DCC;
4.74 g, 38.8 mmol (0.8 Äq.) DMAP;
200 ml Dichlormethan.

R_f: 0.56 (Petrolether/Ethylacetat [4:1]).

SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].

Ausbeute: 8.12 g, 26.8 mmol, 55 %, farbloses Öl.

Die analytischen Daten entsprechen denen der Darstellung aus dem Fumarsäuremonobenzylester.

4-Benzyl-1-phenyl-(2E)-but-2-endioat

Laborkürzel: PF083.27C
Bezeichnung: -
Molekularmasse: 282.29 g/mol

Methode: 3b.

Ansatz: 2.00 g, 9.70 mmol (1.0 Äq.) Maleinsäuremonobenzylester;
912 mg, 9.70 mmol (1.0 Äq.) Phenol;
2.20 g, 10.7 mmol (1.1 Äq.) DCC;
948 mg, 7.76 mmol (0.8 Äq.) DMAP;
25 ml Dichlormethan.

R_f: 0.74 (Dichlormethan).

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [4:1].

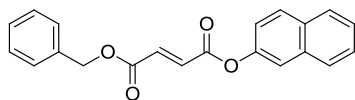
Ausbeute: 1.05 g, 3.70 mmol, 38 %, gelbliches Öl.

ESI-MS: ber. f. C₁₇H₁₄O₄, 282.09; gef.: 206.13 [M-C₆H₅+H]⁺, 305.10 [M+Na]⁺.

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3073 (w), 2939 (w), 1722 (s), 1492 (w), 1284 (m), 1243 (w), 1190 (m), 1137 (m).

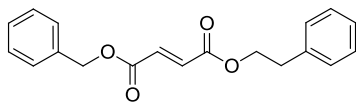
¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.43-7.35 (m, 7 H, Ar-CH), 7.28-7.24 (m, 1 H, Ar-CH), 7.15-7.12 (m, 2 H, Ar-CH), 7.08 (s, 2 H, CH=CH), 5.28 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100 MHz), δ [ppm] = 164.49, 163.30 (CO), 150.27 (Ph-C_qO), 135.12 (Ar-C_q), 134.13, 133.25 (CH=CH), 129.54, 128.69, 128.64, 128.59, 128.40, 128.34, 126.24, 121.24 (Ar-CH), 67.28 (CO₂CH₂Ph).

4-Benzyl-1-(naphthalin-2-yl)-(2E)-but-2-endioat

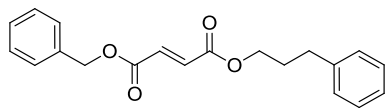
Laborkürzel: PF065.28A
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 332.10 g/mol

- Methode: 3b.
- Ansatz: 1.00 g, 4.87 mmol (1.0 Äq.) Maleinsäuremonobenzylester;
 700 mg, 4.87 mmol (1.0 Äq.) 2-Napthol;
 1.10 g, 5.36 mmol (1.1 Äq.) DCC;
 530 mg, 4.36 mmol (0.8 Äq.) DMAP;
 20 ml Dichlormethan.
- R_f: 0.3 (Dichlormethan/Petrolether [1:1]).
- SC: Dichlormethan.
- Ausbeute: 407 mg, 1.22 mmol, 25 %, farbloser Feststoff.
- ESI-MS: ber. f. C₂₁H₁₆O₄, 332.35; gef.: 333.14 [M+H]⁺, 355.13 [M+Na]⁺.
- Smp: 96 °C.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3068 (w), 1711 (s), 1601 (w), 1503 (m), 1458 (w), 1376 (m), 1294 (s), 1204 (m), 1147 (s), 988 (s), 894 (m), 784 (m).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.89-7.80 (m, 3 H, Naph-CH), 7.62 (d, 1 H, Naph-CH, ³J = 2.2 Hz), 7.53-7.46 (m, 2 H, Naph-CH), 7.43-7.34 (m, 5 H, Ar-CH), 7.28-7.25 (m, 1 H, Naph-CH), 7.13 (s, 2 H, CH=CH), 5.30 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 100 MHz), δ [ppm] = 164.53, 163.49 (CO), 147.91 (Ar-C_qO), 135.15 (Ar-C_qCH₂), 135.05, 133.28 (CH=CH), 133.08, 131.62 (Ar-C_q), 129.60, 128.72, 128.62, 128.43, 127.81, 127.74, 126.74, 125.97, 120.59, 118.39 (Ar-CH), 67.28 (CO₂CH₂Ph).

1-Benzyl-4-(2-phenylethyl)-(2E)-but-2-endioat

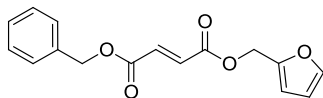
Laborkürzel: PF054.25A
Bezeichnung: -
Molekularmasse: 310.34 g/mol

- Methode: 3b.
- Ansatz: 20.0 g, 97.0 mmol (1.0 Äq.) Maleinsäuremonobenzylester;
11.8 g, 97.0 mmol (1.0 Äq.) 2-Phenylethanol;
22.0 g, 106 mmol (1.1 Äq.) DCC;
9.48 g, 77.6 mmol (0.8 Äq.) DMAP;
250 ml DCM.
- R_f: 0.44 (Petrolether/Ethylacetat [9:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [19:1].
- Ausbeute: 17.8 g, 38.0 mol, 39 %, farbloser Feststoff.
- ESI-MS: ber. f. C₁₉H₁₈O₄, 310.12; gef.: 333.13 [M+Na]⁺.
- Smp: 44 °C.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2958 (w), 1703 (s), 1495 (w), 1454 (m), 1384 (w), 1290 (s), 1209 (w), 1106 (w), 1086 (w), 976 (s), 874 (w), 751 (s).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.40-7.28 (m, 7 H, Ar-CH), 7.24-7.20 (m, 3 H, Ar-CH), 6.90, 6.84 (je d, 2 H, CH=CH, ³J = 23.1 Hz), 5.24 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.42 (t, 2 H, CO₂CH₂CH₂, ³J = 7.0 Hz), 2.99 (td, 2 H, CO₂CH₂CH₂, ³J = 7.0, 2.5 Hz).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 100 MHz), δ [ppm] = 164.78, 164.76 (CO), 137.42, 135.24 (Ar-C_q), 133.88, 133.60 (CH=CH), 128.89, 128.67, 128.59, 128.54, 128.36, 126.72 (Ar-CH), 67.11 (CO₂CH₂Ph), 65.79 (CO₂CH₂CH₂), 34.98 (CO₂CH₂CH₂).

1-Benzyl-4-(3-phenylpropyl)-(2E)-but-2-endioat

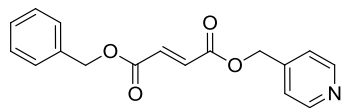
Laborkürzel: PF050.22A
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 324.37 g/mol

- Methode: 3b.
- Ansatz: 20.0 g, 97.0 mmol (1.0 Äq.) Maleinsäuremonobenzylester;
 13.2 g, 97.0 mmol (1.0 Äq.) 3-Phenyl-1-Propanol;
 22.0 g, 106 mmol (1.1 Äq.) DCC;
 9.48 g, 77.6 mmol (0.8 Äq.) DMAP;
 250 ml Dichlormethan.
- R_f: 0.75 (Dichlormethan).
- SC: Cyclohexan/Ethylacetat [19:1].
- Ausbeute: 16.4 g, 50.8 mmol, 52 %, farbloses Öl.
- ESI-MS: ber. f. C₂₀H₂₀O₄, 324.14; gef.: 347.14 [M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3060 (w), 3027 (w), 2945 (m), 2855 (w), 1715 (s), 1638 (w), 1601 (w), 1495 (m), 1372 (w), 1290 (s), 1258 (m), 1221 (m), 1147 (s), 1012 (s), 967 (m), 906 (w), 747 (m), 690 (s).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.41-7.26 (m, 7 H, Ar-CH), 7.20 (m, 3 H, Ar-CH), 6.91, 6.86 (je d, 2 H, CH=CH, ³J = 16.2 Hz), 5.25 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.22 (t, 2 H, CO₂CH₂CH₂, ³J = 6.5 Hz), 2.71 (t, 2 H, CH₂CH₂Ph, ³J = 7.8), 2.07-1.97 (m, 2 H, CO₂CH₂CH₂).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 101.62 MHz), δ [ppm] = 164.85, 164.76 (CO), 140.88, 135.23 (Ar-C_q), 133.93, 133.34 (CH=CH), 128.65, 128.52, 128.47, 128.36, 126.09 (Ar-CH), 67.10 (CO₂CH₂Ph), 64.70 (CO₂CH₂CH₂), 32.11 (CH₂CH₂Ph), 30.02 (CO₂CH₂CH₂).

4-Benzyl-1-(furan-2-ylmethyl)-(2E)-but-2-endioat

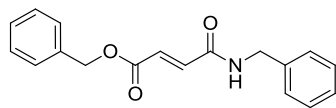
Laborkürzel: PF086.41A
Bezeichnung: -
Molekularmasse: 286.28 g/mol

- Methode: 3b.
- Ansatz: 2.00 g, 9.70 mmol (1.0 Äq.) Maleinsäuremonobenzylester;
951 mg, 9.70 mmol (1.0 Äq.) 2-(Hydroxymethyl)furan;
2.20 g, 10.7 mmol (1.1 Äq.) DCC;
948 mg, 7.76 mmol (0.8 Äq.) DMAP;
25 ml Dichlormethan.
- R_f: 0.81 (Dichlormethan).
- SC: Cyclohexan/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 992 mg, 34.7 mmol, 35 %, braunes Öl.
- ESI-MS: ber. f. C₁₆H₁₄O₅, 286.08; gef.: 309.10 [M+Na]⁺, 595.21 [2M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2956 (w), 1718 (s), 1286 (m), 1251 (m), 1150 (m), 967 (s).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.43 (dd, 1 H, Fu-5-CH, ³J = 1.8, ⁴J = 0.8 Hz), 7.38-7.33 (m, 6 H, Ar-CH), 6.92, 6.89 (je d, 2 H, CH=CH, ³J = 6.8 Hz), 6.45 (dd, 1 H, Fu-3-CH, ³J = 3.2, ⁴J = 0.8 Hz), 6.37 (dd, 1 H, Fu-4-CH, ³J = 3.2, 1.8 Hz), 5.23 (s, 2 H, CO₂CH₂Fu), 5.18 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 100 MHz), δ [ppm] = 164.76, 164.63 (CO), 148.89 (Fu-C_q), 143.68 (Fu-5-CH), 135.34 (Ar-C_q), 134.11, 133.61 (CH=CH), 128.81, 128.68, 128.48 (Ar-CH), 111.32 (Fu-4-CH), 110.79 (Fu-3-CH), 67.28 (CO₂CH₂Ph), 58.93 (CO₂CH₂Fu).

4-Benzyl-1-(pyridin-4-ylmethyl)-(2E)-but-2-endioat

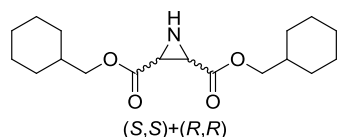
Laborkürzel: PF278c.t.110A
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 297.31 g/mol

- Methode: 3b.
- Ansatz: 5.00 g, 24.2 mmol (1.0 Äq.) Monobenzylmaleinat;
 2.51 g, 23.0 mmol (0.95 Äq.) 4-Pyridinmethanol;
 5.00 g, 24.2 mmol (1.0 Äq.) DCC;
 296 mg, 2.42 mmol (0.1 Äq.) DMAP;
 100 ml Dichlormethan.
- R_f: 0.51 (Dichlormethan/Methanol [9:1]).
- SC: Dichlormethan/Methanol [99:1].
- Ausbeute: 1.88 g, 6.34 mmol, 27 %, farbloser Feststoff.
- ESI-MS: ber. f. C₁₇H₁₅NO₄, 297.10; gef.: 298.11 [M+H]⁺.
- Smp: 80 °C.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2929 (m), 2843 (w), 1715 (s), 1605 (m), 1413 (w), 1294 (s), 1155 (s), 1012 (s), 967 (s), 796 (m), 730 (s).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 8.61 (d, 2 H, Py-2-CH, ³J = 5.8 Hz), 7.40-7.32 (m, 5 H, Ph-CH), 7.26 (d, 2 H, Py-3-CH, ³J = 5.8 Hz), 6.96 (s, 2 H, CH=CH), 5.24 (s, 4 H, 2 x CO₂CH₂).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 164.57, 164.43 (CO), 150.10 (Py-2-CH), 144.33 (Py-C_q), 135.14 (Ar-C_q), 134.53, 133.07 (CH=CH), 128.78, 128.71, 128.53 (Ar-CH), 122.03 (Py-3-CH), 67.37 (CO₂CH₂Ph), 65.08 (CO₂CH₂Py).

4-Benzyloxy-4-oxo-*N*-benzyl-(2*E*)-but-2-enamid

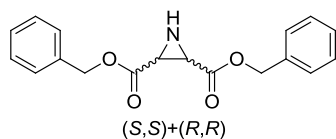
Laborkürzel: PF118.59A
Bezeichnung: -
Molekularmasse: 295.33 g/mol

- Methode: 3b.
- Ansatz: 1.00 g, 4.87 mmol (1.0 Äq.) Maleinsäuremonobenzylamid;
530 mg, 4.87 mmol (1.0 Äq.) Benzylalkohol;
1.10 g, 5.36 mmol (1.1 Äq.) DCC;
60.0 mg, 487 μ mol (0.1 Äq.) DMAP,
25 ml Dichlormethan.
- R_f: 0.79 (Petrolether/Ethylacetat [2:1]).
- SC: Cyclohexan/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 430 mg, 1.46 mmol, 29 %, farbloser Feststoff.
- ESI-MS: ber. f. C₁₈H₁₇NO₃, 295.12; gef.: 296.14 [M+H]⁺, 318.13 [M+Na]⁺, 613.66 [2M+Na]⁺.
- Smp: 135 °C.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3293 (s), 3060 (m), 3031 (m), 2945 (w), 1707 (s), 1662 (m), 1625 (s), 1552 (s), 1491 (m), 1454 (m), 1384 (m), 1327 (s), 1286 (s), 1237 (m), 1209 (m), 1160 (s), 1082 (w), 1025 (w), 980 (m), 898 (w), 824 (w), 681 (s).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.42-7.27 (m, 10 H, Ar-CH), 6.94, 6.89 (je d, 2 H, CH=CH, ³J = 15.4 Hz), 6.11 (br s, 1 H, NH), 5.21 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.53 (d, 2 H, CONHCH₂Ph, ³J = 5.8 Hz).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 100 MHz), δ [ppm] = 165.24 (CO), 163.28 (CON), 137.34 (CH=CH), 136.39 (NHCH₂Ar-C_q), 135.34 (CH=CH), 130.50 (Ar-C_q), 128.84, 128.61, 128.44, 128.25, 127.92, 127.83 (Ar-CH), 66.93 (CO₂CH₂Ph), 60.38 (CONHCH₂Ph).

10.1.4 (2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-Aziridin-2,3-dicarboxylate10.1.4.1 Symmetrische (2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-Aziridin-2,3-dicarboxylate**(2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-Bis(cyclohexylmethyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat**

Laborkürzel: PF252.88A
 Bezeichnung: (S,S)+(R,R)-Azi(OMeCy)₂
 Molekularmasse: 323.43 g/mol

- Methode: 12.
- Ansatz: 1.27 g, 4.14 mmol (1.0 Äq.) Bis(cyclohexylmethyl)-(2*E*)-but-2-endioat;
 1.00 g, 4.56 mmol (1.2 Äq.) DPSI;
 25 ml Toluol.
- R_f: 0.56 (Petrolether/Ethylacetat [4:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 260 mg, 803 μmol, 18 %, gelbliches Öl.
- ESI-MS: ber. f. C₁₈H₂₉NO₄, 323.21; gef.: 362.21 [M+K]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2917 (s), 2861 (s), 1728 (s), 1674 (w), 1621 (w), 1450 (m), 1388 (w), 1331 (m), 1258 (w), 1176 (s), 1074 (w), 1004 (m), 865 (w).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 4.06-3.85 (m, 4 H, 2 x CO₂CH₂Cy), 2.85 (s, 2 H, 2 x Azi-CH), 1.78-1.59 (m, 12 H, 4 x Cy-2-CH_{eq}H, 4 x Cy-3-CH_{eq}H, 2 x Cy-1-CH, 2 x Cy-4-CH_{eq}H), 1.32-1.10 (m, 6 H, 4 x Cy-3-CHH_{ax}, 2 x Cy-4-CHH_{ax}), 1.03-0.86 (m, 4 H, 4 x Cy-2-CHH_{ax}).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 169.79 (CO), 71.03 (CO₂CH₂Cy), 36.91 (Cy-1-CH), 35.74 (Azi-CH), 29.51 (Cy-2-CH₂), 26.24 (Cy-4-CH₂), 25.55 (Cy-3-CH₂).

(2S,3S)+(2R,3R)-Dibenzyl-aziridin-2,3-dicarboxylat

Laborkürzel: PF177.23V
Bezeichnung: (S,S)+(R,R)-Azi(OBn)₂
Molekularmasse: 311.33 g/mol

Methode: 12.

Ansatz: 245 mg, 828 μ mol (1.0 Äq.) Dibenzyl-(2*E*)-but-2-endioat;
218 mg, 994 μ mol (1.2 Äq.) DPSI;
5 ml Toluol.

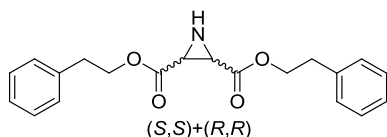
R_f: 0.10 (Cyclohexan/Ethylacetat [4:1]).

SC: Cyclohexan/Ethylacetat [9:1].

Ausbeute: 177 mg, 568 μ mol, 68 %, farbloses Öl.

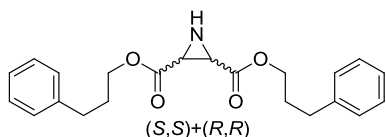
¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.41-7.31 (m, 10 H, Ar-CH), 5.22, 5.16 (je d, 2 H, CO₂CH₂Ph, ²J = 12.1 Hz), 2.95 (s, 2 H, 2 x Azi-CH), 1.57 (br s, 1 H, NH).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.⁹¹

(2S,3S)+(2R,3R)-Bis(2-phenylethyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat

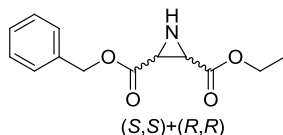
Laborkürzel: PF265.87C
 Bezeichnung: (S,S)+(R,R)-Azi(OEtPh)₂
 Molekularmasse: 339.39 g/mol

- Methode: 12.
- Ansatz: 1.24 g, 3.85 mmol (1.0 Äq.) Bis(2-phenylethyl)-(2E)-but-2-endioat;
 1.00 g, 4.62 mmol (1.2 Äq.) DPSI;
 15 ml Toluol.
- R_f: 0.29 (Petrolether/Ethylacetat [2:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 247 mg, 728 µmol, 18 %, farbloser Feststoff.
- ESI-MS: ber. f. C₂₀H₂₁NO₄, 339.15; gef.: 340.20 [M+H]⁺, 362.17 [M+Na]⁺, 701.37 [2M+Na]⁺.
- Smp: 84 °C.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3182 (w), 1732 (s), 1450 (w), 1388 (w), 1343 (m), 1270 (w), 1229 (w), 1172 (s), 1004 (m), 955 (w), 869 (m), 747 (s), 706 (s).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.40-7.10 (m, 10 H, Ar-CH), 4.52-4.22 (m, 4 H, 2 x CO₂CH₂CH₂), 2.98 (t, 4 H, 2 x CO₂CH₂CH₂, ³J = 7.1 Hz), 2.81 (s, 2 H, 2 x Azi-CH), 1.73 (s, 1 H, NH).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 169.48 (CO), 137.28 (Ar-C_q), 129.03, 128.75, 126.92 (Ar-CH), 66.43 (CO₂CH₂CH₂), 36.06 (Azi-CH), 35.04 (CO₂CH₂CH₂).

(2S,3S)+(2R,3R)-Bis(3-phenylpropyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat

Laborkürzel: PF351.151A
 Bezeichnung: (S,S)+(R,R)-Azi(OPropPh)₂
 Molekularmasse: 367.44 g/mol

- Methode: 12.
- Ansatz: 1.36 g, 3.86 mmol (1.0 Äq.) Bis(3-phenylpropyl)-(2E)-but-2-endioat;
 1.01 g, 4.64 mmol (1.2 Äq.) DPSI;
 25 ml Toluol.
- R_f: 0.47 (Petrolether/Ethylacetat [2:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 138 mg, 375 µmol, 9 %, farbloses Öl.
- ESI-MS: ber. f. C₂₂H₂₅NO₄, 367.18; gef.: 390.14 [M+Na]⁺, 757.34 [2M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3023 (w), 2921 (w), 2851 (w), 1728 (s), 1495 (w), 1454 (m), 1331 (w), 1176 (s), 1017 (m), 861 (w), 743 (m), 698 (s).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.36-7.27 (m, 4 H, Ar-CH), 7.26-7.12 (m, 6 H, Ar-CH), 4.32-4.08 (m, 4 H, 2 x CO₂CH₂), 2.89 (s, 2 H, 2 x Azi-CH), 2.73 (t, 4 H, 2 x CH₂CH₂Ph, ³J = 7.6 Hz), 2.11-1.96 (m, 4 H, 2 x OCH₂CH₂), 1.84 (br s, 1 H, NH).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 170.56, 168.80 (CO), 140.83 (Ar-C_q), 128.53, 128.39, 126.17 (Ar-CH), 65.59 (CO₂CH₂CH₂), 65.23 (CO₂CH₂CH₂), 36.17 (Azi-CH), 35.43 (Azi-CH), 32.06 (CH₂CH₂Ph), 29.98 (CO₂CH₂CH₂).

10.1.4.2 Unsymmetrische (2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-Aziridin-2,3-dicarboxylate**(2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-2-Benzyl-3-ethyl-aziridin-2,3-dicarboxylat**

Laborkürzel: PF264.99A
 Bezeichnung: (S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OEt)
 Molekularmasse: 249.26 g/mol

Methode: 12.

Ansatz: 908 mg, 3.88 mmol (1.0 Äq.) 1-Benzyl-4-ethyl-(2*E*)-but-2-endioat;
 1.02 g, 4.65 mmol (1.2 Äq.) DPSI;
 25 ml Toluol.

R_f: 0.14 (Petrolether/Ethylacetat [4:1]).

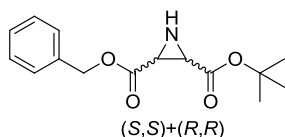
SC: Petrolether/Ethylacetat [7:1].

Ausbeute: 143 mg, 574 µmol, 14 %, farbloser Feststoff.

Smp: 50 °C. Lit.: 52 °C.⁸²

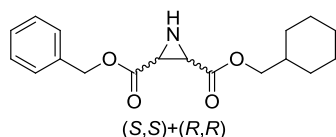
¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.43-7.30 (m, 5 H, Ar-CH), 5.31-5.07 (m, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.33-4.10 (m, 2 H, CO₂CH₂CH₃), 3.02-2.79 (m, 2 H, 2 x Azi-CH), 1.85 (s, 1 H, NH), 1.29 (t, 3 H, CO₂CH₂CH₃, ³J = 7.1 Hz).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.⁸²

(2S,3S)+(2R,3R)-2-Benzyl-3-tert-butyl-aziridin-2,3-dicarboxylat

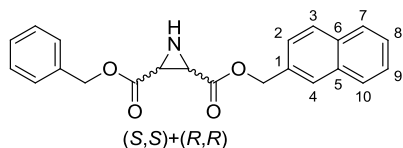
Laborkürzel: PF115.57A
 Bezeichnung: (S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OtBu)
 Molekularmasse: 277.32 g/mol

- Methode: 12.
- Ansatz: 996 mg, 3.80 mmol (1.0 Äq.) 1-Benzyl-4-tert-butyl-(2E)-but-2-endioat;
 1.00 g, 4.56 mmol (1.2 Äq.) DPSI;
 25 ml Benzol.
- R_f: 0.36 (Petrolether/Ethylacetat [4:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 151 mg, 544 µmol, 14 %, gelbliches Öl.
- ESI-MS: ber. f. C₁₅H₁₉NO₄, 277.13; gef.: 278.16 [M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3276 (w), 2947(w), 2913 (w), 2847 (w), 1728 (s), 1556 (w), 1450 (s), 1368 (m), 1339 (m), 1147 (s), 739 (m), 698 (m).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.40-7.34 (m, 5 H, Ar-CH), 5.23, 5.16 (je d, 2 H, CO₂CH₂Ph, ²J = 12.2 Hz), 2.85, 2.80 (je d, 2 H, 2 x Azi-CH, ³J = 2.2 Hz), 1.78 (s, 1 H, NH) 1.47 (s, 9 H, C(CH₃)₃).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 169.63, 168.77 (CO), 135.05 (Ar-C_q), 128.79, 128.67, 127.70 (Ar-CH), 83.06 (C(CH₃)₃), 67.70 (CO₂CH₂Ph), 36.76, 35.62 (Azi-CH), 28.03 (C(CH₃)₃).

(2S,3S)+(2R,3R)-2-Benzyl-3-(cyclohexylmethyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat

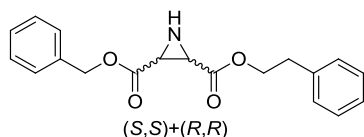
Laborkürzel: PF239.55C
 Bezeichnung: (S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OMeCy)
 Molekularmasse: 317.38 g/mol

- Methode: 12.
- Ansatz: 815 mg, 3.95 mmol (1.0 Äq.) 1-Benzyl-4-(2*E*)-cyclohexylmethyl-but-2-endoat;
 1.04 g, 4.74 mmol (1.2 Äq.) DPSI;
 25 ml Toluol.
- R_f: 0.55 (Petrolether/Ethylacetat [3:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 704 mg, 2.23 mmol, 56 %, gelbliches Öl.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2921 (s), 2847 (m), 1723 (s), 1679 (w), 1613 (m), 1474 (w), 1446 (m), 1335 (w), 1172 (s), 1078 (w), 1021 (w), 996 (w), 861 (w), 743 (s).
- ESI-MS: ber. f. C₁₈H₂₃NO₄, 317.16; gef.: 318.17 [M+H]⁺, 340.17 [M+Na]⁺, 657.35 [2M+Na]⁺.
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.32-7.22 (m, 5 H, Ar-CH), 5.20-5.03 (m, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.01-3.79 (m, 2 H, CO₂CH₂Cy), 2.90-2.76 (m, 2 H, 2 x Azi-CH), 1.72-1.48 (m, 6 H, 2 x Cy-2-CH_{eq}H, 2 x Cy-3-CH_{eq}H, 1 x Cy-1-CH, 1 x Cy-4-CH_{eq}H), 1.28-0.99 (m, 3 H, 2 x Cy-3-CHH_{ax}, 1 x Cy-4-CHH_{ax}), 0.98-0.74 (m, 2 H, 2 x Cy-2-CHH_{ax}).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 169.75, 163.74 (CO), 135.81 (Ar-C_q), 128.76, 128.60, 127.09 (Ar-CH), 71.19 (CO₂CH₂Cy), 67.77 (CO₂CH₂Ph), 36.97 (Cy-1-CH), 35.86 (Azi-CH), 29.58 (Cy-2-CH₂), 26.30 (Cy-4-CH₂), 25.62 (Cy-3-CH₂).

(2S,3S)+(2R,3R)-3-Benzyl-2-(naphthalin-2-ylmethyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat

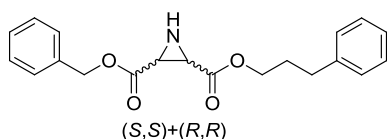
Laborkürzel: PF288.119A
 Bezeichnung: (S,S)+(R,R)-
 Azi(OBn)(OMeNaph)
 Molekularmasse: 361.39 g/mol

- Methode: 12.
- Ansatz: 1.31 g, 3.80 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyl-1-(naphthalin-2-ylmethyl)-(2Z)-but-2-endioat;
 1.00 g, 4.56 mmol (1.2 Äq.) DPSI;
 25 ml Toluol.
- R_f: 0.50 (Petrolether/Ethylacetat [2:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 140 mg, 387 µmol, 10 %, gelblicher Feststoff.
- ESI-MS: ber. f. C₂₂H₁₉NO₄, 361.13; gef.: 384.14 [M+Na]⁺, 745.31 [2M+Na]⁺.
- Smp: 78 °C.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3199 (m), 1740 (s), 1401 (w), 1196 (s), 996 (w), 812 (m), 747 (m), 690 (m).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.90-7.64 (m, 4 H, Naph-6-CH, Naph-4-CH, Naph-5-CH, Naph-9-CH), 7.51-7.40 (m, 3 H, Naph-7-CH, Naph-8-CH, Naph-10-CH), 7.37-7.17 (m, 5 H, Ph-CH), 5.21 (s, 2 H, CO₂CH₂Naph), 5.02, 4.97 (je d, 2 H, CO₂CH₂Ph, ²J = 12.1 Hz), 2.88 (s, 2 H, 2 x Azi-CH), 1.98 (s, 1 H, NH).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 167.91, 167.85 (CO), 135.02 (Ph-C_q), 133.30, 133.19, 132.47 (Naph-C_q), 128.68, 128.66, 128.61, 128.56, 128.13, 127.98, 127.82, 126.61, 126.53, 126.10 (Ar-CH), 67.84 (CO₂CH₂Naph), 67.68 (CO₂CH₂Ph) 36.71 (Azi-CH).

(2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-2-Benzyl-3-(2-phenylethyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat

Laborkürzel: PF266.56A
 Bezeichnung: (S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OEtPh)
 Molekularmasse: 325.36 g/mol

- Methode: 12.
- Ansatz: 1.17 g, 3.80 mmol (1.0 Äq.) 1-Benzyl-4-(2-phenylethyl)-(2*E*)-but-2-endoat;
 1.00 g, 4.56 mmol (1.2 Äq.) DPSI;
 25 ml Toluol.
- R_f: 0.50 (Petrolether/Ethylacetat [2:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 249 mg, 765 µmol, 19 %, gelbliches Öl.
- ESI-MS: ber. f. C₁₉H₁₉NO₄, 325.13; gef.: 326.18 [M+H]⁺, 348.15 [M+Na]⁺ 673.34 [2M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3276 (w), 3023 (w), 1732 (s), 1499 (w), 1454 (w), 1384 (w), 1331 (m), 1254 (w), 1176 (s), 1082 (w), 996 (w), 857 (w), 743 (m), 698 (s)
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.23-7.06 (m, 10 H, Ar-CH), 5.16-5.00 (m, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.36-4.17 (m, 2 H, CO₂CH₂CH₂), 2.91-2.82 (m, 2 H, CO₂CH₂CH₂), 2.80-2.67 (m, 2 H, 2 x Azi-CH), 1.71 (s, 1H, NH).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 169.63 (CO), 137.08, 134.78 (Ar-C_q), 128.81, 128.62, 128.53, 128.48, 128.45, 126.71 (Ar-CH), 67.66 (CO₂CH₂Ph), 66.21 (CO₂CH₂CH₂), 35.69 (Azi-CH), 34.73 (CO₂CH₂CH₂).

(2S,3S)+(2R,3R)-2-Benzyl-3-(3-phenylpropyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat

Laborkürzel: PF104.52A
 Bezeichnung: (S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OPropPh)
 Molekularmasse: 339.39 g/mol

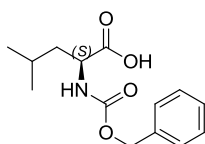
- Methode: 12.
- Ansatz: 1.34 g, 4.14 mmol (1.0 Äq.) 1-Benzyl-4-(3-phenylpropyl)-(2E)-but-2-endoat;
 1.00 g, 4.97 mmol (1.2 Äq.) DPSI;
 25 ml Toluol.
- R_f: 0.43 (Cyclohexan/Ethylacetat [2:1]).
- SC: Cyclohexan/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 242 mg, 713 µmol, 17 %, farbloses Öl.
- ESI-MS: ber. f. C₂₀H₂₁NO₄, 339.15; gef.: 362.15 [M+Na]⁺, 701.33, [2M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3276 (w), 3060 (w), 2953 (w), 2917 (w), 2855 (s), 1723 (s), 1617 (w), 1495 (w), 1450 (m), 1384 (w), 1331 (m), 1258 (w), 1168 (s), 1078 (w), 1017 (m), 910 (w), 857 (w), 820 (w), 739 (s), 702 (s).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.50-7.40 (m, 5 H, Ar-CH), 7.21-7.02 (m, 5 H, Ar-CH), 5.12, 5.06 (je d, 2 H, CO₂CH₂Ph, ²J = 12.1 Hz), 4.15-3.97 (m, 2 H, CO₂CH₂CH₂), 2.79 (s, 2 H, 2 x Azi-CH), 2.58 (t, 2 H, ³J = 6.8 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.00-1.71 (m, 3 H, CH₂CH₂CH₂ + NH).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 169.62 (CO), 140.85, 134.92 (Ar-C_q), 128.76, 128.60, 128.55, 128.41, 126.19 (Ar-CH), 67.77 (CO₂CH₂Ph), 65.45 (CO₂CH₂CH₂), 35.84 (Azi-CH), 32.08 (CH₂CH₂Ph), 29.98 (CH₂CH₂CH₂).

10.2 Peptide

10.2.1 Geschützte Aminosäuren

10.2.1.1 *N*-geschützte Aminosäuren

***N*-[(Phenylmethoxy)carbonyl]-(*S*)-leucin**



Laborkürzel: PF187.65A
 Bezeichnung: Cbz-(*S*)-Leu-OH
 Molekularmasse: 265.30 g/mol

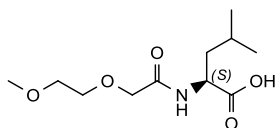
Methode: 10.

Ansatz: 10.0 g, 76.24 mmol (1.0 Äq.) (*S*)-Leucin;
 14.3 g, 83.86 mmol (1.1 Äq.) Benzylchloroformiat;
 24.2 g, 228 mmol (3.0 Äq.) Natriumcarbonat;
 100 ml H₂O.

Ausbeute: 19.9 g, 75.0 mmol, 98 %, orangenes Öl.

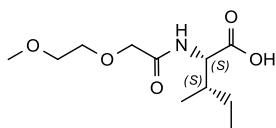
¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.42-7.28 (m, 5 H, Ar-CH), 5.12 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.42 (dt, 1 H, Leu-α-CH, ³J = 9.0, 5.0 Hz), 4.01-3.91 (m, 1 H, NH), 1.80-1.63 (m, 2 H, Leu-β-CH₂), 1.63-1.50 (m, 1 H, Leu-γ-CH), 0.96 (t, 6 H, Leu-δ-CH₃ + Leu-δ'-CH₃, ³J = 5.2 Hz).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.¹³⁵

N-(2-(2-Methoxyethoxy)acetyl)-(S)-leucin

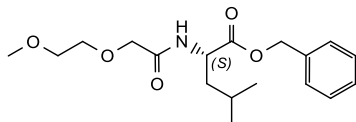
Laborkürzel: PF301.129A
 Bezeichnung: GlycAc-(S)-Leu-OH
 Molekularmasse: 247.29 g/mol

- Methode: 7.
- Ansatz: 1.00 g, 2.96 mmol (1.0 Äq.) GlycAc-(S)-Leu-OBn (Kap. 10.2.1.2);
 305 mg, Pd/C 10%;
 25 ml Methanol.
- Ausbeute: 724 mg, 2.93 mmol, 99 %, farbloses Öl.
- ESI-MS: ber. f. C₁₁H₂₁NO₅, 247.14; gef.: 248.17 [M+H]⁺, 270.14 [M+Na]⁺, 517.32 [2M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3309 (m), 2933 (s), 2859 (m), 1728 (m), 1658 (s), 1531 (m), 1229 (w), 1102 (m), 1025 (w), 890 (w), 845 (w).
- $[\alpha]_D^{20}$ °C: +2.22 ° (c = 0.45, CHCl₃).
- ¹H-NMR: (MeOD, 300 MHz), δ [ppm] = 4.42 (t, 1 H, Leu- α -CH, ³J = 7.2 Hz), 4.14 (s, 1 H, NH), 3.95 (s, 2 H, COCH₂O), 3.71-3.59 (m, 2 H, H₃COCH₂CH₂), 3.59-3.43 (m, 2 H, H₃COCH₂CH₂), 3.33 (s, 3 H, H₃COCH₂CH₂), 1.72-1.52 (m, 3 H, Leu- β -CH₂, Leu- γ -CH), 0.96-0.82 (m, 6 H, Leu- δ -CH₃, Leu- δ' -CH₃).
- ¹³C-NMR: (MeOD, 75 MHz), δ [ppm] = 172.73 (Leu-CO), 170.14 (CO), 72.76 (H₃COCH₂CH₂), 71.88 (H₃COCH₂CH₂), 71.03 (COCH₂O), 59.17 (H₃COCH₂CH₂), 51.79 (Leu- α -CH), 41.78 (Leu- β -CH), 26.03 (Leu- γ -CH), 23.42 (Leu- δ -CH), 21.81 (Leu- δ' -CH).

N-(2-(2-Methoxyethoxy)acetyl)-(S)-isoleucin

Laborkürzel: PF296.126A
 Bezeichnung: GlycAc-(S)-Ile-OH
 Molekularmasse: 247.29 g/mol

- Methode: 7.
- Ansatz: 1.00 g, 2.96 mmol (1.0 Äq.) GlycAc-(S)-Ile-OBn (Kap. 10.2.1.2);
 305 mg, Pd/C 10%;
 25 ml Methanol.
- Ausbeute: 731 mg, 2.95 mmol, 99 %, farbloses Öl.
- ESI-MS: ber. f. C₁₁H₂₁NO₅, 247.14; gef.: 248.17 [M+H]⁺, 270.14 [M+Na]⁺, 517.32 [2M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2962 (m), 2933 (s), 2872 (m), 1728 (m), 1654 (s), 1527 (m), 1446 (w), 1380 (w), 1335 (w), 1196 (w), 1135 (w), 1098 (m), 1021 (w).
- $[\alpha]_D^{20}$ °C: +23.2 ° (c = 0.25, CHCl₃).
- ¹H-NMR: (MeOD, 300 MHz), δ [ppm] = 4.38 (d, 1 H, Ile- α -CH, ³J = 5.1 Hz), 3.97 (s, 2 H, COCH₂O), 3.72-3.44 (m, 5 H, H₃COCH₂CH₂, H₃COCH₂CH₂, NH), 3.33 (s, 3 H, H₃COCH₂CH₂), 1.98-1.79 (m, 1 H, Ile- β -CH), 1.54-1.39 (m, 1 H, Ile- γ_1 -CH₂), 1.28-1.13 (m, 1 H, Ile- γ_1' -CH₂), 0.89 (t, 6 H, Ile- γ_2 -CH₃, Ile- δ -CH₃, ³J = 7.6 Hz).
- ¹³C-NMR: (MeOD, 75 MHz), δ [ppm] = 174.31 (Ile-CO), 172.70 (CO), 72.72 (H₃COCH₂CH₂), 72.10 (H₃COCH₂CH₂), 70.96 (COCH₂O), 59.21 (H₃COCH₂CH₂), 57.60 (Ile- α -CH), 38.47 (Ile- β -CH), 26.15 (Ile- γ_1 -CH₂), 15.97 (Ile- γ_2 -CH₃), 11.87 (Ile- δ -CH₃).

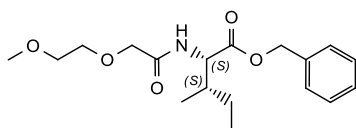
10.2.1.2 *N*- und *C*-geschützte Aminosäuren***N*-(2-(2-Methoxyethoxy)acetyl)-(S)-leucinbenzylester**

Laborkürzel: PF281.112A
 Bezeichnung: GlycAc-(S)-Leu-OBn
 Molekularmasse: 337.41 g/mol

- Methode: 11a.
- Ansatz: 3.00 g, 7.62 mmol (1.0 Äq.) (S)-Leu-OBn * *p*-TosOH;
 1.02 g, 7.62 mmol (1.0 Äq.) 2-(2-Methoxyethoxy)essigsäure;
 1.62 g, 15.2 mmol (2.1 Äq.) NMM;
 1.65 g, 8.00 mmol (1.05 Äq.) DCC;
 50 ml THF.
- R_f: 0.23 (Petrolether/Ethylacetat [1:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 1.55 g, 4.59 mmol, 60 %, farbloses Öl.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3321 (m), 2925 (s), 2868 (m), 1740 (s), 1666 (s), 1519 (s), 1450 (m), 1380 (w), 1331 (w), 1192 (w), 1139 (w), 1102 (w), 1025 (w), 849 (w), 747 (w), 694 (m).
- $[\alpha]_D^{23}$ °C: +2.22 ° (c = 0.45, CHCl₃).
- ESI-MS: ber. f. C₁₈H₂₇NO₅, 337.19; gef.: 324.22 [M-CH₃+2H]⁺, 346.21, [M-CH₃+H+Na]⁺, 669.43 [2(M-CH₃+H)+Na]⁺.
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.40-7.27 (m, 5 H, Ar-CH), 5.13 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.65 (dt, 1 H, Leu- α -CH, ³J = 8.7, 4.9 Hz), 4.04, 3.94 (je d, 2 H, COCH₂O, ²J = 16.0 Hz), 3.71-3.57 (m, 3 H, H₃COCH₂CH₂, NH), 3.51 (t, 2 H, H₃COCH₂CH₂, ³J = 4.3 Hz), 3.35 (s, 3 H, H₃COCH₂CH₂), 1.70-1.52 (m, 3 H, Leu- β -CH₂, Leu- γ -CH), 0.91, 0.98 (je d, 6 H, Leu- δ -CH₃, Leu- δ' -CH₃, ³J = 2.5 Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$: (CDCl_3 , 75 MHz), δ [ppm] = 172.54, 170.22 (CO), 135.51 (Ar- C_q), 128.60, 128.38, 128.23 (Ar-CH), 71.53 ($\text{H}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2$), 71.09 ($\text{H}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2$), 70.28 (COCH_2O), 66.98 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 59.01 ($\text{H}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2$), 50.37 (Leu- α -CH), 41.11 (Leu- β -CH), 24.81 (Leu- γ -CH), 22.91 (Leu- δ -CH), 21.76 (Leu- δ' -CH).

N-2-(2-Methoxyethoxy)acetyl)-(S)-Isoleucinbenzylester



Laborkürzel: PF273.106A
 Bezeichnung: GlycAc-(S)-Ile-OBn
 Molekularmasse: 337.41 g/mol

Methode: 11a.

Ansatz: 5.00 g, 12.7 mmol (1.0 Äq.) (S)-Ile-OBn * *p*-TosOH;
 1.70 g, 12.7 mmol (1.0 Äq.) 2-(2-Methoxyethoxy)essigsäure;
 2.69 g, 26.6 mmol (2.1 Äq.) NMM;
 2.75 g, 13.3 mmol (1.05 Äq.) DCC;
 50 ml THF.

R_f: 0.19 (Petrolether/Ethylacetat [1:1]).

SC: Dichlormethan/Methanol [99:1].

Ausbeute: 3.01 g, 8.97 mmol, 70 %, farbloses Öl.

ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_5$, 337.19; gef.: 338.23 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 360.17 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2962 (m), 2929 (s), 2876 (m), 1736 (s), 1674 (s), 1515 (s), 1454 (m), 1384 (w), 1335 (w), 1192 (m), 1102 (s), 1021 (w), 747 (w), 698 (m).

$[\alpha]_D^{24}$ °C: +1.66 ° (c = 0.6, CHCl_3).

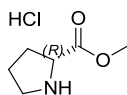
$^1\text{H-NMR}$: (CDCl_3 , 300 MHz), δ [ppm] = 7.40-7.27 (m, 5 H, Ar-CH), 5.19, 5.12 (je d, 2 H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$, $^2J = 12.2$ Hz), 4.64 (dd, 1 H, Ile- α -CH, $^3J = 9.0$, 5.1 Hz), 4.06, 3.97 (je d, 2 H, COCH_2O , $^2J = 16.0$ Hz), 3.73-3.58 (m, 3 H, $\text{H}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2 + \text{NH}$), 3.53 (t, 2 H, $\text{H}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2$, $^3J = 4.3$ Hz), 3.36 (s,

3 H, $H_3COCH_2CH_2$), 2.02-1.85 (m, 1 H, Ile- β -CH), 1.48-1.28 (m, 1 H, Ile- γ_1 - CH_2), 1.27-1.08 (m, 1 H, Ile- γ_1' - CH_2), 0.96-0.79 (m, 6 H, Ile- γ_2 - CH_3 , Ile- δ - CH_3).

^{13}C -NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 171.56, 170.22 (CO), 135.50 (Ar-C_q), 128.64, 128.46, 128.43 (Ar-CH), 71.57 ($H_3COCH_2CH_2$), 71.24 ($H_3COCH_2CH_2$), 70.41 (COCH₂O), 66.96 (CO₂CH₂Ph), 59.11 ($H_3COCH_2CH_2$), 56.19 (Ile- α -CH), 37.73 (Ile- β -CH), 25.04 (Ile- γ_1 -CH₂), 15.61 (Ile- γ_2 -CH₃), 11.64 (Ile- δ -CH₃).

10.2.1.3 C-geschützte Aminosäuren

(R)-Prolinmethylester * Hydrochlorid



Laborkürzel: PF188.66A
 Bezeichnung: (R)-Pro-OMe * HCl
 Molekularmasse: 165.62 g/mol

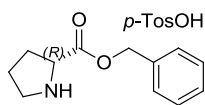
Methode: 8.

Ansatz: 10.0 g, 86.8 mmol (1.0 Äq.) (R)-Prolin;
 13.4 g, 112 mmol (1.3 Äq.) Thionylchlorid;
 100 ml Methanol.

Ausbeute: 14.3 g, 86.8 mmol, > 99 %, farbloses Öl.

1H -NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 4.51 (s, 1 H, Pro- α -CH), 3.85 (s, 3 H, OCH₃), 3.66-3.49 (m, 2 H, Pro- δ -CH₂), 2.49-2.37 (m, 1 H, Pro- β' -CH₂), 2.15-2.01 (m, 3 H, Pro- β -CH₂, Pro- γ -CH₂).

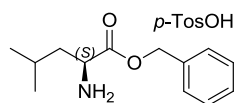
Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.²⁰⁴

(R)-Prolinbenzylester * *para*-Tosylat

Laborkürzel: PF045.20A
 Bezeichnung: (R)-Pro-OBn * *p*-TosOH
 Molekularmasse: 377.45 g/mol

- Methode: 6.
- Ansatz: 17.2 g, 150 mmol (1 Äq.) (R)-Prolin;
 63.2 g, 585 mmol (3.9 Äq.) Benzylalkohol;
 29.1 g, 153 mmol (1.02 Äq.) *para*-Toluolsulfonsäure * Monohydrat;
 250 ml Toluol.
- R_f: 0.01 (Cyclohexan/Ethylacetat [1:1]).
- SC: Cyclohexan/Ethylacetat [1:1] → Ethylacetat.
- Ausbeute: 42.7 g, 113 mmol, 75 %, orangefarbenes Öl.
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 9.30 (br s, 2 H, +NH₂), 7.74 (d, 2 H, 2 x Tos-Ar-ortho-CH, ³J = 8.0 Hz), 7.34-7.26 (m, 5 H, Ar-CH), 7.14 (d, 2 H, 2 x Tos-Ar-meta-CH, ³J = 8.0 Hz), 5.16, 5.08 (je d, 2 H, CO₂CH₂Ph, ²J = 12.1 Hz), 4.54 (dd, 1 H, Pro-α-CH, ³J = 8.5, 6.2 Hz), 3.56-3.41 (m, 2 H, Pro-δ-CH₂), 2.33 (s, 3 H, Tos-CH₃), 2.13-1.79 (m, 4 H, Pro-β-CH₂, Pro-γ-CH₂).

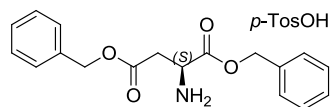
Die analytischen Daten sind, mit Ausnahme des Drehwerts, vergleichbar mit den Literaturangaben von (S)-Pro-OBn * *p*-TosOH.²⁰⁵

(S)-Leucinbenzylester * para-Tosylat

Laborkürzel: PF279.111A
 Bezeichnung: (S)-Leu-OBn * *p*-TosOH
 Molekularmasse: 393.50 g/mol

- Methode: 6.
- Ansatz: 3.00 g, 22.8 mmol (1 Äq.) (S)-Leucin;
 9.46 g, 89.1 mmol (3.9 Äq.) Benzylalkohol;
 4.43 g, 23.3 mmol (1.02 Äq.) *para*-Toluolsulfonsäure * Monohydrat;
 250 ml Toluol.
- R_f: 0.01 (Cyclohexan/Ethylacetat [1:1]).
- Ausbeute: 8.91 g, 22.6 mmol, > 99 %, gelbliches Öl.
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 8.26 (br s, ⁺NH₃), 7.74 (d, 2 H, 2 x Tos-Ar-*ortho*-CH, ³J = 7.8 Hz), 7.32-7.27 (m, 5 H, Ar-CH), 7.09 (d, 2 H, 2 x Tos-Ar-*meta*-CH, ³J = 7.8 Hz), 5.12, 5.05 (je d, 2 H, CO₂CH₂Ph, ²J = 12.2 Hz), 4.00-3.87 (m, Leu-α-CH), 2.31 (s, 3 H, Tos-CH₃), 1.75-1.59 (m, 3 H, Leu-β-CH₂, Leu-γ-CH), 0.77, 0.75 (je d, 6 H, Leu-δ-CH₃, Leu-δ'-CH₃, ³J = 3.7 Hz).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.²⁰⁶

(S)-Asparaginsäuredibenzylester * para-Tosylat

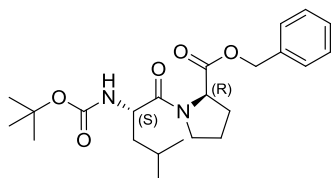
Laborkürzel: PF145.62A
 Bezeichnung: (S)-Asp-(OBn)₂ * *p*-TosOH
 Molekularmasse: 485.55 g/mol

- Methode: 6.
- Ansatz: 15.0 g, 112 mmol (1 Äq.) (S)-Asparaginsäure;
 47.2 g, 436 mmol (3.9 Äq.) Benzylalkohol;
 21.7 g, 114 mmol (1.02 Äq.) *para*-Toluolsulfonsäure Monohydrat;
 100 ml Benzol.
- R_f: 0.01 (Cyclohexan/Ethylacetat [1:1]).
- Ausbeute: 40.3 g, 82.9 mmol, 74 %, farbloser Feststoff.
- Enantiom.-verhältnis: 1:0.4 (bestimmt über ¹H-NMR-Spektrum anhand der Signale für den Asp-α-CH).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 8.36-8.18 (br s, +NH₃), 7.70 (d, 2 H, 2 x Tos-Ar-ortho-CH, ³J = 8.2 Hz), 7.28-7.12 (m, 10 H, Ar-CH), 7.02 (d, 2 H, 2 x Tos-Ar-meta-CH, ³J = 8.2 Hz), 5.02, 4.97 (je d, 2 H, CO₂CH₂Ph, ²J = 11.7 Hz), 4.90, 4.86 (je d, 2 H, CO₂CH₂Ph, ²J = 12.3 Hz), 4.47 (dd, 1 H, Asp-α-CH, ³J = 10.1, 5.2 Hz), 3.09 (dd, 2 H, CH₂CHN, ²J = 24.9, ³J = 5.1 Hz), 2.26 (s, 3 H, Tos-CH₃).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.²⁰⁷

10.2.2 Dipeptide

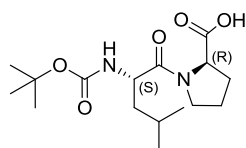
10.2.2.1 Boc-geschützte Dipeptide

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-(*R*)-prolinbenzylester**

Laborkürzel: PF125.19C
 Bezeichnung: Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn
 Molekularmasse: 418.53 g/mol

- Methode: 4a.
- Ansatz: 11.7 g, 46.8 mmol (1 Äq.) Boc-(*S*)-Leu-OH;
 17.7 g, 46.8 mmol (1 Äq.) (*R*)-Pro-OH * *p*-TosOH;
 10.3 g, 102 mmol (2.0 Äq.) NMM;
 10.2 g, 49.2 mmol (1.05 Äq.) DCC;
 6.33 g, 46.8 mmol (1.0 Äq.) HOBT;
 120 ml THF.
- R_f: 0.48 (Cyclohexan/Ethylacetat [1/1]).
- SC: Cyclohexan/Ethylacetat [3/1].
- Ausbeute: 11.2 g, 26.7 mmol, 59 % gelbe Flüssigkeit.
- Epimerenverhältnis: 1:0.2 (bestimmt über ¹H-NMR-Spektrum anhand der Signale für die Leu- δ -CH₃).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.42-7.27 (m, 5 H, Ar-CH), 5.24-5.16 (m, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.62-4.41 (m, 2 H, Pro- α -CH + Leu- α -CH), 3.92-3.70 (m, 1 H, Pro- δ -CH₂), 3.63-3.46 (m, 1 H, Pro- δ' -CH₂), 2.26-1.93 (m, 4 H, Pro- β -CH₂, Pro- γ -CH₂, Leu- γ -CH), 1.77-1.65 (m, 1H, Pro- γ' -CH₂), 1.54-1.40 (m, 11 H, C(CH₃)₃, Leu- β -CH₂), 0.99 (d, 3 H, Leu- δ -CH₃, ³J = 6.6 Hz), 0.93 (d, 3 H, Leu- δ' -CH₃, ³J = 6.6 Hz).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^{101,208}

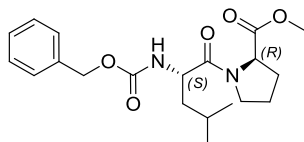
***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-(*R*)-prolin**

Laborkürzel: PF068.4B
 Bezeichnung: Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OH
 Molekularmasse: 328.20 g/mol

- Methode: 7.
- Ansatz: 2.00 g, 4.78 mmol (1 Äq.) Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OBn;
 400 mg, Pd/C 10%;
 20 ml Methanol.
- Ausbeute: 1.32 g, 4.04 mmol, 84 %, farbloser Feststoff.
- Epimerenverhältnis: 1:0.36 (bestimmt über ¹H-NMR-Spektrum anhand der Signale für die Leu- δ -CH₃).
- Smp: 59 °C. Lit.: 52-53 °C.¹⁰¹
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 5.07 (br s, 1 H, NH), 4.60–4.43 (m, 2 H, Pro- α -CH, Leu- α -CH), 3.96–3.84 (m, 1 H, Pro- δ -CH₂), 3.53–3.43 (m, 1 H, Pro- δ' -CH₂), 2.58-2.49 (m, 1 H, Pro- β -CH₂), 2.15–1.89 (m, 4 H, Pro- β' -CH₂, Pro- γ -CH₂, Leu- β -CH₂), 1.76–1.68 (m, 1 H, Leu- β' -CH₂), 1.59–1.53 (m, 1 H, Leu- γ -CH) (m, 9 H, C(CH₃)₃), 0.98 (d, 3 H, Leu- δ -CH₃, ³J = 6.6 Hz), 0.94 (d, 3 H, Leu- δ' -CH₃, ³J = 6.7 Hz).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.¹⁰¹

10.2.2.2 Cbz-geschützte Dipeptide

***N*-(Benzyloxycarbonyl)-(S)-leucyl-(R)-prolinmethylester**

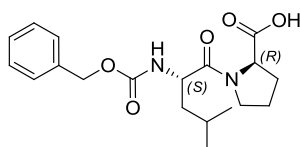
Laborkürzel: PF198.73A
 Bezeichnung: Cbz-(S)-Leu-(R)-Pro-OMe
 Molekularmasse: 376.45 g/mol

- Methode: 4a.
- Ansatz: 1.00 g, 3.77 mmol (1.0 Äq.) Cbz-(S)-Leu-OH;
 624 mg, 3.77 mmol (1.0 Äq.) (R)-Prolinmethylester * HCl;
 763 mg, 7.54 mmol (2.0 Äq.) NMM;
 817 mg, 3.96 mmol (1.05 Äq.) DCC;
 509 mg, 3.77 mmol (1.0 Äq.) HOBt;
 25 ml THF.
- R_f: 0.45 (Petrolether/Ethylacetat [1:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [1:1].
- Ausbeute: 574 mg, 1.52 mmol, 40 %, farbloses Öl.
- Epimerenverhältnis: 1:0.3 (bestimmt über ¹³C-NMR-Spektrum anhand der Signale für den Carbamat-C NHCO₂).
- ESI-MS: ber. f. C₂₀H₂₈N₂O₅, 376.20; gef.: 377.22 [M+H]⁺, 399.17 [M+Na]⁺, 415.17 [M+K]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3321 (m), 2953 (s), 1715 (s), 1638 (s), 1531 (m), 1433 (s), 1241 (m), 1164 (s), 1119 (w), 1041 (m), 735 (m), 698 (m).
- [α]_D^{24 °C}: -24.4 ° (c = 0.45, CHCl₃).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.40-7.22 (m, 5 H, Ar-CH), 5.61 (d, 1 H, NH, ³J = 8.4 Hz), 5.06 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.57 (td, 1 H, Leu- α -CH, ³J = 9.3, 4.2 Hz), 4.39 (dd, 1 H, Pro- α -CH, ³J = 8.2, 2.8 Hz), 3.84 (dd, 1 H, Pro- δ -CH₂, ³J = 10.3, 5.0 Hz), 3.76-3.61 (m, 3 H, CO₂CH₃), 3.53 (dd, 1 H, Pro- δ' -CH₂, ²J = 13.1, ³J = 6.8 Hz), 2.29-1.78 (m, 4 H, Pro- γ -CH₂,

Pro- β -CH₂), 1.77-1.31 (m, 3 H, Leu- β -CH₂, Leu- γ -CH), 1.02-0.76 (m, 6 H, Leu- δ -CH₃, Leu- δ' -CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 172.29, 171.32 (CO), 156.10 (NHCO₂), 136.45 (Ar-C_q), 128.45, 128.00, 127.89 (Ar-CH), 66.76 (CO₂CH₂Ph), 59.04 (Pro- α -CH), 52.23 (CO₂CH₃), 50.95 (Leu- α -CH), 46.82 (Pro- δ -CH₂), 42.51 (Leu- β -CH₂), 29.09 (Pro- β -CH₂), 24.65 (Pro- γ -CH₂), 24.52 (Leu- γ -CH), 23.39 (Leu- δ -CH₃), 21.87 (Leu- δ' -CH₃).

***N*-(Benzyloxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-(*R*)-prolin**



Laborkürzel: PF203.76A
 Bezeichnung: Cbz-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OH
 Molekularmasse: 362.42 g/mol

Methode: 9.

Ansatz: 574 mg, 1.52 mmol (1.0 Äq.) Cbz-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OMe;

67.2 mg, 1.60 mmol (1.1 Äq.) Lithiumhydroxid * H₂O;

160 ml Wasser/Tetrahydrofuran [1:1].

Ausbeute: 523 mg, 1.44 mmol, 95 %, farbloses Öl.

Epimerenverhältnis: 1:0.45 (bestimmt über ¹³C-NMR-Spektrum anhand der Signale für Pro- α -CH).

ESI-MS: ber. f. C₁₉H₂₆N₂O₅, 362.18; gef.: 363.24 [M+H]⁺, 385.19 [M+Na]⁺, 747.42 [2M+Na]⁺.

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3301 (m), 2949 (s), 2925 (w), 2868 (w), 1711 (s), 1527 (m), 1450 (s), 1331 (w), 1249 (s), 1209 (w), 1037 (m), 910 (w), 735 (m), 698 (m).

[α]_D^{24 °C}: -55.5 ° (c = 0.9, CHCl₃).

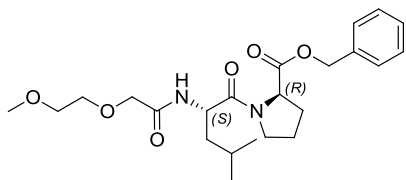
¹H-NMR: (MeOD, 300 MHz), δ [ppm] = 7.41-7.18 (m, 5 H, Ar-CH), 5.04, 5.02 (je s, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.95 (dd, 1 H, NH, ³J = 8.3, 2.3 Hz), 4.51 (dd, 1 H, Leu- α -CH, ³J = 10.0, 4.5 Hz), 4.37-4.27 (m, 1 H, Pro- α -CH), 3.88-3.74 (m, 1 H, Pro- δ -CH₂), 3.60-3.41 (dd, 1 H, Pro- δ' -CH₂, ²J = 13.1, ³J = 6.8

Hz), 2.35-1.77 (m, 4 H, Pro- γ -CH₂, Pro- β -CH₂), 1.73-1.31 (m, 3 H, Leu- β -CH₂, Leu- γ -CH), 0.98-0.74 (m, 6 H, Leu- δ -CH₃, Leu- δ' -CH₃).

¹³C-NMR: (MeOD, 75 MHz), δ [ppm] = 175.35, 173.43 (CO), 158.33 (NHCO₂), 138.25 (Ar-C_q), 129.46, 128.97, 128.80 (Ar-CH), 67.65 (CO₂CH₂Ph), 60.70 (Pro- α -CH), 52.51 (Leu- α -CH), 47.88 (Pro- δ -CH₂), 41.91 (Leu- β -CH₂), 30.15 (Pro- β -CH₂), 25.81, 25.66 (Pro- γ -CH₂, Leu- γ -CH), 23.62 (Leu- δ -CH₃), 21.93 (Leu- δ' -CH₃).

10.2.2.3 GlycAc-geschützte Dipeptide

N-(2-(2-Methoxyethoxy)acetyl)-(S)-leucyl-(R)-prolinbenzylester



Laborkürzel: PF310.134B
 Bezeichnung: GlycAc-(S)-Leu-(R)-Pro-OBn
 Molekularmasse: 434.53 g/mol

Methode: 4a.

Ansatz: 720 mg, 2.91 mmol (1.0 Äq.) GlycAc-(S)-Leu-OH;
 1.10 g, 2.91 mmol (1.0 Äq.) (R)-Pro-OBn * *p*-TosOH;
 590 mg, 5.82 mmol (2.0 Äq.) NMM;
 631 mg, 3.06 mmol (1.05 Äq.) DCC;
 394 mg, 2.91 mmol (1.0 Äq.) HOBt;
 25 ml THF.

R_f: 0.11 (Petrolether/Ethylacetat [1:1]).

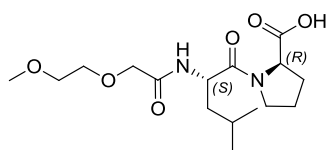
SC: Dichlormethan/Methanol [99:1].

Ausbeute: 277 mg, 637 μ mol, 21 %, farbloses Öl.

Epimerenverhältnis: 1:0.4 (bestimmt über ¹H-NMR-Spektrum anhand der Signale für Leu- α -CH).

ESI-MS:	ber. f. $C_{23}H_{34}N_2O_6$, 434.24; gef.: 435.25 $[M+H]^+$, 457.22 $[M+Na]^+$, 891.50 $[2M+Na]^+$.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ $[cm^{-1}]$ = 2953 (m), 2872 (m), 1740 (m), 1642 (s), 1519 (m), 1429 (m), 1380 (w), 1335 (w), 1274 (w), 1160 (m), 1098 (m), 738 (w), 698 (w).
$[\alpha]_D^{25}$ °C:	+3.0 ° (c = 1.0, $CHCl_3$).
1H -NMR:	($CDCl_3$, 300 MHz), δ [ppm] = 7.39 (d, 1 H, NH , $^3J = 9.0$ Hz), 7.34-7.17 (m, 5 H, Ar- CH), 5.19-4.96 (m, 2 H, CO_2CH_2Ph), 4.94-4.66 (m, 1 H, Leu- α - CH), 4.57-4.35 (m, 1 H, Pro- α - CH), 4.01-3.83 (m, 2 H, $COCH_2O$), 3.66-3.42 (m, 5 H, $H_3COCH_2CH_2$, NH , Pro- δ - CH_2), 3.36-3.28 (m, 3 H, $H_3COCH_2CH_2$), 2.29-1.72 (m, 4 H, Pro- γ - CH_2 , Pro- β - CH_2), 1.70-1.30 (m, 3 H, Leu- β - CH_2 , Leu- γ - CH), 0.97-0.65 (m, 6 H, Leu- δ - CH_3 , Leu- δ' - CH_3).
^{13}C -NMR:	($CDCl_3$, 75 MHz), δ [ppm] = 171.42, 170.62, 169.35 (CO), 135.48 (Ar- C_q), 128.33, 127.96, 127.69 (Ar- CH), 71.34 ($H_3COCH_2CH_2$), 70.79 ($H_3COCH_2CH_2$), 70.17 ($COCH_2O$), 66.48 (CO_2CH_2Ph), 58.91 (Pro- α - CH), 58.78 ($H_3COCH_2CH_2$), 48.15 (Leu- α - CH), 46.73 (Pro- δ - CH_2), 41.65 (Leu- β - CH_2), 28.87 (Pro- β - CH_2), 24.43 (Leu- γ - CH , Pro- γ - CH_2), 23.13 (Leu- δ - CH), 21.73 (Leu- δ' - CH).

***N*-(2-(2-Methoxyethoxy)acetyl)-(S)-leucyl-(R)-prolin**

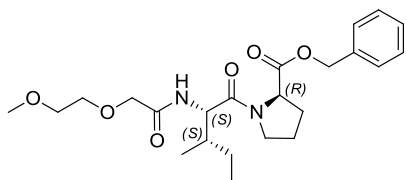


Laborkürzel:	PF379.139A
Bezeichnung:	GlycAc-(S)-Leu-(R)-Pro-OBn
Molekularmasse:	344.40g/mol

Methode:	7.
Ansatz:	342 mg, 787 μ mol (1.0 Äq.) GlycAc-(S)-Leu-(R)-Pro-OBn; 60.0 mg, Pd/C; 5 ml Methanol.
Ausbeute:	270 mg, 784 μ mol, 99 %, gelbliches Öl.
Epimerenverhältnis:	1:0.6 (bestimmt über 1H -NMR-Spektrum anhand der Signale für den terminalen Kohlenstoff an $H_3COCH_2CH_2$).

ESI-MS:	ber. f. $C_{16}H_{28}N_2O_6$, 344.19; gef.: 367.22 $[M+Na]^+$, 383.27 $[M+Ka]^+$, 711.57 $[2M+Na]^+$.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ $[cm^{-1}]$ = 3313 (s), 2925 (s), 2847 (s), 1625 (s), 1564 (w), 1535 (w), 1433 (m), 1307 (m), 1241 (m), 1184 (w), 1082 (m), 886 (w), 837 (w).
$[a]_D^{25}$ °C:	+14.13 ° (c = 1.5, $CHCl_3$).
1H -NMR:	(MeOD, 300 MHz), δ [ppm] = 4.81 (dd, 1 H, Leu- α -CH, 3J = 8.0, 2.9 Hz), 4.69-4.58 (m, 1 H, Pro- α -CH), 4.00 (s, 2 H, $COCH_2O$), 3.75-3.44 (m, 5 H, $H_3COCH_2CH_2$, NH, Pro- δ - CH_2), 3.42 (s, 3 H, $H_3COCH_2CH_2$), 2.32-1.79 (m, 4 H, Pro- γ - CH_2 , Pro- β - CH_2), 1.78-1.41 (m, 3 H, Leu- β - CH_2 , Leu- γ -CH), 0.99-0.89 (m, 6 H, Leu- δ - CH_3 , Leu- δ' - CH_3).
^{13}C -NMR:	(MeOD, 75 MHz), δ [ppm] = 173.31, 172.46, 170.11 (CO), 72.70 ($H_3COCH_2CH_2$), 71.93 ($H_3COCH_2CH_2$), 70.87 ($COCH_2O$), 63.17 (Pro- α -CH), 59.20 ($H_3COCH_2CH_2$), 50.39 (Leu- α -CH), 47.94 (Pro- δ - CH_2), 40.79 (Leu- β - CH_2), 30.61 (Pro- β - CH_2), 26.06 (Leu- γ -CH), 25.66 (Pro- γ - CH_2), 23.94 (Leu- δ -CH), 21.48 (Leu- δ' -CH).

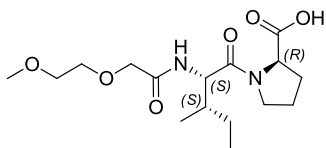
***N*-(2-(2-Methoxyethoxy)acetyl)-(S)-isoleucyl-(R)-prolinbenzylester**



Laborkürzel:	PF299.127A
Bezeichnung:	GlycAc-(S)-Ile-(R)-Pro-OBn
Molekularmasse:	434.53 g/mol

Methode:	4a.
Ansatz:	700 mg, 2.83 mmol (1.0 Äq.) GlycAc-(S)-Ile-OBn; 1.07 g, 2.83 mmol (1.0 Äq.) (R)-Pro-OBn * <i>p</i> -TosOH; 573 mg, 5.66 mmol (2.0 Äq.) NMM; 614 mg, 2.97 mmol (1.05 Äq.) DCC; 383 mg, 2.83 mmol (1.0 Äq.) HOBt; 25 ml THF.
R _f :	0.44 (Dichlormethan/Methanol [9:1]).

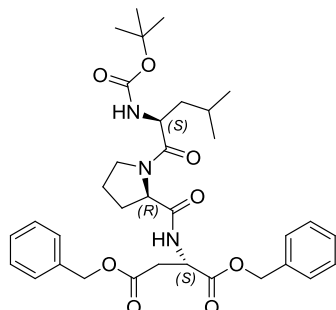
SC:	Dichlormethan/Methanol [99:1].
Ausbeute:	287 mg, 639 μmol , 22 %, gelbliches Öl.
Epimerenverhältnis:	1:0.5 (bestimmt über ^{13}C -NMR-Spektrum anhand der Signale für den Benzyl-C $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$).
ESI-MS:	ber. f. $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_6$, 434.24; gef.: 435.28 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 457.23 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 473.22 $[\text{M}+\text{K}]^+$.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2970 (w), 2930 (w), 2872 (w), 1748 (m), 1638 (s), 1515 (m), 1515 (m), 1429 (s), 1339 (w), 1164 (s), 1102 (m), 1017 (w), 845 (w), 694 (m).
$[\alpha]_D^{24 \text{ }^\circ\text{C}}$:	-6.0 $^\circ$ (c = 0.5, CHCl_3).
$^1\text{H-NMR}$:	(CDCl_3 , 300 MHz), δ [ppm] = 7.43-7.27 (m, 5 H, Ar-CH), 5.26-5.03 (m, 2 H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 4.79-4.37 (m, 2 H, Ile- α -CH, Pro- α -CH), 4.11-3.82 (m, 3 H, COCH_2O , NH), 3.75-3.48 (m, 6 H, $\text{H}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2$, $\text{H}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2$, Pro- δ - CH_2), 3.43-3.34 (m, 3 H, $\text{H}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2$), 2.24-1.72 (m, 5 H, Pro- γ - CH_2 , Pro- β - CH_2 , Ile- β -CH), 1.65-1.44 (m, 1 H, Ile- γ_1 - CH_2), 1.20-1.05 (m, 1 H, Ile- γ_1' - CH_2), 0.94-0.82 (m, 6 H, Ile- γ_2 - CH_3 , Ile- δ - CH_3).
$^{13}\text{C-NMR}$:	(CDCl_3 , 75 MHz), δ [ppm] = 171.67, 170.45, 169.85 (CO), 135.79 (Ar- C_q), 128.63, 128.26, 127.94 (Ar-CH), 71.63 ($\text{H}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2$), 71.16 ($\text{H}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2$), 70.52 (COCH_2O), 66.74 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 59.14 ($\text{H}_3\text{COCH}_2\text{CH}_2$), 59.00 (Pro- α -CH), 54.38 (Ile- α -CH), 47.43 (Pro- δ - CH_2), 37.51 (Ile- β -CH), 29.25 (Pro- β - CH_2), 24.67 (Pro- γ - CH_2), 24.42 (Ile- γ_1 - CH_2), 15.65 (Ile- γ_2 - CH_3), 11.23 (Ile- δ - CH_3).

N-(2-(2-Methoxyethoxy)acetyl)-(S)-isoleucyl-(R)-prolin

Laborkürzel: PF323.139A
 Bezeichnung: GlycAc-(S)-Ile-(R)-Pro-OH
 Molekularmasse: 344.40 g/mol

- Methode: 7.
- Ansatz: 277 mg, 637 μmol (1.0 Äq.) GlycAc-(S)-Ile-(R)-Pro-OBn;
 65.0 mg, Pd/C;
 5 ml Methanol.
- Ausbeute: 179 mg, 520 μmol , 98 %, gelbliches Öl.
- Epimerenverhältnis: 1:0.4 (bestimmt über ^{13}C -NMR-Spektrum anhand der Signale für Pro- α -CH).
- ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$, 344.19; gef.: 367.22 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 711.62 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2962 (w), 2933 (w), 2876 (w), 1638 (s), 1527 (m), 1450 (m), 1380 (w), 1188 (w), 1139 (w), 1098 (w), 1021 (w).
- $[\alpha]_D^{21}$ °C: -2.6 ° (c = 1.0, MeOH).
- ^1H -NMR: (MeOD, 300 MHz), δ [ppm] = 4.67-4.46 (m, 1 H, Ile- α -CH), 4.45-4.18 (m, 1 H, Pro- α -CH), 3.99, 3.96 (je s, 2 H, COCH₂O), 3.93-3.78 (m, 1 H, Pro- δ -CH₂), 3.72-3.48 (m, 6 H, H₃COCH₂CH₂, H₃COCH₂CH₂, Pro- δ' -CH₂, NH), 3.33 (m, 2 H, H₃COCH₂CH₂), 2.26-1.74 (m, 5 H, Pro- γ -CH₂, Pro- β -CH₂, Ile- β -CH), 1.63-1.44 (m, 1 H, Ile- γ_1 -CH₂), 1.17-1.03 (m, 1 H, Ile- γ_1' -CH₂), 0.93-0.73 (m, 6 H, Ile- γ_2 -CH₃, Ile- δ -CH₃).
- ^{13}C -NMR: (MeOD, 75 MHz), δ [ppm] = 173.88 (Pro-CO), 172.30, 172.04 (CO), 72.64 (H₃COCH₂CH₂), 71.95 (H₃COCH₂CH₂), 70.86 (COCH₂O), 60.32 (Pro- α -CH), 59.21 (H₃COCH₂CH₂), 55.95 (Ile- α -CH), 47.78 (Pro- δ -CH₂), 38.23 (Ile- β -CH), 30.05 (Pro- β -CH₂), 25.52 (Pro- γ -CH₂), 25.44 (Ile- γ_1 -CH₂), 15.83 (Ile- γ_2 -CH₃), 11.22 (Ile- δ -CH₃).

10.3 Tripeptide

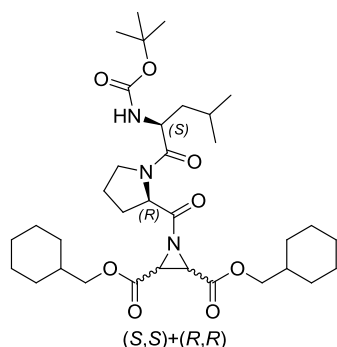
***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-(*R*)-prolyl-(*S*)-asparaginsäuredibenzylester**

Laborkürzel: PF128.61A
 Bezeichnung: Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*S*)-
 Asp(OBn)₂
 Molekularmasse: 623.74 g/mol

- Methode: 4a.
- Ansatz: 389 mg, 800 μ mol (1.0 Äq.) (*S*)-Asparaginsäuredibenzylester * *para*-Tosylat;
 263 mg, 800 μ mol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OH;
 162 mg, 1.60 mmol (2.0 Äq.) NMM;
 174 mg, 840 μ mol (1.05 Äq.) DCC;
 108 mg, 800 μ mol (1.0 Äq.) HOBT;
 10 ml THF.
- R_f: 0.25 (Cyclohexan/Ethylacetat [1:1]).
- SC: Cyclohexan/Ethylacetat [1:1].
- Ausbeute: 572 mg, 451 μ mol, 56 %, farbloses Öl.
- HPLC (a): R_t = 21.99 min (Methode A), Reinheit > 99 %.
- Epimerenverhältnis: 1:0.2 (bestimmt über ¹³C-NMR-Spektrum anhand der Signale für die *tert*-Butyl-Gruppe an C(CH₃)₃).
- ESI-MS: ber. f. C₃₄H₄₅N₃O₈, 623.3; gef.: 624.37 [M+H]⁺, 646.30 [M+Na]⁺, 1269.67 [2M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2949 (m), 1736 (s), 1683 (s), 1634 (s), 1515 (m), 1450 (m), 1384 (w), 1364 (w), 1245 (w), 1160 (s), 1041 (w), 1008 (w), 755 (m).

- $[\alpha]_D^{24}$: +27.7 ° (c = 1.5, CHCl₃).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.55 (d, 1 H, Asp-NH, ³J = 7.9 Hz), 7.38-7.27 (m, 10 H, Ar-CH), 5.17 (d, 1 H, Leu-NH, ³J = 8.3 Hz), 5.14-5.08 (m, 2 H, CO₂CH₂Ph), 5.08-5.03 (m, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.88 (m, 1 H, Asp-α-CH), 4.57-4.48 (m, 1 H, Pro-α-CH), 4.40 (dt, 1 H, Leu-α-CH, ³J = 8.8, 4.9 Hz), 3.70-3.56 (m, 1 H, Pro-δ-CH₂), 3.40 (m, 1 H, Pro-δ'-CH₂), 2.98, 2.89 (je dd, 2 H, Asp-β-CH₂, ²J = 16.7, ³J = 5.1 Hz), 2.26 (m, 1 H, Pro-β-CH₂), 2.03-1.80 (m, 4 H, Pro-β'-CH₂, Pro-γ-CH₂, Leu-γ-CH), 1.77-1.63 (m, 1 H, Leu-β-CH₂), 1.41 (s, 10 H, Leu-β'-CH₂, C(CH₃)₃), 0.97 (d, 3 H, Leu-δ-CH₃, ³J = 6.5 Hz), 0.94 (d, 3 H, Leu-δ'-CH₃, ³J = 6.5 Hz).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 100 MHz), δ [ppm] = 172.30, 170.79, 170.31, 170.19 (CO), 155.70 (Boc-CO), 135.48, 135.24 (Ar-C_q), 128.51, 128.49, 128.36, 128.32, 128.27 (Ar-CH), 79.61 (C(CH₃)₃), 67.35 (CO₂CH₂Ph), 66.73 (CO₂CH₂Ph), 60.10 (Pro-α-CH), 50.64 (Leu-α-CH), 48.80 (Asp-α-CH), 46.76 (Pro-δ-CH₂), 41.56 (Leu-β-CH₂), 36.21 (Asp-β-CH), 30.88 (Pro-β-CH₂), 28.32 (C(CH₃)₃), 24.60 (Leu-γ-CH), 24.46 (Pro-γ-CH₂), 23.30 (Leu-δ-CH), 21.96 (Leu-δ'-CH).

10.3.1 Symmetrische Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Inhibitoren

(2S,2S)+(2R,3R)-Dicyclohexylmethyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(R)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat

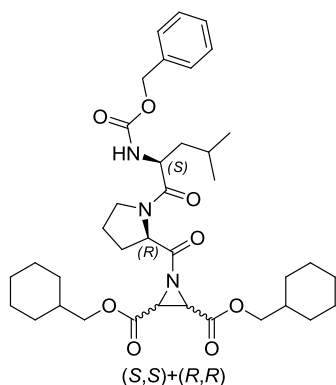
Laborkürzel: PF258.92A
 Bezeichnung: Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-
 (S,S)+(R,R)-Azi(OMeCy)₂
 Molekularmasse: 633.82 g/mol

- Methode: 5.
- Ansatz: 181 mg, 559 μmol (1.0 Äq.) (S,S)+(R,R)-Azi(OMeCy)₂;
 220 mg, 671 μmol (1.2 Äq.) Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-OH;
 1.06 g, 1.67 mmol (3.0 Äq.) PPA (50% in EA);
 10 ml EA.
- R_f: 0.25 (Petrolether/Diethylether [1:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- HPLC (p): R_t = 40.26 min (Methode P-IV).
- Ausbeute: 80.0 mg, 126 μmol , 22 %, farbloses Öl.
- HPLC (a): R_t = 30.73 min (Methode A), Reinheit 98 %.
- Epimerenverhältnis: 1:0.3 (bestimmt über ¹³C-NMR-Spektrum anhand der Signale für Pro- α -CH).
- ESI-MS: ber. f. C₃₄H₅₅N₃O₈, 633.82; gef.: 656.43 [M+Na]⁺, 1289.87 [2M-H+Na]⁺, 1290.89 [2M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2929 (m), 2843 (w), 1736 (s), 1711 (s), 1646 (s), 1499 (w), 1442 (w), 1327 (w), 1180 (s), 1123 (w), 1021 (w).
- [α]_D^{22 °C}: -2.0 ° (c = 0.5, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 5.31-5.12 (m, 1 H, NH), 4.60 (d, 1 H, Pro-α-CH, ³J = 6.3 Hz), 4.46 (t, 1 H, Leu-α-CH, ³J = 9.1), 4.07-3.87 (m, 4 H, 2 x CO₂CH₂Cy), 3.73 (m, 1 H, Pro-δ-CH₂), 3.65-3.39 (m, 3 H, Pro-δ'-CH₂, 2 x Azi-CH), 2.37-1.81 (m, 4 H, Pro-β-CH₂, Pro-γ-CH₂), 1.80-1.55 (m, 13 H, Leu-γ-CH, 4 x Cy-2-CH_{eq}H, 4 x Cy-3-CH_{eq}H, 2 x Cy-1-CH, 2 x Cy-4-CH_{eq}H), 1.54-1.32 (m, 11 H, Leu-β-CH₂, C(CH₃)₃), 1.32-1.05 (m, 6 H, 4 x Cy-3-CHH_{ax}, 2 x Cy-4-CHH_{ax}), 1.04-0.78 (m, 10 H, 4 x Cy-2-CHH_{ax}, Leu-δ-CH₃, Leu-δ'-CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 179.29 179.02 (Pro-CO), 172.14 171.48 (Leu-CO), 166.26 166.01 (Azi-CO), 155.71 155.48 (Boc-CO), 79.61 79.46 (C(CH₃)₃), 71.57 71.30 (CO₂CH₂Cy), 60.75 60.28 (Pro-α-CH), 50.37 50.21 (Leu-α-CH), 46.71 46.63 (Pro-δ-CH₂), 42.79 42.33 (Leu-β-CH₂), 40.65, 40.41, 40.12, 39.80 (Azi-CH), 36.93, 36.89 (Cy-1-CH), 29.54 (Cy-2-CH₂), 28.41, 28.34 (C(CH₃)₃, Pro-β-CH₂), 26.31 (Cy-4-CH₂), 25.62 (Cy-3-CH₂), 24.77, 24.73, 24.58, 24.42 (Leu-γ-CH, Pro-γ-CH₂), 23.57, 23.51 (Leu-δ-CH), 22.01, 21.78 (Leu-δ'-CH).

(2S,3S)+(2R,3R)-Dicyclohexylmethyl-1-[N-(benzyloxycarbonyl)-(S)-leucyl-(R)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat

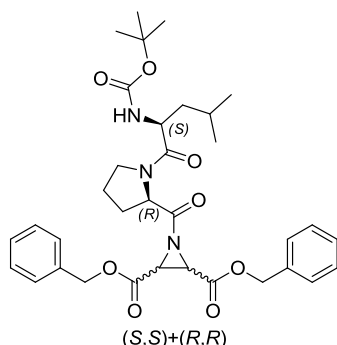


Laborkürzel: PF284.115A
 Bezeichnung: Cbz-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OMeCy)₂
 Molekularmasse: 667.83 g/mol

Methode: 5.

Ansatz: 41.0 mg, 126 μmol (1.0 Äq.) (S,S)+(R,R)-Azi(OMeCy)₂;
 54.7 mg, 151 μmol (1.2 Äq.) Cbz-(S)-Leu-(R)-Pro-OH;
 240 mg, 378 μmol (3.0 Äq.) PPA (50% in EA);
 5 ml EA.

R _f :	0.22 (Petrolether/Diethylether [1:1]).
SC:	Petrolether/Ethylacetat [9:1].
HPLC (p):	R _t = 24.67 min (Methode P-V).
Ausbeute:	13.0 mg, 19.4 μmol, 15 %, gelbliches Öl.
HPLC (a):	R _t = 29.91 min (Methode A), Reinheit > 99 %.
Epimerenverhältnis:	1:1 (bestimmt über ¹³ C-NMR-Spektrum anhand der Signale für Pro-α-CH).
ESI-MS:	ber. f. C ₃₇ H ₅₃ N ₃ O ₈ , 667.83; gef.: 690.41 [M+Na] ⁺ , 1358.87 [2M+Na] ⁺ .
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.40-7.28 (m, 5 H, Ar-CH), 5.55, 5.45 (je d, 1 H, NH, ³ J = 9.0 Hz), 5.21-5.00 (m, 2 H, CO ₂ CH ₂ Ph), 4.72, 4.64 (je d, 1 H, Pro-α-CH, ³ J = 5.4 Hz), 4.60-4.49 (m, 1 H, Leu-α-CH), 4.06-3.89 (m, 4 H, 2 x CO ₂ CH ₂ Cy), 3.86-3.69 (m, 1 H, Pro-δ-CH ₂), 3.69-3.44 (m, 3 H, Pro-δ'-CH ₂ , 2 x Azi-CH), 2.37-1.96 (m, 4 H, Pro-β-CH ₂ , Pro-γ-CH ₂), 1.96-1.81 (m, 1 H, Leu-γ-CH), 1.80-1.58 (m, 12 H, 4 x Cy-2-CH _{eq} H, 4 x Cy-3-CH _{eq} H, 2 x Cy-1-CH, 2 x Cy-4-CH _{eq} H), 1.55-1.37 (m, 2 H, Leu-β-CH ₂), 1.35-1.08 (m, 6 H, 4 x Cy-3-CHH _{ax} , 2 x Cy-4-CHH _{ax}), 1.05-0.80 (m, 10 H, 4 x Cy-2-CHH _{ax} , Leu-δ-CH ₃ , Leu-δ'-CH ₃).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 179.25, 178.93 (Pro-CO), 171.86, 171.18 (Leu-CO), 166.37, 166.33 (Azi-CO), 156.40, 156.18 (Cbz-CO), 136.59, 136.46 (Ar-C _q), 128.62, 128.58, 128.20, 128.11, 128.08, 128.04 (Ar-CH), 71.42 (CO ₂ CH ₂ Cy), 66.95 (CO ₂ CH ₂ Ph), 60.85, 60.38 (Pro-α-CH), 51.02, 50.89 (Leu-α-CH), 46.85, 46.76 (Pro-δ-CH ₂), 42.81, 42.26 (Leu-β-CH ₂), 40.49, 40.22 (Azi-CH), 36.95 (Cy-1-CH), 29.83 (Pro-β-CH ₂), 29.60 (Cy-2-CH ₂), 26.37 (Cy-4-CH ₂), 25.68 (Cy-3-CH ₂), 24.79, 24.62, 24.47 (Leu-γ-CH, Pro-γ-CH ₂), 23.61, 23.55 (Leu-δ-CH), 22.01, 21.79 (Leu-δ'-CH).

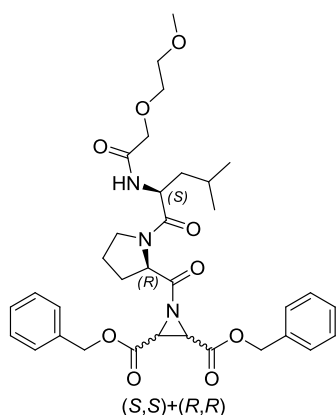
(2S,3S)+(2R,3R)-Dibenzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(R)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat

Laborkürzel: PF180.65A
 Bezeichnung: Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-
 (S,S)+(R,R)-Azi(OBn)₂
 Molekularmasse: 621.72 g/mol

- Methode: 5.
- Ansatz: 218 mg, 700 μ mol (1.0 Äq.) (S,S)+(R,R)-Azi(OBn)₂;
 275 mg, 840 μ mol (1.2 Äq.) Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-OH;
 1.33 g, 2.10 mmol (3.0 Äq.) PPA (50% in EA);
 10 ml EA.
- R_f: 0.17 (Petrolether/Diethylether [1:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- HPLC (p): R_t = 32.66 min (Methode P-I).
- Ausbeute: 255 mg, 410 μ mol, 58 %, farbloses Öl.
- HPLC (a): R_t = 22.90 min (Methode A), Reinheit > 99 %.
- Epimerenverhältnis: 1:1 (bestimmt über ¹H-NMR-Spektrum anhand der Signale für Pro- α -CH).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.44-7.30 (m, 10 H, Ar-CH), 5.29-5.09 (m, 5 H, CO₂CH₂Ph, NH), 4.75-4.67, 4.66-4.58 (je m, 1 H, Pro- α -CH), 4.56-4.43 (m, 1 H, Leu- α -CH), 3.86-3.41 (m, 4 H, Pro- δ -CH₂, 2 x Azi-CH), 2.30-2.07 (m, 4 H, Pro- β -CH₂, Pro- γ -CH₂), 1.79-1.64 (m, 1 H, Leu- γ -CH), 1.51-1.37 (m, 11 H, Leu- β -CH₂, C(CH₃)₃), 1.01-0.88 (m, 6 H, Leu- δ -CH₃, Leu- δ' -CH₃).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^{101,96,98,102}

(2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-Dibenzyl-1-[*N*-(2-methoxyethoxyacetyl)-(S)-leucyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat



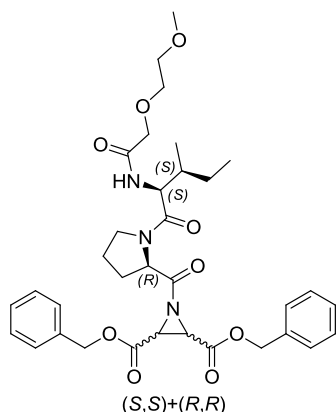
Laborkürzel: PF381.140B
 Bezeichnung: GlycAc-(S)-Leu-(*R*)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn)₂
 Molekularmasse: 637.72 g/mol

- Methode: 5.
- Ansatz: 70.0 mg, 224 μmol (1.0 Äq.) (S,S)+(R,R)-Azi(OBn)₂;
 93.0 mg, 269 μmol (1.2 Äq.) GlycAc-(S)-Leu-(*R*)-Pro-OH;
 430 mg, 674 μmol (3.0 Äq.) PPA (50% in EA);
 10 ml EA.
- R_f: 0.17 (Petrolether/Ethylacetat [1:1]).
- SC: Dichlormethan/Methanol [9:1].
- HPLC (p): R_t = 45.31 min (Methode P-IIb).
- Ausbeute: 10.0 mg, 15.6 μmol , 7 %, farbloses Öl.
- HPLC (a): R_t = 19.79 min (Methode A), Reinheit 96 %.
- Epimerenverhältnis: 1:0.6 (bestimmt über ¹³C-NMR-Spektrum anhand der Signale für Pro-β-CH₂).
- ESI-MS: ber. f. C₃₄H₄₃N₃O₉, 637.72; gef.: 660.26 [M+Na]⁺, 676.25 [M+K]⁺, 1297.58 [2M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2908 (m), 2847 (w), 1744 (s), 1646 (s), 1527 (w), 1446 (m), 1266 (w), 1184 (s), 1135 (s), 755 (m), 690 (s).
- [α]_D^{23 °C}: -4.6 ° (c = 0.3, CHCl₃).

¹H-NMR: (CD₂Cl₂, 300 MHz), δ [ppm] = 7.46-7.30 (m, 10 H, Ar-CH), 5.26-5.14 (m, 4 H, 2 x CO₂CH₂Ph), 4.89-4.72 (m, 1 H, Leu-α-CH), 4.71-4.56 (m, 1 H, Pro-α-CH), 3.95, 3.93 (je s, 2 H, COCH₂O), 3.86-3.71 (m, 1 H, Pro-δ-CH₂), 3.73-3.44 (m, 8 H, H₃COCH₂CH₂, H₃COCH₂CH₂, Pro-δ'-CH₂, 2 x Azi-CH, NH), 3.39, 3.34 3.32 (je s, 3 H, H₃COCH₂CH₂), 2.27-1.90 (m, 4 H, Pro-γ-CH₂, Pro-β-CH₂), 1.77-1.42 (m, 3 H, Leu-β-CH₂, Leu-γ-CH), 0.98, 0.94 (je d, 6 H, Leu-δ-CH₃, Leu-δ'-CH₃, ³J = 6.3 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 179.04, 178.69 (Pro-CO), 171.06, 170.90, 170.80 (Leu-CO), 169.43, 169.37 (GlycAc-CO), 165.98 (Azi-CO), 135.14, 135.07 (Ar-C_q), 128.60, 128.56, 128.54, 128.52, 128.48, 128.42 (Ar-CH), 71.55, 71.48 (H₃COCH₂CH₂), 71.07, 70.99 (H₃COCH₂CH₂), 70.36 (COCH₂O), 67.76, 67.73 (CO₂CH₂Ph), 60.89 (Pro-α-CH), 58.67 (H₃COCH₂CH₂), 48.37 (Leu-α-CH), 46.70 (Pro-δ-CH₂), 41.51, 40.36, 40.14 (Azi-CH), 29.68, 29.15 (Pro-β-CH₂), 24.65, 24.42 (Leu-γ-CH, Pro-γ-CH₂), 23.15 (Leu-δ-CH), 21.48, 21.45 (Leu-δ'-CH).

(2S,3S)+(2R,3R)-Dibenzyl-1-[N-(2-methoxyethoxyacetyl)-(S)-isoleucyl-(R)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat



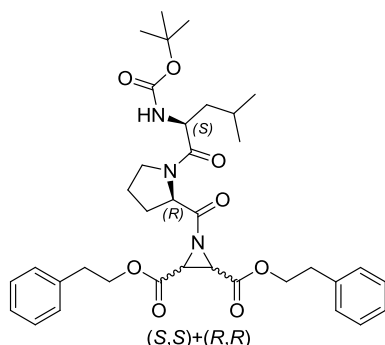
Laborkürzel: PF326.141A
 Bezeichnung: GlycAc-(S)-Ile-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn)₂
 Molekularmasse: 637.72 g/mol

Methode: 5.

Ansatz: 148 mg, 477 μmol (1.0 Äq.) (S,S)+(R,R)-Azi(OBn)₂;
 197 mg, 572 μmol (1.2 Äq.) GlycAc-(S)-Ile-(R)-Pro-OH;
 910 mg, 1.43 mmol (3.0 Äq.) PPA (50% in EA);
 10 ml EA.

R _f :	0.17 (Petrolether/Ethylacetat [1:1]).
SC:	Dichlormethan/Methanol [9:1].
HPLC (p):	R _t = 45.01 min (Methode P-IIa).
Ausbeute:	18.0 mg, 28.2 μmol, 5 %, farbloses Öl.
Epimerenverhältnis:	1:1:0.6 (bestimmt über ¹³ C-NMR-Spektrum anhand der Signale für Pro-β-CH ₂).
HPLC (a):	R _t = 19.86 min (Methode A), Reinheit 94 %.
ESI-MS:	ber. f. C ₃₄ H ₄₃ N ₃ O ₉ , 637.72; gef.: 638.29 [M+H] ⁺ , 1275.60 [2M+H] ⁺ , 1297.58 [2M+Na] ⁺ .
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 2925 (w), 1748 (s), 1642 (s), 1515 (w), 1437 (w), 1319 (w), 1290 (w), 1180 (s), 1111 (s), 1021 (w), 902 (w), 743 (m), 702 (s).
[α] _D ^{23 °C} :	-106.6 ° (c = 0.6, CHCl ₃).
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.42-7.28 (m, 10 H, Ar-CH), 5.27-5.12 (m, 4 H, 2 x CO ₂ CH ₂ Ph), 4.75-4.65 (m, 1 H, Pro-α-CH), 4.61, 4.42 (je dd, 1 H, Ile-α-CH, ³ J = 9.3 Hz), 4.08-3.80 (m, 3 H, COCH ₂ O, Pro-δ-CH ₂), 3.79-3.25 (m, 11 H, H ₃ COCH ₂ CH ₂ , H ₃ COCH ₂ CH ₂ , H ₃ COCH ₂ CH ₂ , Pro-δ'-CH ₂ , 2 x Azi-CH, NH), 2.37-1.73 (m, 5 H, Pro-γ-CH ₂ , Pro-β-CH ₂ , Ile-β-CH), 1.66-1.46 (m, 1 H, Ile-γ ₁ -CH ₂), 1.22-1.04 (m, 1 H, Ile-γ ₁ '-CH ₂), 1.00-0.78 (m, 6 H, Ile-γ ₂ -CH ₃ , Ile-δ-CH ₃).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 179.22, 178.99, 178.80 (Pro-CO), 171.06, 170.90, 170.43 (Leu-CO), 169.85, 169.76 (GlycAc-CO), 166.01, 165.99, 165.77 (Azi-CO), 134.91, 134.81, 134.69 (Ar-C _q), 128.70, 128.67, 128.64, 128.60, 128.57, 128.54 (Ar-CH), 71.57, 71.53 (H ₃ COCH ₂ CH ₂), 71.34, 71.15, 71.05 (H ₃ COCH ₂ CH ₂), 70.53, 70.46, 70.37 (COCH ₂ O), 68.10, 67.87, 67.80 (CO ₂ CH ₂ Ph), 60.60, 60.55, 60.22 (Pro-α-CH), 59.06, 59.04, 58.95 (H ₃ COCH ₂ CH ₂), 54.77, 54.24 (Ile-α-CH), 47.41, 47.11, 46.32 (Pro-δ-CH ₂), 40.58, 40.31, 39.79 (Azi-CH), 37.81, 37.23, 36.80 (Ile-β-CH), 29.71, 29.16, 28.51 (Pro-β-CH ₂), 24.73, 24.64, 24.38, 24.28 (Ile-γ ₁ -CH ₂ , Pro-γ-CH ₂), 15.67, 14.97, 14.87 (Ile-γ ₂ -CH ₃), 11.32, 11.14, 11.04 (Ile-δ-CH ₃).

(2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-Bis(2-phenylethyl)-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat



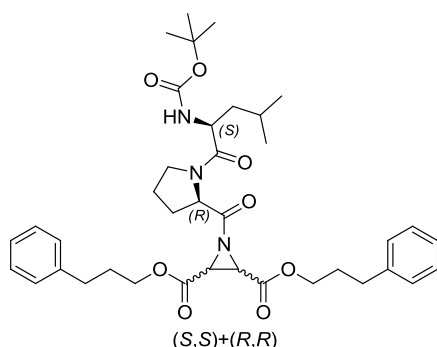
Laborkürzel: PF257.92A
 Bezeichnung: Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*S,S*)+(*R,R*)-Azi(EtPh)₂
 Molekularmasse: 649.77 g/mol

- Methode: 5.
- Ansatz: 213 mg, 628 μmol (1.0 Äq.) (*S,S*)+(*R,R*)-Azi(OEtPh)₂;
 248 mg, 754 μmol (1.2 Äq.) Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OH;
 1.20 g, 1.88 mmol (3.0 Äq.) PPA (50% in EA);
 10 ml EA.
- R_f: 0.21 (Petrolether/Diethylether [1:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- HPLC (p): R_t = 24.49 min (Methode P-IV).
- Ausbeute: 130 mg, 200 μmol , 31 %, farbloses Öl.
- HPLC (a): R_t = 25.28 min (Methode A), Reinheit 95 %.
- Epimerenverhältnis: 1:0.75 (bestimmt über ¹³C-NMR-Spektrum anhand der Signale für Pro- α -CH).
- ESI-MS: ber. f. C₃₆H₄₇N₃O₈, 649.34; gef.: 672.35 [M+Na]⁺, 1321.70 [2M+Na]⁺, 1322.71 [2M+H+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2962 (w), 1736 (s), 1699 (s), 1642 (s), 1495 (w), 1425 (w), 1331 (w), 1258 (w), 1168 (s), 1017 (w), 759 (m), 694 (s).
- [α]_D^{22 °C}: +31.0 ° (c = 0.85, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.34-7.27 (m, 4 H, Ar-CH), 7.26-7.19 (m, 6 H, Ar-CH), 5.19, 5.14 (je d, 1 H, NH, ³J = 9.1 Hz), 4.69-4.53 (m, 1 H, Pro-α-CH), 4.53-4.44 (m, 1 H, Leu-α-CH), 4.44-4.32 (m, 4 H, 2 x CO₂CH₂CH₂), 3.83-3.69 (m, 1 H, Pro-δ-CH₂), 3.69-3.36 (m, 3 H, Pro-δ'-CH₂, 2 x Azi-CH), 2.97 (t, 4 H, 2 x CO₂CH₂CH₂, ³J = 7.1 Hz), 2.30-1.80 (m, 4 H, Pro-β-CH₂, Pro-γ-CH₂), 1.80-1.64 (m, 1 H, Leu-γ-CH), 1.60-1.32 (m, 11 H, Leu-β-CH₂, C(CH₃)₃), 1.04-0.86 (m, 6 H, Leu-δ-CH₃, Leu-δ'-CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100 MHz), δ [ppm] = 179.40, 179.07 (Pro-CO), 172.19, 171.56 (Leu-CO), 166.10, 166.07 (Azi-CO), 155.76, 155.52 (Boc-CO), 137.40, 137.33 (Ar-C_q), 129.08, 129.06, 128.70, 128.69, 126.85, 126.81 (Ar-CH), 79.60, 79.54 (C(CH₃)₃), 66.60 (CO₂CH₂CH₂), 60.79, 60.33 (Pro-α-CH), 50.45, 50.29 (Leu-α-CH), 46.82, 46.73 (Pro-δ-CH₂), 42.80, 42.36 (Leu-β-CH₂), 40.40, 40.15 (Azi-CH), 34.96, 34.93 (CO₂CH₂CH₂), 29.48, 28.88 (Pro-β-CH₂), 28.49, 28.44 (C(CH₃)₃), 24.82, 24.68, 24.66, 24.54 (Leu-γ-CH, Pro-γ-CH₂), 23.60, 23.51 (Leu-δ-CH), 22.11, 21.88 (Leu-δ'-CH).

(2S,3S)+(2R,3R)-Bis(3-phenylpropyl)-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(R)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat



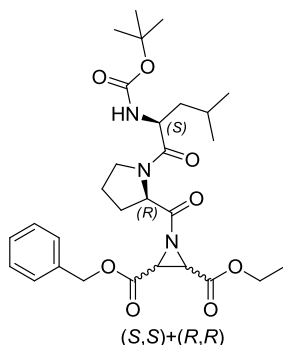
Laborkürzel: PF362.159A
 Bezeichnung: Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OPropPh)₂
 Molekularmasse: 677.83 g/mol

Methode: 5.

Ansatz: 100 mg, 272 μmol (1.0 Äq.) (S,S)+(R,R)-Azi(OPropPh)₂;
 98.0 mg, 299 μmol (1.2 Äq.) Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-OH;
 519 mg, 816 μmol (3.0 Äq.) PPA (50% in EA);
 10 ml EA.

R _f :	0.27 (Petrolether/Ethylacetat [2:1]).
SC:	Petrolether/Ethylacetat [9:1].
HPLC (p):	R _t = 27.71 min (Methode P-V).
Ausbeute:	65.0 mg, 95.8 μmol, 35 %, farbloses Öl.
HPLC (a):	R _t = 26.73 min (Methode A), Reinheit > 99 %.
Epimerenverhältnis:	1:1 (bestimmt über ¹³ C-NMR-Spektrum anhand der Signale für Leu-β-CH ₂).
ESI-MS:	ber. f. C ₃₈ H ₅₁ N ₃ O ₈ , 677.83; gef.: 700.31 [M+Na] ⁺ , 1378.69 [2M+Na] ⁺ .
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 2953 (w), 1744 (s), 1715 (s), 1634 (s), 1503 (w), 1425 (w), 1258 (w), 1164 (s), 1025 (m), 751 (m), 698 (s).
[α] _D ^{22 °C} :	+3.7 ° (c = 0.65, CHCl ₃).
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.33-7.24 (m, 4 H, Ar-CH), 7.23-7.14 (m, 6 H, Ar-CH), 5.20, 5.15 (je d, 1 H, NH, ³ J = 9.2 Hz), 4.78-4.59 (m, 1 H, Pro-α-CH), 4.57-4.43 (m, 1 H, Leu-α-CH), 4.21, 4.20 (je t, 4 H, 2 x CO ₂ CH ₂ CH ₂ , ³ J = 6.5), 3.89-3.69 (m, 1 H, Pro-δ-CH ₂), 3.67-3.41 (m, 3 H, Pro-δ'-CH ₂ , 2 x Azi-CH), 2.71 (t, 4 H, 2 x CO ₂ CH ₂ CH ₂ , ³ J = 7.6 Hz), 2.37-1.89 (m, 8 H, Pro-β-CH ₂ , Pro-γ-CH ₂ , 2 x CH ₂ CH ₂ Ph), 1.82-1.62 (m, 1 H, Leu-γ-CH), 1.60-1.31 (m, 11 H, Leu-β-CH ₂ , C(CH ₃) ₃), 0.99, 0.97 (je d, 3 H, Leu-δ-CH ₃ , ³ J = 4.1 Hz), 0.93, 0.91 (je d, 3 H, Leu-δ'-CH ₃ , ³ J = 4.5 Hz).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 179.34, 179.17 (Pro-CO), 172.16, 171.56 (Leu-CO), 166.18 (Azi-CO), 155.70, 155.50 (Boc-CO), 140.98, 140.94 (Ar-C _q), 128.56, 128.50, 128.48, 126.18, 126.16 (Ar-CH), 79.52 (C(CH ₃) ₃), 65.64, 65.59 (CO ₂ CH ₂ CH ₂), 60.80, 60.28 (Pro-α-CH), 50.41, 50.24 (Leu-α-CH), 46.78, 46.68 (Pro-δ-CH ₂), 42.65, 42.27 (Leu-β-CH ₂), 40.38, 40.18 (Azi-CH), 32.08, 32.06 (CH ₂ CH ₂ Ph), 30.02, 30.01 (CH ₂ CH ₂ CH ₂), 29.52, 28.89 (Pro-β-CH ₂), 28.43 (C(CH ₃) ₃), 24.78, 24.61, 24.48 (Leu-γ-CH, Pro-γ-CH ₂), 23.56, 23.46 (Leu-δ-CH), 22.00, 21.79 (Leu-δ'-CH).

10.3.2 Unsymmetrische Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Inhibitoren

(2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-2-Benzyl-3-ethyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat

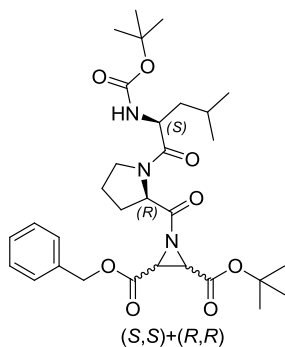
Laborkürzel: PF270.103A
 Bezeichnung: Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-
 (*S*,*S*)+(*R*,*R*)-Azi(OBn)(OEt)
 Molekularmasse: 559.65 g/mol

- Methode: 5.
- Ansatz: 112 mg, 449 μmol (1.0 Äq.) (*S*,*S*)+(*R*,*R*)-Azi(OBn)(OEt);
 177 mg, 539 μmol (1.2 Äq.) Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OH;
 857 mg, 1.34 mmol (3.0 Äq.) PPA (50% in EA);
 10 ml EA.
- R_f: 0.19 (Petrolether/Diethylether [1:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- HPLC (p): R_t = 23.90 min (Methode P-IIIa).
- Ausbeute: 38.0 mg, 67.9 μmol , 15 %, farbloses Öl.
- HPLC (a): R_t = 21.73 min (Methode A), Reinheit > 99 %.
- Epimerenverhältnis: 1:0.9 (bestimmt über ¹³C-NMR-Spektrum anhand der Signale für Pro- α -CH).
- ESI-MS: ber. f. C₂₉H₄₁N₃O₈, 559.29; gef.: 1141.59 [2M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2958 (w), 1736 (s), 1707 (s), 1646 (s), 1495 (w), 1425 (w), 1364 (w), 1245 (w), 1164 (s), 1025 (m), 735 (m).
- [α]_D^{21 °C}: -12.0 ° (c = 0.5, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.41-7.30 (m, 5 H, Ar-CH), 5.26-5.11 (m, 3 H, CO₂CH₂Ph, NH), 4.71, 4.62 (je dd, 1 H, Pro-α-CH, ³J = 7.8, 2.6 Hz), 4.55-4.43 (m, 1 H, Leu-α-CH), 4.28-4.15 (m, 2 H, CO₂CH₂CH₃), 3.87-3.69 (m, 1 H, Pro-δ-CH₂), 3.69-3.43 (m, 3 H, Pro-δ'-CH₂, 2 x Azi-CH), 2.33-1.81 (m, 4 H, Pro-β-CH₂, Pro-γ-CH₂), 1.80-1.64 (m, 1 H, Leu-γ-CH), 1.60-1.35 (m, 11 H, Leu-β-CH₂, C(CH₃)₃), 1.28, 1.27 (je t, 3 H, CO₂CH₂CH₃, ³J = 7.1 Hz), 0.99, 0.97 (je d, 3 H, Leu-δ-CH₃, ³J = 3.6 Hz), 0.93, 0.91 (je d, 3 H, Leu-δ'-CH₃, ³J = 1.2 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100 MHz), δ [ppm] = 179.38, 179.15 (Pro-CO), 172.21, 171.58 (Leu-CO), 166.14, 166.09, 166.03 (Azi-CO), 155.74, 155.53 (Boc-CO), 135.03, 134.99 (Ar-C_q), 128.76, 128.72, 128.69, 128.64 (Ar-CH), 79.57, 79.54 (C(CH₃)₃), 67.93, 67.92 (CO₂CH₂Ph), 62.34, 62.32 (CO₂CH₂CH₃), 60.79, 60.32 (Pro-α-CH), 50.46, 50.32 (Leu-α-CH), 46.83, 46.74 (Pro-δ-CH₂), 42.75, 42.37 (Leu-β-CH₂), 40.53, 40.46, 40.28, 40.17 (Azi-CH), 29.51, 28.82 (Pro-β-CH₂), 28.48, 28.45 (C(CH₃)₃), 24.81, 24.68, 24.65, 24.54 (Leu-γ-CH, Pro-γ-CH₂), 23.59, 23.50 (Leu-δ-CH), 22.06, 21.88 (Leu-δ'-CH), 14.14 (CO₂CH₂CH₃).

(2S,3S)+(2R,3R)-3-Benzyl-2-tert-butyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(R)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat



Laborkürzel: PF289.112A
 Bezeichnung: Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OtBu)
 Molekularmasse: 587.70 g/mol

Methode: 5.

Ansatz: 123 mg, 443 μmol (1.0 Äq.) (S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OtBu);

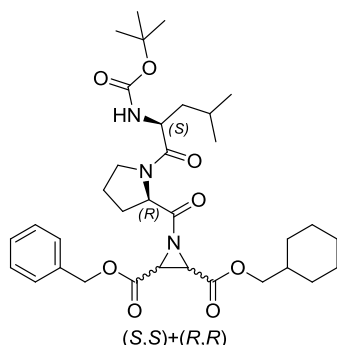
175 mg, 532 μmol (1.2 Äq.) Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-OH;

1.01 g, 1.56 mmol (3.0 Äq.) PPA (50% in EA);

10 ml EA.

R _f :	0.16 (Petrolether/Diethylether [1:1]).
SC:	Petrolether/Ethylacetat [9:1].
HPLC (p):	R _t = 23.15 min (Methode P-IV).
Ausbeute:	70.0 mg, 119 μmol, 26 %, gelbliches Öl.
HPLC (a):	R _t = 24.13 min (Methode A), Reinheit 89 %.
Epimerenverhältnis:	1:1 (bestimmt über ¹³ C-NMR-Spektrum anhand der Signale für Leu-α-CH).
ESI-MS:	ber. f. C ₃₁ H ₄₅ N ₃ O ₈ , 587.70; gef.: 610.33 [M+Na] ⁺ , 1198.74 [2M+Na] ⁺ .
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 2958 (w), 1711 (s), 1646 (s), 1429 (w), 1368 (m), 1155 (s), 1017 (w), 845 (w), 747 (m).
[α] _D ^{21 °C} :	-10.0 ° (c = 0.5, CHCl ₃).
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.43-7.28 (m, 5 H, Ar-CH), 5.26-5.09 (m, 3 H, CO ₂ CH ₂ Ph, NH), 4.77-4.56 (m, 1 H, Pro-α-CH), 4.55-4.39 (m, 1 H, Leu-α-CH), 3.87-3.67 (m, 1 H, Pro-δ-CH ₂), 3.66-3.39 (m, 3 H, Pro-δ'-CH ₂ , 2 x Azi-CH), 2.35-1.83 (m, 4 H, Pro-β-CH ₂ , Pro-γ-CH ₂), 1.82-1.59 (m, 1 H, Leu-γ-CH), 1.58-1.30 (m, 20 H, Leu-β-CH ₂ , 2 x C(CH ₃) ₃), 1.02-0.84 (m, 6 H, Leu-δ-CH ₃ , Leu-δ'-CH ₃).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 179.51, 179.09 (Pro-CO), 172.09, 171.46 (Leu-CO), 166.35, 164.87 (Azi-CO), 155.72, 155.51 (Boc-CO), 135.03, 134.99 (Ar-C _q), 128.80, 128.74, 128.66 (Ar-CH), 83.49 (C(CH ₃) ₃), 79.54, 79.49 (Boc-C(CH ₃) ₃), 67.85 (CO ₂ CH ₂ Ph), 60.70, 60.23 (Pro-α-CH), 50.38, 50.26 (Leu-α-CH), 46.78, 46.69 (Pro-δ-CH ₂), 42.80, 42.36 (Leu-β-CH ₂), 41.51, 41.13, 40.08, 39.98 (Azi-CH), 29.47, 28.46 (Pro-β-CH ₂), 28.46, 27.98 (C(CH ₃) ₃), 24.78, 24.64, 24.59, 24.51 (Leu-γ-CH, Pro-γ-CH ₂), 23.60, 23.49 (Leu-δ-CH), 22.03, 21.87 (Leu-δ'-CH).

(2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-2-Benzyl-3-cyclohexylmethyl-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat



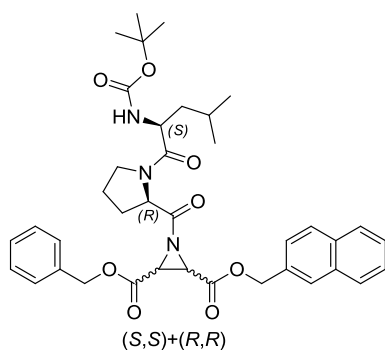
Laborkürzel: PF253.89A
 Bezeichnung: Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-
 (*S*,*S*)+(*R*,*R*)-Azi(OBn)(OMeCy)
 Molekularmasse: 627.77 g/mol

- Methode: 5.
- Ansatz: 150 mg, 472 μmol (1.0 Äq.) (*S*,*S*)+(*R*,*R*)-Azi(OBn)(OMeCy);
 186 mg, 567 μmol (1.2 Äq.) Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OH;
 908 mg, 1.41 mmol (3.0 Äq.) PPA (50% in EA);
 10 ml EA.
- R_f: 0.70 (Petrolether/Ethylacetat [2:1]).
- SC: Petrolether /Ethylacetat [9:1].
- HPLC (p): R_t = 29.25 min (Methode P-IV).
- Ausbeute: 39.0 mg, 62.1 μmol , 13 %, farbloses Öl.
- HPLC (a): R_t = 27.07 min (Methode A), Reinheit 86 %.
- Epimerenverhältnis: 1:1:0.3 (bestimmt über ¹³C-NMR-Spektrum anhand der Signale für Pro- α -CH).
- ESI-MS: ber. f. C₃₄H₄₉N₃O₈, 627.4; gef.: 628.39 [M+H]⁺, 650.36 [M+Na]⁺, 1277.73 [2M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2925 (m), 1736 (s), 1699 (s), 1642 (s), 1695 (w), 1323 (w), 1168 (s), 1127 (w), 1029 (w), 702 (m).
- [α]_D^{22 °C}: -8.0 ° (c = 0.65, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.42-7.30 (m, 5 H, Ar-CH), 5.27-5.09 (m, 3 H, CO₂CH₂Ph, NH), 4.78-4.56 (m, 1 H, Pro-α-CH), 4.56-4.42 (m, 1 H, Leu-α-CH), 4.05-3.89 (m, 2 H, CO₂CH₂Cy), 3.86-3.67 (m, 1 H, Pro-δ-CH₂), 3.65-3.41 (m, 3 H, Pro-δ'-CH₂, 2 x Azi-CH), 2.35-1.92 (m, 4 H, Pro-β-CH₂, Pro-γ-CH₂), 1.79-1.60 (m, 7 H, Leu-γ-CH, 2 x Cy-2-CH_{eq}H, 2 x Cy-3-CH_{eq}H, 1 x Cy-1-CH, 1 x Cy-4-CH_{eq}H), 1.52-1.33 (m, 11 H, Leu-β-CH₂, C(CH₃)₃), 1.32-1.08 (m, 3 H, 2 x Cy-3-CHH_{ax}, 1 x Cy-4-CHH_{ax}), 1.02-0.86 (m, 8 H, 2 x Cy-2-CHH_{ax}, Leu-δ-CH₃, Leu-δ'-CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100 MHz), δ [ppm] = 179.34, 179.08 (Pro-CO), 172.24, 171.59 (Leu-CO), 166.27, 166.23, 166.12, 166.09 (Azi-CO), 155.78, 155.56 (Boc-CO), 135.05, 135.02 (Ar-C_q), 128.83, 128.81, 128.75, 128.73, 128.70, 128.64 (Ar-CH), 79.56 (C(CH₃)₃), 71.38 (CO₂CH₂Cy), 67.93 (CO₂CH₂Ph), 60.84, 60.38 (Pro-α-CH), 50.48 (Leu-α-CH), 46.72 (Pro-δ-CH₂), 42.74, 42.37 (Leu-β-CH₂), 40.62, 40.42, 40.32, 40.14 (Azi-CH), 36.97 (Cy-1-CH), 29.62 (Cy-2-CH₂), 28.48 (Pro-β-CH₂, C(CH₃)₃), 26.38 (Cy-4-CH₂), 25.68 (Cy-3-CH₂), 24.81, 24.68, 24.52 (Leu-γ-CH, Pro-γ-CH₂), 23.60, 23.52 (Leu-δ-CH), 22.10, 21.87 (Leu-δ'-CH).

(2S,3S)+(2R,3R)-3-Benzyl-2-(naphthalin-2-ylmethyl)-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(R)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat



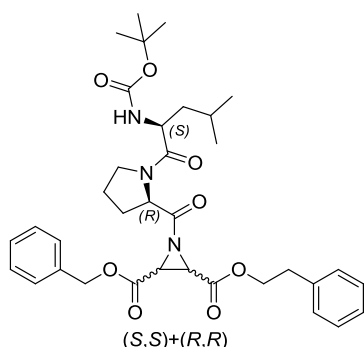
Laborkürzel: PF294.124A
 Bezeichnung: Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OMeNaph)
 Molekularmasse: 671.78 g/mol

Methode: 5.

Ansatz: 90.0 mg, 249 μmol (1.0 Äq.) (S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OMeNaph);
 98.0 mg, 298 μmol (1.2 Äq.) Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-OH;
 475 mg, 747 μmol (3.0 Äq.) PPA (50% in EA);
 10 ml EA.

R _f :	0.14 (Petrolether/Diethylether [1:1]).
SC:	Petrolether/Ethylacetat [9:1].
HPLC (p):	R _t = 22.45 min (Methode P-V).
Ausbeute:	70.0 mg, 59.5 μmol, 23 %, farbloses Öl.
HPLC (a):	R _t = 26.05 min (Methode A), Reinheit 90 %.
Epimerenverhältnis:	1:1:0.3:0.3 (bestimmt über ¹³ C-NMR-Spektrum anhand der Signale für Pro-α-CH).
ESI-MS:	ber. f. C ₃₈ H ₄₅ N ₃ O ₈ , 671.32; gef.: 694.32 [M+Na] ⁺ , 1365.63 [2M+Na] ⁺ .
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 2933 (w), 1744 (s), 1703 (s), 1646 (s), 1507 (w), 1433 (w), 1327 (w), 1254 (w), 1172 (s), 1127 (w), 1025 (w), 816 (w), 747 (m).
[α] _D ^{22 °C} :	-10.0 ° (c = 0.6, CHCl ₃).
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.90-7.79 (m, 4 H, Naph-6-CH, Naph-4-CH, Naph-5-CH, Naph-9-CH), 7.55-7.42 (m, 3 H, Naph-7-CH, Naph-8-CH, Naph-10-CH), 7.41-7.28 (m, 5 H, Ph-CH), 5.43-5.30 (m, 2 H, CO ₂ CH ₂ Naph), 5.28-5.08 (m, 3 H, CO ₂ CH ₂ Ph, NH), 4.79-4.58 (m, 1 H, Pro-α-CH), 4.58-4.39 (m, 1 H, Leu-α-CH), 3.87-3.38 (m, 4 H, Pro-δ-CH ₂ , 2 x Azi-CH), 2.32-1.82 (m, 4 H, Pro-β-CH ₂ , Pro-γ-CH ₂), 1.80-1.62 (m, 1 H, Leu-γ-CH), 1.53-1.33 (m, 10 H, Leu-β-CH ₂ , C(CH ₃) ₃), 1.04-0.81 (m, 6 H, Leu-δ-CH ₃ , Leu-δ'-CH ₃).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 179.26, 179.05 (Pro-CO), 172.17, 171.56 (Leu-CO), 166.00, 165.94, 165.69, 165.65 (Azi-CO), 155.66, 155.48 (Boc-CO), 134.86, 134.82, (Ph-C _q), 133.26, 133.14, 132.27, 132.22 (Naph-C _q), 128.69, 128.64, 128.61, 128.55, 128.50, 128.06, 127.73, 126.48, 126.42, 126.38, 126.05, 125.93 (Ar-CH), 79.49 (C(CH ₃) ₃), 68.02, 67.87 (CO ₂ CH ₂ Ph), 60.77, 60.29 (Pro-α-CH), 50.38, 50.22 (Leu-α-CH), 46.72, 46.63 (Pro-δ-CH ₂), 42.51, 42.19 (Leu-β-CH ₂), 40.47, 40.20, 40.17 (Azi-CH), 29.71, 29.35 (Pro-β-CH ₂), 28.38, 28.33 (C(CH ₃) ₃), 24.71, 24.56, 24.43 (Leu-γ-CH, Pro-γ-CH ₂), 23.48, 23.37 (Leu-δ-CH), 21.96, 21.74 (Leu-δ'-CH).

(2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-2-Benzyl-3-(2-phenylethyl)-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat



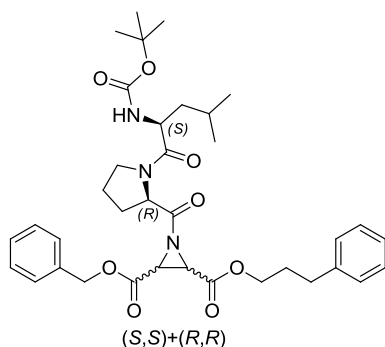
Laborkürzel: PF272.105A
 Bezeichnung: Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*S*,*S*)+(*R*,*R*)-Azi(OBn)(OEtPh)
 Molekularmasse: 627.77 g/mol

- Methode: 5.
- Ansatz: 187 mg, 574 μmol (1.0 Äq.) (*S*,*S*)+(*R*,*R*)-Azi(OBn)(OEtPh);
 226 mg, 689 μmol (1.2 Äq.) Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OH;
 1.09 g, 1.72 mmol (3.0 Äq.) PPA (50% in EA);
 10 ml EA.
- R_f: 0.21 (Petrolether/Diethylether [1:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- HPLC (p): R_t = 27.67 min (Methode P-IIIb).
- Ausbeute: 159 mg, 250 μmol , 43 %, farbloses Öl.
- HPLC (a): R_t = 24.13 min (Methode A), Reinheit 87 %.
- Epimerenverhältnis: 1:1:1:0.6 (bestimmt über ¹³C-NMR-Spektrum anhand der Signale für Leu- β -CH₂).
- ESI-MS: ber. f. C₃₅H₄₅N₃O₈, 635.3; gef.: 658.34 [M+Na]⁺, 1293.69 [2M+Na]⁺, 1308.71 [2M+K]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2937 (2), 1740 (m), 1707 (m), 1642 (m), 1499 (w), 1429 (w), 1254 (m), 1164 (s), 1123 (w), 1017 (w), 747 (m), 694 (s).
- [α]_D^{21 °C}: -6.6 ° (c = 0.6, CHCl₃).

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.30-7.05 (m, 10 H, Ar-CH), 5.20-4.95 (m, 3 H, CO₂CH₂Ph, NH), 4.63-4.15 (m, 4 H, Leu-α-CH, Pro-α-CH, CO₂CH₂CH₂), 3.74-3.56 (m, 1 H, Pro-δ-CH₂), 3.55-3.24 (m, 3 H, Pro-δ'-CH₂, 2 x Azi-CH), 2.86, 2.85 (je t, 2 H, CO₂CH₂CH₂, ³J = 7.1 Hz), 2.24-1.71 (m, 4 H, Pro-β-CH₂, Pro-γ-CH₂), 1.70-1.51 (m, 1 H, Leu-γ-CH), 1.49-1.21 (m, 11 H, Leu-β-CH₂, C(CH₃)₃), 0.95-0.70 (m, 6 H, Leu-δ-CH₃, Leu-δ'-CH₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 100 MHz), δ [ppm] = 179.29, 179.01 (Pro-CO), 172.12, 171.50 (Leu-CO), 165.98, 165.94, 165.75, 165.70 (Azi-CO), 155.67, 155.44 (Boc-CO), 137.32, 137.29, 134.96, 134.91 (Ar-C_q), 128.99, 128.97, 128.92, 128.73, 128.70, 128.66, 128.61, 128.59, 128.53, 126.76, 126.72 (Ar-CH), 79.45 (C(CH₃)₃), 67.83, 66.51 (CO₂CH₂CH₂), 60.74, 60.27 (Pro-α-CH), 50.38 (Leu-α-CH), 46.64 (Pro-δ-CH₂), 42.68, 42.62 (Leu-β-CH₂), 40.32, 40.08, 40.06, 39.58 (Azi-CH), 34.84 (CO₂CH₂CH₂), 29.38 (Pro-β-CH₂), 28.40 (C(CH₃)₃), 24.59, 24.45 (Leu-γ-CH, Pro-γ-CH₂), 23.52 (Leu-δ-CH), 22.01, 21.79 (Leu-δ'-CH).

(2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-2-Benzyl-3-(3-phenylpropyl)-1-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-(*R*)-prolyl]-aziridin-2,3-dicarboxylat



Laborkürzel: PF317.135A
 Bezeichnung: Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*S*,*S*)+(*R*,*R*)-Azi(OBn)(OPropPh)
 Molekularmasse: 649.77 g/mol

Methode: 5.

Ansatz: 105 mg, 309 μmol (1.0 Äq.) (*S*,*S*)+(*R*,*R*)-Azi(OBn)(OPropPh);

122 mg, 371 μmol (1.2 Äq.) Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-OH;

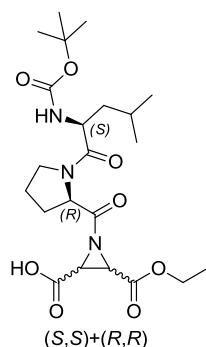
590 mg, 928 μmol (3.0 Äq.) PPA (50% in EA);

10 ml EA.

Rf: 0.2 (Petrolether/Diethylether [1:1]).

SC:	Petrolether/Ethylacetat [9:1].
HPLC (p):	$R_t = 25.22$ min (Methode P-IV).
Ausbeute:	50.0 mg, 76.9 μ mol, 24 %, gelbliches Öl.
HPLC (a):	$R_t = 25.68$ min (Methode A), Reinheit 97 %.
Epimerenverhältnis:	1:1 (bestimmt über ^{13}C -NMR-Spektrum anhand der Signale für Leu- β -CH ₂).
ESI-MS:	ber. f. $\text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_8$, 649.34; gef.: 672.36 [M+Na] ⁺ , 1321.76 [2M+Na] ⁺ .
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 2949 (w), 1744 (s), 1711 (s), 1642 (s), 1495 (w), 1364 (w), 1168 (s), 1017 (w), 751 (m), 694 (s).
$[\alpha]_D^{22 \text{ }^\circ\text{C}}$:	-12.0 ° (c = 0.5, CHCl ₃).
$^1\text{H-NMR}$:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.43-7.33 (m, 5 H, Bn-CH), 7.32-7.23 (m, 2 H, Ph-CH), 7.23-7.12 (m, 3 H, Ph-CH), 5.27-5.09 (m, 3 H, CO ₂ CH ₂ Ph, NH), 4.71, 4.63 (je dd, Pro- α -CH, $^3J = 7.6, 2.5$ Hz), 4.56-4.41 (m, 1 H, Leu- α -CH), 4.19, 4.18 (je t, 2 H, CO ₂ CH ₂ CH ₂ , $^3J = 7.0$), 3.90-3.39 (m, 4 H, Pro- δ -CH ₂ , 2 x Azi-CH), 2.69 (t, 2 H, CO ₂ CH ₂ CH ₂ , $^3J = 7.0$ Hz), 2.37-1.83 (m, 6 H, Pro- β -CH ₂ , Pro- γ -CH ₂ , CH ₂ CH ₂ Ph), 1.82-1.61 (m, 1 H, Leu- γ -CH), 1.59-1.35 (m, 11 H, Leu- β -CH ₂ , C(CH ₃) ₃), 0.99, 0.96 (je d, 3 H, Leu- δ -CH ₃ , $^3J = 4.9$ Hz), 0.93, 0.91 (je d, 3 H, Leu- δ' -CH ₃ , $^3J = 3.5$ Hz).
$^{13}\text{C-NMR}$:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 179.30, 179.11 (Pro-CO), 172.14, 171.53 (Leu-CO), 166.05, 166.02, 165.99 (Azi-CO), 155.66, 155.45 (Boc-CO), 140.92, 140.89 (Ph-C _q), 134.88, 134.83 (Bn-C _q), 128.68, 128.65, 128.58, 128.50, 128.49, 128.44, 128.43, 126.11, 126.10 (Ar-CH), 79.49 (C(CH ₃) ₃), 67.88 (CO ₂ CH ₂ Ph), 65.62, 65.57 (CO ₂ CH ₂ CH ₂), 60.75, 60.25 (Pro- α -CH), 50.34, 50.17 (Leu- α -CH), 46.72, 46.63 (Pro- δ -CH ₂), 42.61, 42.20 (Leu- β -CH ₂), 40.42, 40.33, 40.16, 40.09 (Azi-CH), 32.03, 32.00 (CH ₂ CH ₂ Ph), 29.95, 29.93 (CH ₂ CH ₂ CH ₂), 29.44, 28.78 (Pro- β -CH ₂), 28.37 (C(CH ₃) ₃), 24.73, 24.55, 24.44 (Leu- γ -CH, Pro- γ -CH ₂), 23.53, 23.42 (Leu- δ -CH), 21.94, 21.73 (Leu- δ' -CH).

10.3.3 3-Carbonylaziridin-2-carbonsäure-basierte Inhibitoren

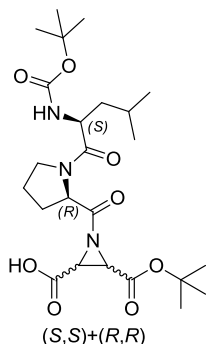
(2S,3S)+(2R,3R)-1-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(R)-prolyl]-3-ethyloxycarbonyl-aziridin-2-carbonsäure

Laborkürzel: PF349.149A
 Bezeichnung: Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OH)(OEt)
 Molekularmasse: 469.53 g/mol

- Methode: 7.
- Ansatz: 7 mg, 12.5 μmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OEt);
 2 mg, Pd/C;
 4 ml Methanol.
- Ausbeute: 5 mg, 10.6 μmol , 85 %, farbloses Öl.
- HPLC (a): $R_t = 12.67$ min (Methode A), Reinheit 86 %.
- Epimerenverhältnis: 1:1:0.6 (bestimmt über ^{13}C -NMR-Spektrum anhand der Signale für Leu- β -CH₂).
- ESI-MS: ber. f. C₂₂H₃₅N₃O₈, 469.24; gef.: 492.27 [M+Na]⁺, 961.58 [2M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2966 (w), 1707 (s), 1629 (s), 1515 (w), 1450 (w), 1364 (m), 1254 (w), 1160 (s), 1021 (w).
- $[\alpha]_D^{21}$: -3.6 ° (c = 0.55, MeOH).
- ¹H-NMR: (MeOD, 300 MHz), δ [ppm] = 16.29-14.92 (br s, 1 H, CO₂H), 4.75-4.57 (m, 1 H, Pro- α -CH), 4.49-4.11 (m, 3 H, Leu- α -CH, CO₂CH₂CH₃), 3.88-3.69 (m, 1 H, Pro- δ -CH₂), 3.65-3.34 (m, 3 H, Pro- δ' -CH₂, 2 x Azi-CH), 2.39-1.84 (m, 4 H, Pro- β -CH₂, Pro- γ -CH₂), 1.79-1.56 (m, 1 H, Leu- γ -CH), 1.54-1.35 (m, 11 H, Leu- β -CH₂, C(CH₃)₃), 1.34-1.17 (m, 3 H, CO₂CH₂CH₃), 0.99-0.79 (m, 6 H, Leu- δ -CH₃, Leu- δ' -CH₃).

^{13}C -NMR: (MeOD, 75 MHz), δ [ppm] = 181.05, 181.01, 180.63 (Pro-CO), 174.67, 174.25, 173.46 (Leu-CO), 169.16, 167.89, 167.81, 167.58 (Azi-CO), 158.08, 157.69 (Boc-CO), 80.52, 80.50, 80.43 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 63.44, 63.22 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 62.64, 62.39, 62.03 (Pro- α -CH), 51.93, 51.88, 51.80 (Leu- α -CH), 48.03, 47.95, 47.74 (Pro- δ - CH_2), 42.11, 41.91, 41.57 (Leu- β - CH_2), 41.17, 41.14, 40.94, 40.71 (Azi-CH), 30.06, 29.58 (Pro- β - CH_2), 28.73, 28.70 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.83, 25.70, 25.43 (Leu- γ -CH, Pro- γ - CH_2), 23.87, 23.67 (Leu- δ -CH), 22.30, 22.02, 21.86 (Leu- δ' -CH), 14.41, 14.38 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

(2S,3S)+(2R,3R)-1-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(R)-prolyl]-3-tert-butylloxycarbonyl-aziridin-2-carbonsäure



Laborkürzel: PF382.162A
 Bezeichnung: Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OH)(OtBu)
 Molekularmasse: 497.58 g/mol

Methode: 7.

Ansatz: 25 mg, 42.5 μmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OtBu);
 5 mg, Pd/C;
 5 ml Methanol.

Ausbeute: 15.0 mg, 30.1 μmol , 70 %, farbloses Öl.

HPLC (a): R_t = 16.07 min (Methode A), Reinheit 92 %.

Epimerenverhältnis: 1:1 (bestimmt über ^{13}C -NMR-Spektrum anhand der Signale für Pro- α -CH).

ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_8$, 497.27; gef.: 498.28 [M+H], 520.26 [M+Na] $^+$.

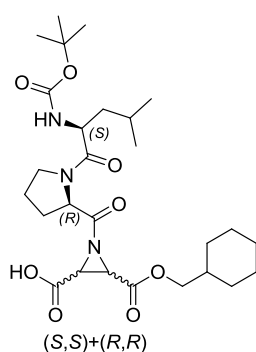
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2982 (s), 2921 (w), 1715 (m), 1650 (w), 1462 (w), 1376 (w), 1254 (m), 1155 (s), 951(w), 845 (w), 665 (s).

$[\alpha]_D^{23}$ °C: -24.0 ° (c = 0.75, MeOH).

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 6.29, 5.97 (je d, 1 H, NH, ³J = 8.8 Hz), 5.58 (br s, 1 H, CO₂H), 4.70 (d, 1 H, Pro- α -CH, ³J = 6.9 Hz), 4.53-4.33 (m, 1 H, Leu- α -CH), 4.01-3.74 (m, 1 H, Pro- δ -CH₂), 3.71-3.22 (m, 3 H, Pro- δ' -CH₂, 2 x Azi-CH), 2.54-1.85 (m, 4 H, Pro- β -CH₂, Pro- γ -CH₂), 1.85-1.68 (m, 1 H, Leu- γ -CH), 1.64-1.29 (m, 20 H, Leu- β -CH₂, 2 x C(CH₃)₃), 0.96, 0.92 (je d, 6 H, Leu- δ -CH₃, Leu- δ' -CH₃, ³J = 5.7 Hz).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 178.47, 178.12 (Pro-CO), 174.20, 173.48 (Leu-CO), 169.03, 168.65, 165.47, 165.33 (Azi-CO), 156.53, 156.45 (Boc-CO), 83.43, 83.21 (C(CH₃)₃), 79.95, 79.52 (Boc-C(CH₃)₃), 67.85 (CO₂CH₂Ph), 61.87, 60.93 (Pro- α -CH), 50.99, 50.77 (Leu- α -CH), 47.21, 46.55 (Pro- δ -CH₂), 41.32, 40.88, 40.82, 40.54, 40.15, 40.07, (Azi-CH, Leu- β -CH₂), 29.33, 28.81 (Pro- β -CH₂), 28.52, 28.05, 28.01 (C(CH₃)₃), 24.91, 24.84, 24.68, 24.30 (Leu- γ -CH, Pro- γ -CH₂), 23.55, 23.47 (Leu- δ -CH), 21.61, 21.56 (Leu- δ' -CH).

(2S,3S)+(2R,3R)-1-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-(S)-isoleucyl-(R)-prolyl]-3-cyclohexylmethyloxycarbonyl-aziridin-2-carbonsäure



Laborkürzel: PF345.147A
 Bezeichnung: Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OH)(OMeCy)
 Molekularmasse: 537.65 g/mol

Methode: 7.

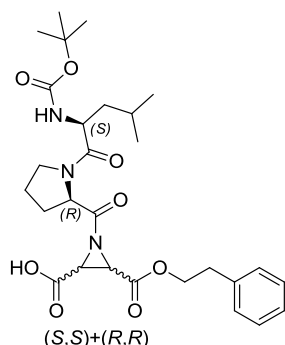
Ansatz: 11 mg, 17.5 μ mol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OMeCy);

2 mg, Pd/C;

4 ml Methanol.

- Ausbeute: 7 mg, 13.0 μmol , 74 %, farbloses Öl.
- HPLC (a): $R_t = 20.25$ min (Methode A), Reinheit 84 %.
- Epimerenverhältnis: 1:1:0.3 (bestimmt über ^{13}C -NMR-Spektrum anhand der Signale für Leu- α -CH).
- ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_8$, 537.31; gef.: 560.35 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1970.74 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2921 (m), 2843 (w), 1711 (s), 1634 (s), 1515 (w), 1450 (m), 1364 (w), 1254 (m), 1164 (m), 1045 (m), 1012 (m).
- $[\alpha]_D^{22}$: -12.0° (c = 0.55, MeOH).
- ^1H -NMR: (MeOD₃, 300 MHz), δ [ppm] = 15.87 (br s, 1 H, CO₂H), 4.76-4.53 (m, 1 H, Pro- α -CH), 4.47-4.21 (m, 1 H, Leu- α -CH), 4.09-3.85 (m, 3 H, CO₂CH₂Cy, NH), 3.85-3.69 (m, 1 H, Pro- δ -CH₂), 3.64-3.47 (m, 2 H, Pro- δ' -CH₂, Azi-CH), 3.47-3.38 (m, 1 H, Azi-CH), 2.40-1.93 (m, 4 H, Pro- β -CH₂, Pro- γ -CH₂), 1.81-1.56 (m, 7 H, Leu- γ -CH, 2 x Cy-2-CH_{eq}H, 2 x Cy-3-CH_{eq}H, 1 x Cy-1-CH, 1 x Cy-4-CH_{eq}H), 1.55-1.35 (m, 11 H, Leu- β -CH₂, C(CH₃)₃), 1.35-1.07 (m, 3 H, 2 x Cy-3-CHH_{ax}, 1 x Cy-4-CHH_{ax}), 1.07-0.78 (m, 8 H, 2 x Cy-2-CHH_{ax}, Leu- δ -CH₃, Leu- δ' -CH₃).
- ^{13}C -NMR: (MeOD, 75 MHz), δ [ppm] = 180.98, 180.54 (Pro-CO), 174.66, 174.21, 173.44 (Leu-CO), 167.98, 167.90, 167.62 (Azi-CO), 158.05, 157.79, 157.66 (Boc-CO), 80.51, 80.42 (C(CH₃)₃), 72.34, 72.15 (CO₂CH₂Cy), 62.61, 62.42, 62.03 (Pro- α -CH), 51.90, 51.79 (Leu- α -CH), 47.92, 47.70 (Pro- δ -CH₂), 42.13, 42.01, 41.82, 41.60 (Azi-CH), 41.16, 40.95, 40.66 (Leu- β -CH₂), 38.32, 38.28 (Cy-1-CH), 30.60, 30.50 (Cy-2-CH₂), 30.02, 29.57 (Pro- β -CH₂), 28.75, 28.70 (C(CH₃)₃), 27.41 (Cy-4-CH₂), 26.74 (Cy-3-CH₂), 25.88, 25.81, 25.69, 25.41 (Leu- γ -CH, Pro- γ -CH₂), 23.90, 23.70, 23.23 (Leu- δ -CH), 22.39, 22.04, 21.88 (Leu- δ' -CH).

(2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-1-[*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(*R*)-prolyl]-3-(2-phenylethyl)oxycarbonyl-aziridin-2-carbonsäure

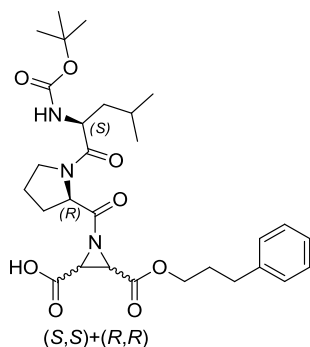


Laborkürzel: PF350.105A
 Bezeichnung: Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*S,S*)+(*R,R*)-Azi(OH)(OEtPh)
 Molekularmasse: 545.62 g/mol

- Methode: 7.
- Ansatz: 38 mg, 59.7 μmol (1.0 Äq.) Boc-(*S*)-Leu-(*R*)-Pro-(*S,S*)+(*R,R*)-Azi(OBn)(OEtPh);
 6 mg, Pd/C;
 5 ml Methanol.
- Ausbeute: 31 mg, 56.8 μmol , 95 %, farbloses Öl.
- HPLC (a): $R_t = 16.60$ min (Methode A), Reinheit 78 %.
- Epimerenverhältnis: 1:1:0.7:0.3 (bestimmt über ^{13}C -NMR-Spektrum anhand der Signale für Pro- α -CH).
- ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_8$, 545.27; gef.: 568.27 [M+Na] $^+$.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2962 (w), 1740 (m), 1707 (s), 1638 (m), 1507 (w), 1458 (w), 1372 (w), 1245 (w), 1168(s), 1127 (w), 1045 (w), 874 (w), 747 (m), 694 (s).
- $[\alpha]_D^{22}$: -1.4° (c = 0.7, MeOH).
- $^1\text{H-NMR}$: (MeOD, 300 MHz), δ [ppm] = 7.40-7.05 (m, 5 H, Ar-CH), 4.69-4.17 (m, 4 H, Leu- α -CH, Pro- α -CH, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.89-3.63 (m, 1 H, Pro- δ -CH $_2$), 3.61-3.29 (m, 3 H, Pro- δ' -CH $_2$, 2 x Azi-CH), 2.94 (t, 2 H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $^3J = 6.6$ Hz), 2.39-1.78 (m, 4 H, Pro- β -CH $_2$, Pro- γ -CH $_2$), 1.77-1.56 (m, 1 H, Leu- γ -CH), 1.54-1.20 (m, 11 H, Leu- β -CH $_2$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.01-0.76 (m, 6 H, Leu- δ -CH $_3$, Leu- δ' -CH $_3$).

^{13}C -NMR: (MeOD, 75 MHz), δ [ppm] = 180.89 (Pro-CO), 174.38 (Leu-CO), 167.36, 167.30 (Azi-CO), 158.07, 157.65 (Boc-CO), 138.98, 138.93 (Ar-C_q), 130.08, 130.04, 129.58, 127.73, 127.67 (Ar-CH), 80.52, 80.46 (C(CH₃)₃), 67.66 (CO₂CH₂CH₂), 62.39, 61.97, 61.91 (Pro- α -CH), 51.96, 51.86 (Leu- α -CH), 47.90, 47.72, (Pro- δ -CH₂), 42.09 (Leu- β -CH₂), 41.24, 41.11, 40.85, 40.80, 40.54 (Azi-CH), 35.77 (CO₂CH₂CH₂), 28.71 (Pro- β -CH₂, C(CH₃)₃), 25.83, 25.41 (Leu- γ -CH, Pro- γ -CH₂), 23.69 (Leu- δ -CH), 22.03, 21.87 (Leu- δ' -CH).

(2S,3S)+(2R,3R)-1-[N-(tert-Butoxycarbonyl)-(S)-leucyl-(R)-prolyl]-3-(3-phenylpropyl)oxycarbonyl-aziridin-2-carbonsäure



Laborkürzel: PF400.X
 Bezeichnung: Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OH)(OPrPh)
 Molekularmasse: 559.65 g/mol

Methode: 7.

Ansatz: 23 mg, 35.4 μmol (1.0 Äq.) Boc-(S)-Leu-(R)-Pro-(S,S)+(R,R)-Azi(OBn)(OPrPh);
 5 mg, Pd/C;
 2 ml Methanol.

Ausbeute: 19.4 mg, 34.7 μmol , 98 %, farbloses Öl.

HPLC (a): R_t = 17.29 min (Methode P_a), Reinheit 99 %.

Epimerenverhältnis: 1:1 (bestimmt über ^{13}C -NMR-Spektrum anhand der Signale für Pro- β -CH₂).

ESI-MS: ber. f. C₂₉H₄₁N₃O₈, 559.29; gef.: 582.29 [M+Na]⁺, 598.25 [M+K]⁺.

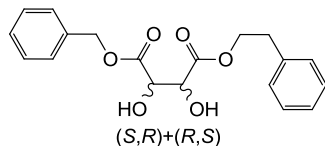
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2949 (w) 1736 (m) 1707 (s), 1638 (s), 1450 (m), 1368 (w), 1254 (w), 1164 (s) 1021 (w), 743 (w), 689 (m).

$[\alpha]_D^{23}$: nd.

- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.30-7.10 (m, 5 H, Ar-CH), 4.78-4.56 (m, Leu-α-CH), 4.51-4.30 (m, 1 H, Pro-α-CH), 4.24-4.07 (m, 2 H, CO₂CH₂CH₂), 3.91-3.69 (m, 1 H, Pro-δ-CH₂), 3.67-3.32 (m, 3 H, Pro-δ'-CH₂, 2 x Azi-CH), 2.69 (t, 2 H, CO₂CH₂CH₂, ³J = 6.9 Hz), 2.39-1.83 (m, 6 H, Pro-β-CH₂, Pro-γ-CH₂, CH₂CH₂Ph), 1.79-1.57 (m, 1 H, Leu-γ-CH), 1.55-1.33 (m, 11 H, Leu-β-CH₂, C(CH₃)₃), 1.02-0.80 (m, 6 H, Leu-δ-CH₃, Leu-δ'-CH₃).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 179.59, 179.56 (Pro-CO), 172.81 (Leu-CO), 166.45, 166.35, 166.12 (Azi-CO), 156.64, 156.27 (Boc-CO), 141.14, 141.03 (Ph-C_q), 128.14, 128.08, 125.65 (Ar-CH), 79.17 (C(CH₃)₃), 65.23, 65.20 (CO₂CH₂CH₂), 60.62 (Pro-α-CH), 50.51 (Leu-α-CH), 46.65, 46.54 (Pro-δ-CH₂), 42.61, 42.20 (Leu-β-CH₂), 40.75, 40.42, 40.25, 39.82 (Azi-CH), 31.65, 31.63 (CH₂CH₂Ph), 29.86, 29.83 (CH₂CH₂CH₂), 28.67, 28.23 (Pro-β-CH₂), 27.37, 27.33 (C(CH₃)₃), 24.44, 24.42, 24.31 (Leu-γ-CH, Pro-γ-CH₂), 22.31, 22.29 (Leu-δ-CH), 20.67, 20.50 (Leu-δ'-CH).

10.4 (2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-Aziridin-2,3-dicarboxylat

(2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-1-Benzyl-4-(2-phenylethyl)-tartrat

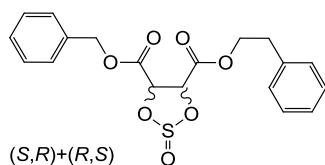


Laborkürzel: PF354.153A

Bezeichnung: -

Molekularmasse: 344.36 g/mol

- Methode: 13a.
- Ansatz: 4.53 g, 14.6 mmol (1.0 Äq.) 1-Benzyl-4-(2-phenylethyl)-(2*Z*)-but-2-endoat;
 11.0 mg, 29.2 μ mol (0.2 mol%) Kaliumosmat(VI)dihydrat;
 3.76 g, 16.0 mmol (1.1 Äq.) NMO (50% in H₂O);
 2.30 g, 10.9 mmol (0.75 Äq.) Zitronensäure;
 15 ml Wasser/*tert*-Butanol [1:1].
- R_f: 0.28 (Petrolether/Ethylacetat [2:1]).
- Ausbeute: 4.84 g, 14.0 mol, 96 %, farbloser Feststoff.
- Epimerenverhältnis: (S,R):(R,S):(S,S):(R,R) 1:1:0.17:0.17 (bestimmt über ¹³C-NMR-Spektrum anhand der Signale für den 2-Phenylethylester-CO₂CH₂CH₂).
- ESI-MS: ber. f. C₁₉H₂₀O₆, 344.13; gef.: 367.14 [M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3370 (m), 3039 (w), 1728 (s), 1499 (w), 1454 (w), 1237 (m), 1180 (w), 1094 (s), 959 (w), 886 (w), 730 (m), 690 (s).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.47-7.28 (m, 8 H, Ar-CH), 7.26-7.11 (m, 2 H, Ar-CH), 5.26-5.00 (m, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.70-4.56 (m, 2 H, 2 x CHOH), 4.29 (t, 2 H, CO₂CH₂CH₂, ³J = 7.2 Hz), 3.54 (br s, 2 H, 2 x CHOH), 2.84 (t, 2 H, CO₂CH₂CH₂, ³J = 7.2 Hz).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 170.97, 170.92 (CO), 137.04, 134.66 (Ar-C_q), 128.81, 128.79, 128.76, 128.66, 128.59, 126.76 (Ar-CH), 73.07, 73.02 (CHOH), 68.03 (CO₂CH₂Ph), 66.37 (CO₂CH₂CH₂), 34.65 (CO₂CH₂CH₂).

(4*S*,5*R*)+(4*R*,5*S*)-4-Benzyl-5-(2-phenylethyl)-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat

Laborkürzel: PF357.156A

Bezeichnung: -

Molekularmasse: 390.41 g/mol

Methode: 13b.

Ansatz: 4.74 g, 14.6 mmol (1.0 Äq.) (2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-1-Benzyl-4-(2-phenylethyl)-tartrat;

1.80 g, 15.1 mmol, (1.2 Äq.) Thionylchlorid;

27 mg, 369 μ mol, (2.7 mol%) DMF;

25 ml Dichlormethan.

R_f: 0.43 (Petrolether/Ethylacetat [2:1]).

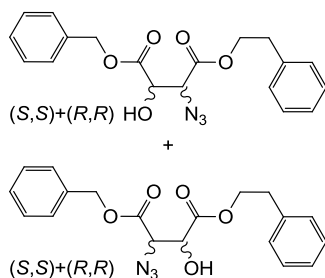
Ausbeute: 5.24 g, 13.5 mol, 98 %, gelbes Öl.

Epimerenverhältnis: (*S,R*):(*R,S*):(*S,S*):(*R,R*) 1:1:0.18:0.18 (bestimmt über ¹H-NMR-Spektrum anhand der Signale für die 2-Phenylethylester-Protonen CO₂CH₂CH₂).

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.42-7.11 (m, 10 H, Ar-CH), 5.51, 5.47 (je d, 2 H, 2 x Thio-CH, ³J = 7.1 Hz), 5.18, 5.11 (je d, 2 H, CO₂CH₂Ph, ²J = 12.0 Hz), 4.26, 4.13 (je t, 2 H, CO₂CH₂CH₂, ³J = 7.2 Hz), 2.85 (t, 2 H, CO₂CH₂CH₂, ³J = 7.1 Hz).

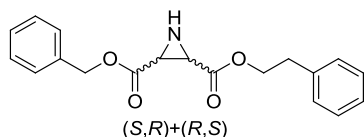
Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung und Charakterisierung direkt der Umsetzung zum entsprechenden Azidoalkohol zugeführt.

**(2S,3S)+(2R,3R)-1-Benzyl-4-(2-phenylethyl)-3-azido-2-hydroxysuccinat und
(2S,3S)+(2R,3R)-4-Benzyl-1-(2-phenylethyl)-3-azido-2-hydroxysuccinat**



Laborkürzel: PF360.157A
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 369.37 g/mol

- Methode: 13c.
- Ansatz: 5.10 g, 13.2 mmol (1.0 Äq.) (4S,5R)+(4R,5S)-4-Benzyl-5-(2-phenylethyl)-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat;
 1.71 g, 26.4 mmol (2.0 Äq.) Natriumazid;
 20 ml DMF.
- R_f: 0.38 (Petrolether/Ethylacetat [3:1]).
- Ausbeute: 4.44 g, 12.0 mol, 91 %, farbloses Öl.
- Konst.-Isom.-verh.: 2x[(S,S)+(R,R)]:2x[(S,R)+(R,S)] 1:0.18 (bestimmt über ¹³C-NMR an CHOH).
- ESI-MS: ber. f. C₁₉H₁₉N₃O₅, 369.13; gef.: 392.14 [M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2962 (w), 1744 (w), 1421 (w), 1254 (s), 1008 (s), 861 (w), 780 (s), 694 (w).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.38-7.21 (m, 8 H, Ar-CH), 7.18-7.11 (m, 2 H, Ar-CH), 5.27-5.16 (m, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.69-4.63 (br s, 1 H, CHOH), 4.51-4.31 (m, 2 H, CO₂CH₂CH₂), 4.12, 4.08 (je d, 1 H, CHN₃, ³J = 2.2 Hz), 3.11 (br s, 1 H, CHOH), 2.93 (je t, 2 H, CO₂CH₂CH₂, ³J = 7.0 Hz).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 171.11, 167.52 (CO), 137.18, 136.97, 134.82, 134.58 (Ar-C_q), 129.07, 129.01, 128.92, 128.87, 128.85, 128.82, 128.77, 128.72, 128.70, 128.63, 128.62, 127.04, 126.94 (Ar-CH), 72.16, 72.07 (CHOH), 68.61, 68.33 (CO₂CH₂Ph), 67.16, 67.03 (CO₂CH₂CH₂), 63.43 (CHN₃), 35.03, 34.98 (CO₂CH₂CH₂).

(2S,3R+2R,3S)-2-Benzyl-3-(2-phenylethyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat

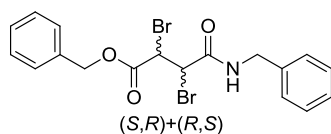
Laborkürzel: PF361.158A
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 325.36 g/mol

- Methode: 13d.
- Ansatz: 4.18 g, 11.3 mmol (1.0 Äq.) (2S,3S)+(2R,3R)-1-Benzyl-4-(2-phenylethyl)-3-azido-2-hydroxysuccinat und (2S,3S)+(2R,3R)-4-Benzyl-1-(2-phenylethyl)-3-azido-2-hydroxysuccinat;
 3.26 g, 12.4 mmol (1.1 Äq.) Triphenylphosphan;
 150 ml Dimethylformamid.
- Rf: 0.73 (Petrolether/Ethylacetat [2:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 65.0 mg, 199 μ mol, 1.7 %, gelbliches Öl.
- Epimerenverhältnis: (S,R):(R,S):(S,S):(R,R) 1:1:0.48:0.48 (bestimmt über ^{13}C -NMR-Spektrum anhand der Signale für die Carbonyl-Cs CO).
- ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_4$, 325.17; gef.: 652.30 [2M+2H] $^+$, 674.28 [2M+H+Na] $^+$, 690.27 [2M+H+K] $^+$.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2958 (w), 1732 (s), 1601 (w), 1495 (w), 1450 (w), 1188 (s), 1115 (w), 976 (w), 743 (m), 690(s).
- ^1H -NMR: (CDCl_3 , 300 MHz), δ [ppm] = 7.46-7.28 (m, 7 H, Ar-CH), 7.25-7.09 (m, 3 H, Ar-CH), 5.24-5.08 (m, 2 H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 4.43-4.21 (m, 2 H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.03-2.78 (m, 4 H, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, 2 x Azi-CH), 1.68 (s, 1H, NH).
- ^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 75 MHz), δ [ppm] = 171.74, 169.84 (CO), 137.49, 137.12, 135.37, 134.78 (Ar- C_q), 128.99, 128.74, 128.69, 128.63, 126.83, 126.70 (Ar-CH), 67.01 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 66.48 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 35.28, 34.91, 34.84 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ + 2 x Azi-CH).

10.5 Diverses, Testreaktionen und Nebenprodukte

10.5.1 Dibrom-Route

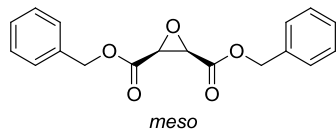
(2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-1-Benzylamid-4-benzylester-2,3-dibrombutan



Laborkürzel: PF340.142C
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 455.14 g/mol

- Methode: 14.
- Ansatz: 1.50 g, 5.10 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-4-oxo-*N*-Benzyl-(2*E*)-but-2-enamid;
 896 mg, 287 µl, 5.61 mmol (1.1 Äq.) Brom;
 50 ml Dichlormethan.
- R_f: 0.46 (Petrolether/Ethylacetat [4:1]).
- SC: Petrolether /Ethylacetat [49:1].
- Ausbeute: 1.88 g, 4.13 mmol, 81 %, gelblicher Feststoff.
- ESI-MS: ber. f. C₁₈H₁₇Br₂NO₃, 452.96; gef.: 320.00 [M-2Br], 322.00 [M-2Br], 475.99 [M+Na]⁺, 477.98 [M+Na]⁺, 479.97 [M+Na]⁺.
- Smp: 128 °C.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3284 (w), 3027 (w), 1732 (s), 1650 (s), 1548 (w), 1454 (w), 1303 (m), 1160 (m), 1053 (w), 967 (w), 894 (w), 739 (m), 686 (s).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.41-7.18 (m, 10 H, Ar-CH), 6.55 (t, 1 H, NH, ³J = 5.2 Hz), 5.16 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.86, 4.61 (je d, 2 H, 2 x CHBr, ³J = 10.7 Hz), 4.45 (dd, 2 H, CONHCH₂Ph, ³J = 8.1, 5.8 Hz).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 167.20 (CO), 165.59 (CON), 137.14 (NHCH₂Ar-C_q), 134.62 (Ar-C_q), 128.92, 128.80, 128.76, 128.45, 127.94, 127.92 (Ar-CH), 68.43 (CO₂CH₂Ph), 44.80 (CHBr), 44.33 (CONHCH₂Ph), 42.86 (CHBr).

10.5.2 Epoxid-Route

meso-(S,R)-Dibenzyl-oxiran-2,3-dicarboxylat

Laborkürzel: PF311.135A
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 318.36 g/mol

Methode: 15.

Ansatz: 260 mg, 877 μmol (1.0 Äq.) Dibenzyl-(2Z)-but-2-endioat;
 219 μl , 1.32 mmol (1.5 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid in Hexan (6.0 M);
 603 μl , 970 μmol (1.1 Äq.) *n*-Butyllithium in *n*-Hexan (1.6 M);
 2 ml THF abs.

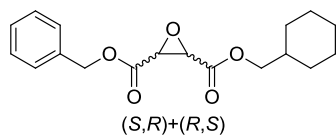
R_f: 0.24 (Petrolether/Ethylacetat [4:1]).

SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].

Ausbeute: 109 mg, 350 μmol , 40 %, farbloses Öl.

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.41-7.28 (m, 10 H, Ar-CH), 5.09 (s, 2 H, CO₂CH₂Ph), 3.73 (s, 2 H, 2 x Epox-CH).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.²⁰⁹

(2S,3R)+(2R,3S)-2-Benzyl-3-(cyclohexylmethyl)-oxiran-2,3-dicarboxylat

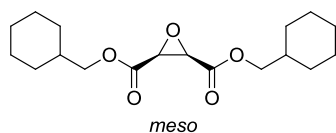
Laborkürzel: PF318.130B
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 318.36 g/mol

Methode: 15.

Ansatz: 1.00 g, 3.31 mmol (1.0 Äq.) 1-Benzyl-4-cyclohexylmethyl-(2Z)-but-2-endioat;
 0.83 ml, 4.96 mmol (1.5 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid in Hexan (6.0 M);
 2.27 ml, 3.62 mmol (1.1 Äq.) *n*-Butyllithium in *n*-Hexan (1.6 M);

	5 ml THF abs.
R _f :	0.41 (Petrolether/Ethylacetat [4:1]).
SC:	Petrolether/Ethylacetat [49:1].
Ausbeute:	118 mg, 3.70 mmol, 11 %, gelbliches Öl.
Epimerenverhältnis:	(<i>S,R</i>):(<i>R,S</i>):(<i>S,S</i>):(<i>R,R</i>) 1:1:0.25:0.25 (bestimmt über ¹ H-NMR-Spektrum anhand der Signale für Epox-CH)
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3174 (w), 2937 (w), 2851 (w), 1736 (s), 1499 (w), 1454 (m), 1348 (m), 1176 (s), 1066 (m), 996 (m), 865 (w), 747 (s), 698 (s).
ESI-MS:	ber. f. C ₁₈ H ₂₂ O ₅ , 318.15; gef.: 319.17 [M+H] ⁺ , 341.15 [M+Na] ⁺ , 659.31 [2M+Na] ⁺ .
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.41-7.28 (m, 5 H, Ar-CH), 5.18 (s, 2 H, CO ₂ CH ₂ Ph), 3.95-3.78 (m, 2 H, CO ₂ CH ₂ Cy), 3.73-3.67 (m, 2 H, 2 x Epox-CH), 1.79-1.47 (m, 6 H, 2 x Cy-2-CH _{eq} H, 2 x Cy-3-CH _{eq} H, 1 x Cy-1-CH, 1 x Cy-4-CH _{eq} H), 1.39-1.06 (m, 3 H, 2 x Cy-3-CHH _{ax} , 1 x Cy-4-CHH _{ax}), 1.01-0.76 (m, 2 H, 2 x Cy-2-CHH _{ax}).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 165.73, 165.62 (CO), 134.74 (Ar-C _q), 128.68, 128.65 (Ar-CH), 71.00 (CO ₂ CH ₂ Cy), 67.62 (CO ₂ CH ₂ Ph), 52.71, 52.58 (Epox-CH), 36.75 (Cy-1-CH), 29.39 (Cy-2-CH ₂), 26.24 (Cy-4-CH ₂), 25.53 (Cy-3-CH ₂).

meso-(*S,R*)-Bis(cyclohexylmethyl)-oxiran-2,3-dicarboxylat



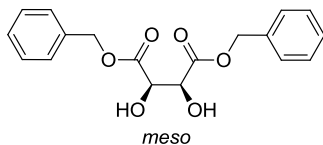
Laborkürzel:	PF320.130C_NP
Bezeichnung:	-
Molekularmasse:	324.41 g/mol

Als Nebenprodukt isoliert. Entstanden durch Umesterung aus einer Reaktion analog zur beschriebenen Darstellung von *meso*-2-Benzyl-3-(cyclohexylmethyl)-oxiran-2,3-dicarboxylat.

Methode:	15.
Ansatz:	2.00 g, 6.61 mmol (1.0 Äq.) 1-Benzyl-4-cyclohexylmethyl-(<i>ZZ</i>)-but-2-endioat;

- 1.65 ml, 9.92 mmol (1.5 Äq.) *tert*-Butylhydroperoxid in Hexan (6.0 M);
4.54 ml, 7.27 mmol (1.1 Äq.) *n*-Butyllithium in *n*-Hexan (1.6 M);
10 ml THF abs.
- R_f: 0.58 (Petrolether/Ethylacetat [4:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [49:1].
- Ausbeute: 485 mg, 1.49 mmol, 22 %, farbloses Öl.
- Epimerenverhältnis: (*S,R*):(*S,S*):(*R,R*) 1:0.07:0.07 (bestimmt über ¹³C-NMR-Spektrum anhand der Signale für Epox-CH).
- ESI-MS: ber. f. C₁₈H₂₈O₅, 324.19; gef.: 325.21 [M+H]⁺, 347.20 [M+Na]⁺, 363.17 [M+K]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2917 (s), 2851 (s), 1736 (s), 1446 (m), 1392 (w), 1356 (w), 1188 (s), 1106 (w), 1061 (m), 988 (m), 890 (w), 861 (w), 837 (w), 800 (w), 730 (w).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 3.98-3.81 (m, 4 H, 2 x CO₂CH₂Cy), 3.62 (s, 2 H, 2 x Epox-CH), 1.75-1.49 (m, 12 H, 4 x Cy-2-CH_{eq}H, 4 x Cy-3-CH_{eq}H, 2 x Cy-1-CH, 2 x Cy-4-CH_{eq}H), 1.26-1.03 (m, 6 H, 4 x Cy-3-CHH_{ax}, 2 x Cy-4-CHH_{ax}), 0.98-0.76 (m, 4 H, 4 x Cy-2-CHH_{ax}).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 165.72 (CO), 70.91 (CO₂CH₂Cy), 52.55 (Epox-CH), 36.80 (Cy-1-CH), 29.40 (Cy-2-CH₂), 26.18 (Cy-4-CH₂), 25.50 (Cy-3-CH₂).

10.5.3 Tartrat-Route

meso-(S,R)-Dibenzyltartrat

Laborkürzel: PF342.145A
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 330.33 g/mol

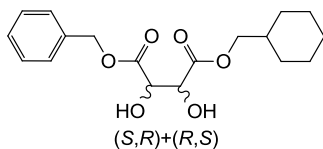
Methode: 13a.

Ansatz: 296 mg, 1 mmol (1.0 Äq.) Dibenzyl-(2*Z*)-but-2-endioat;
 1 mg, 2 μ mol (0.2 mol%) Kaliumosmat(VI)dihydrat;
 270 mg, 1.1 mmol (1.1 Äq.) NMO (50% in H₂O);
 158 mg, 750 μ mol (0.75 Äq.) Zitronensäure;
 2 ml Wasser/*tert*-Butanol [1:1].

Ausbeute: 240 mg, 726 μ mol, 72 %, farbloser Feststoff.

¹H-NMR: (CDCl₃, 400 MHz), δ [ppm] = 7.38-7.31 (m, 6 H, Ar-CH), 7.29-7.22 (m, 4 H, Ar-CH), 5.08, 5.04 (je d, 4 H, 2 x CO₂CH₂Ph), 4.60 (s, 2 H, 2 x CHOH), 3.14 (br s, 2 H, 2 x CHOH).

Die analytischen Daten entsprechen den Literaturangaben.^{163,210}

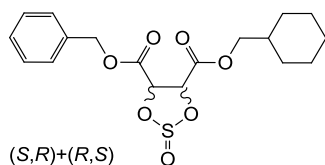
(2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-1-Benzyl-4-cyclohexylmethyl-tartrat

Laborkürzel: PF343.146A
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 336.38 g/mol

Methode: 13a.

Ansatz: 500 mg, 1.65 mmol (1.0 Äq.) 1-Benzyl-4-cyclohexylmethyl-(2*Z*)-but-2-endioat;
 1 mg, 2 μ mol (0.2 mol%) Kaliumosmat(VI)dihydrat;
 426 mg, 3.64 mmol (1.1 Äq.) NMO (50% in H₂O);

- 260 mg, 1.24 mmol (0.75 Äq.) Zitronensäure;
- 2 ml Wasser/*tert*-Butanol [1:1].
- R_f: 0.90 (Petrolether/Ethylacetat [4:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 557 mg, 1.65 mol, > 99 %, farbloser Feststoff.
- Epimerenverhältnis: (S,R):(R,S):(S,S):(R,R) 1:1:0.2:0.2 (bestimmt über ¹H-NMR-Spektrum anhand der Signale für die Cyclohexylmethylester-Protonen CO₂CH₂Cy).
- ESI-MS: ber. f. C₁₈H₂₂O₄, 336.16; gef.: 337.19 [M+H]⁺, 359.15 [M+Na]⁺, 695.35 [2M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3378 (m), 2921 (m), 2847 (w), 1736 (s), 1495 (w), 1437 (w), 1241 (m), 1176 (m), 1094 (s), 972 (w), 894 (w), 694 (m).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.45-7.30 (m, 5 H, Ar-CH), 5.23, 5.16 (je d, 2 H, CO₂CH₂Ph, ²J = 12.0 Hz), 4.61, 4.57 (je d, 2 H, 2 x CHOH, ³J = 2.3 Hz), 3.87, 3.85 (je d, 2 H, CO₂CH₂Cy, ²J = 3.9 Hz), 3.15 (br s, 2 H, 2 x CHOH), 1.83-1.38 (m, 6 H, 2 x Cy-2-CH_{eq}H, 2 x Cy-3-CH_{eq}H, 1 x Cy-1-CH, 1 x Cy-4-CH_{eq}H), 1.36-1.01 (m, 3 H, 2 x Cy-3-CHH_{ax}, Cy-4-CHH_{ax}), 0.99-0.75 (m, 2 H, 2 x Cy-2-CHH_{ax}).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 171.16, 170.92 (CO), 134.50 (Ar-C_q), 128.81, 128.76, 128.67 (Ar-CH), 72.97, 72.91 (CHOH), 71.44 (CO₂CH₂Cy), 68.16 (CO₂CH₂Ph), 36.72 (Cy-1-CH), 29.43, 29.34 (Cy-2-CH₂), 26.19 (Cy-4-CH₂), 25.49, 25.47 (Cy-3-CH₂).

(4*S*,5*R*)+(4*R*,5*S*)-4-Benzyl-5-cyclohexylmethyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat

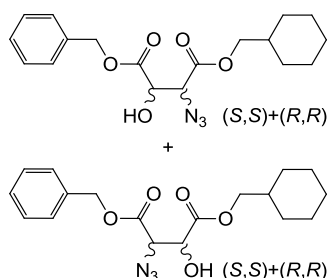
Laborkürzel: PF355.154A

Bezeichnung: -

Molekularmasse: 382.43 g/mol

- Methode: 13b.
- Ansatz: 504 mg, 1.49 mmol (1.0 Äq.) (2*S*,3*R*)+(2*R*,3*S*)-1-Benzyl-4-cyclohexylmethyl-tartrat;
214 mg, 1.79 mmol, (1.2 Äq.) Thionylchlorid;
3 mg, 40.0 μ mol, (2.7 mol%) DMF;
5 ml Dichlormethan.
- R_f: 0.34 (Petrolether/Ethylacetat [2:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [4:1].
- Ausbeute: 565 mg, 1.47 mol, 98 %, gelblicher Feststoff.
- Epimerenverhältnis: (*S,R*):(*R,S*):(*S,S*):(*R,R*) 1:1:0.6:0.6 (bestimmt über ¹H-NMR-Spektrum anhand der Signale für die Cyclohexylmethylester-Protonen CO₂CH₂Cy).
- ESI-MS: ber. f. C₁₈H₂₂O₇S, 382.11; gef.: 383.14 [M+H]⁺, 405.13 [M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2921 (w), 2847 (w), 1740 (m), 1499 (w), 1450 (w), 1392 (w), 1192 (s), 1111 (w), 976 (w), 751 (m), 698 (m).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.43-7.29 (m, 5 H, Ar-CH), 5.51 (s, 2 H, 2 x Thio-CH), 5.22, 5.15 (je d, 2 H, CO₂CH₂Ph, ²J = 12.0 Hz), 3.86, 3.69 (je d, 2 H, CO₂CH₂Cy, ²J = 6.6 Hz), 1.85-1.40 (m, 6 H, 2 x Cy-2-CH_{eq}H, 2 x Cy-3-CH_{eq}H, 1 x Cy-1-CH, 1 x Cy-4-CH_{eq}H), 1.33-1.02 (m, 3 H, 2 x Cy-3-CHH_{ax}, Cy-4-CHH_{ax}), 1.01-0.69 (m, 2 H, 2 x Cy-2-CHH_{ax}).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 171.19, 170.95 (CO), 134.08 (Ar-C_q), 128.91, 128.79, 128.67 (Ar-CH), 78.75, 78.65 (Thio-CH), 71.77 (CO₂CH₂Cy), 68.59 (CO₂CH₂Ph), 36.63 (Cy-1-CH), 29.34 (Cy-2-CH₂), 26.20 (Cy-4-CH₂), 25.49 (Cy-3-CH₂).

**(2S,3S)+(2R,3R)-1-Benzyl-4-cyclohexylmethyl-3-azido-2-hydroxysuccinat und
(2S,3S)+(2R,3R)-4-Benzyl-1-cyclohexylmethyl-3-azido-2-hydroxysuccinat**

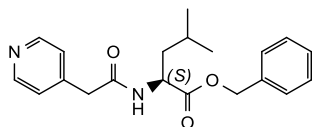


Laborkürzel: PF356.155A
 Bezeichnung: -
 Molekularmasse: 361.93 g/mol

- Methode: 13c.
- Ansatz: 447 mg, 1.21 mmol (1.0 Äq.) (4*S*,5*R*)+(4*R*,5*S*)-4-Benzyl-5-cyclohexyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat;
 163 mg, 2.43 mmol (2.0 Äq.) Natriumazid;
 5 ml DMF.
- R_f: 0.68 (Petrolether/Ethylacetat [3:1]).
- SC: Petrolether/Ethylacetat [9:1].
- Ausbeute: 369 mg, 1.02 mol, 83 %, gelblicher Feststoff.
- Konst.-isom.-verh.: 2x[(*S*,*S*)+(*R*,*R*):2x[(*S*,*R*)+(*R*,*S*)] 1:0.6 (bestimmt über ¹H-NMR-Spektrum anhand der Signale für die Benzylester-Protonen CO₂CH₂Ph).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.49-7.29 (m, 5 H, Ar-CH), 5.36-5.26 (m, 2 H, CO₂CH₂Ph), 4.79 (br s, 1 H, CHOH), 4.21 (d, 1 H, CHN₃, ³J = 2.2 Hz), 4.15-3.98 (m, 2 H, CO₂CH₂Cy), 3.27 (br s, 1 H, CHOH), 1.83-1.48 (m, 6 H, 2 x Cy-2-CH_{eq}H, 2 x Cy-3-CH_{eq}H, 1 x Cy-1-CH, 1 x Cy-4-CH_{eq}H), 1.36-1.07 (m, 3 H, 2 x Cy-3-CHH_{ax}, Cy-4-CHH_{ax}), 1.07-0.75 (m, 2 H, 2 x Cy-2-CHH_{ax}).

Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung und Charakterisierung direkt der Umsetzung zum entsprechenden Aziridin zugeführt. Die Zielverbindung konnte allerdings nicht isoliert werden.

10.5.4 PyAc-geschütztes Dipeptid

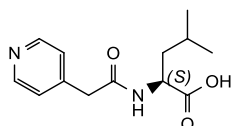
***N*-(2-(Pyridin-4-yl)acetyl)-(S)-leucinbenzylester**

Laborkürzel: PF308.133A
 Bezeichnung: PyAc-(S)-Leu-OBn
 Molekularmasse: 340.42 g/mol

- Methode: 11b.
- Ansatz: 2.00 g, 5.09 mmol (1.0 Äq.) (S)-Leu-OBn * *p*-TosOH;
 882 mg, 5.09 mmol (1.0 Äq.) 4-Pyridinessigsäure * Hydrochlorid;
 1.54 g, 15.25 mmol (3.0 Äq.) NMM;
 1.10 g, 5.34 mmol (1.05 Äq.) DCC;
 688 mg, 5.09 mmol (1.0 Äq.) HOBt;
 50 ml THF.
- R_f: 0.43 (Dichlormethan/Methanol [9:1]).
- SC: Dichlormethan/Methanol [99:1].
- Ausbeute: 946 mg, 2.77 mmol, 54 %, gelbliches Öl.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3031 (w), 2953 (m), 2864 (w), 1740 (s), 1646 (s), 1601 (m), 1535 (m), 1499 (w), 1450 (w), 1417 (w), 1188 (w), 1151 (w), 1070 (w), 996 (w), 955 (w), 800 (w), 743 (m), 694 (m).
- ESI-MS: ber. f. C₂₀H₂₄N₂O₃, 340.18; gef.: 341.16 [M+H]⁺, 363.19, [M+Na]⁺, 681.30 [2M+H]⁺, 703.38 [2M+Na]⁺.
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 8.53 (d, 2 H, Py-2-CH, ³J = 5.5 Hz), 7.41-7.28 (m, 5 H, Ar-CH), 7.22 (d, 2 H, Py-4-CH, ³J = 5.5 Hz), 6.18 (br s, 1 H, NH), 5.16, 5.11 (je d, 1 H, CO₂CH₂Ph, ²J = 12.2 Hz), 4.67 (dt, 1 H, Leu- α -CH, ³J = 8.5, 5.0 Hz), 3.57 (s, 2 H, COCH₂Py), 1.70-1.44 (m, 3 H, Leu- β -CH₂, Leu- γ -CH), 0.89, 0.87 (je d, 6 H, Leu- δ -CH₃, Leu- δ' -CH₃, ³J = 1.7 Hz).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 172.80, 168.90 (CO), 149.83 (Py-2-CH), 144.17 (Py-C_q), 135.27 (Ar-C_q), 128.76, 128.64, 128.37 (Ar-CH),

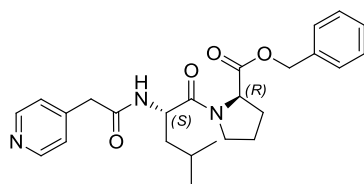
124.70 (Py-3-CH), 67.35 (CO₂CH₂Ph), 51.20 (Leu- α -CH), 42.74 (COCH₂Py), 41.40 (Leu- β -CH), 25.00 (Leu- γ -CH), 22.85 (Leu- δ -CH), 21.98 (Leu- δ' -CH).

N-(2-(Pyridin-4-yl)acetyl)-(***S***)-leucin



Laborkürzel: PF327.107D
 Bezeichnung: PyAc-(S)-Leu-OH
 Molekularmasse: 250.29 g/mol

- Methode: 7.
- Ansatz: 799 mg, 2.34 mmol (1.0 Äq.) PyAc-(S)-Leu-OBn;
 241 mg, Pd/C 10%;
 10 ml Methanol.
- Ausbeute: 569 mg, 2.27 mmol, 96 %, farbloses Öl.
- ESI-MS: ber. f. C₁₃H₁₈N₂O₃, 250.13; gef.: 251.16 [M+H]⁺, 273.15 [M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3317 (w), 3276 (w), 2925 (m), 2843 (w), 1719 (w), 1625 (s), 1552 (s), 1437 (m), 1335 (w), 1237 (w), 1164 (w), 1066 (w), 1017 (w), 886 (w), 820 (w), 735 (w).
- ¹H-NMR: (MeOD, 300 MHz), δ [ppm] = 8.34 (d, 2 H, Py-2-CH, ³J = 5.8 Hz), 7.30 (d, 2 H, Py-4-CH, ³J = 5.8 Hz), 4.28 (dd, 1 H, Leu- α -CH, ³J = 9.4, 4.8 Hz), 1.73 (dd, 1 H, COCHHPy, ²J = 12.5, ⁴J = 3.2 Hz), 1.66-1.42 (m, 3 H, Leu- β -CH₂, Leu- γ -CH), 1.02 (dd, 1 H, COCHHPy, ²J = 12.5, ⁴J = 3.2 Hz), 0.83, 0.78 (je d, Leu- δ -CH₃, Leu- δ' -CH₃, ³J = 5.9 Hz).
- ¹³C-NMR: (MeOD, 75 MHz), δ [ppm] = 175.86, 170.44 (CO), 148.43 (Py-2-CH), 146.41 (Py-C_q), 124.88 (Py-3-CH), 51.80 (Leu- α -CH), 40.62 (Leu- β -CH), 33.36 (COCH₂Py), 24.76 (Leu- γ -CH), 22.12 (Leu- δ -CH), 20.42 (Leu- δ' -CH).

N-(2-(Pyridin-4-yl)acetyl)-(S)-leucin-(R)-prolinbenzylester

Laborkürzel: PF331.134B
 Bezeichnung: PyAc-(S)-Leu-(R)-Pro-OBn
 Molekularmasse: 437.53 g/mol

- Methode: 4b.
- Ansatz: 516 mg, 2.06 mmol (1.0 Äq.) PyAc-(S)-Leu-OH;
 777 mg, 2.06 mmol (1.0 Äq.) (R)-Pro-OBn * *p*-TosOH;
 417 mg, 4.12 mmol (2.0 Äq.) NMM;
 468 mg, 2.26 mmol (1.05 Äq.) DCC;
 278 mg, 2.06 mmol (1.0 Äq.) HOBt;
 25 ml THF.
- R_f: 0.38 (Dichlormethan/Methanol [9:1]).
- SC: Dichlormethan/Methanol [99:1].
- Ausbeute: 160 mg, 248 µmol, 12 %, gelbliches Öl.
- Epimerenverhältnis: 1:0.35 (bestimmt über ¹³C-NMR-Spektrum anhand der Signale für den quartären C des Pyridinrings Py-C_q).
- ESI-MS: ber. f. C₂₅H₃₁N₃O₄, 437.23; gef.: 438.20 [M+H]⁺, 460.62 [M+Na]⁺, 875.45 [2M+H]⁺, 897.44 [2M+Na]⁺.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3027 (w), 2949 (m), 2868 (w), 1740 (m), 1629 (s), 1535 (m), 1437 (m), 1380 (w), 1266 (w), 1164 (s), 1090 (w), 992 (w), 808 (w), 739 (w), 698 (w).
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 8.50 (br s, 2 H, Py-2-CH), 7.37-7.27 (m, 5 H, Ar-CH), 7.20 (br s, 2 H, Py-4-CH), 5.12, 5.02 (je d, 2 H, CO₂CH₂Ph, ²J = 12.2 Hz), 4.88 (dd, 1 H, Leu- α -CH, ³J = 13.2, 8.7 Hz), 4.46 (d, 1 H, Pro- α -CH, ³J = 8.1 Hz), 3.94-3.35 (m, 5 H, NH, Pro- δ -CH₂, COCH₂Py), 2.31-1.74 (m, 4 H, Pro- γ -CH₂, Pro- β -CH₂), 1.70-1.40 (m, 3 H, Leu- β -

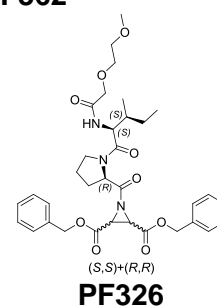
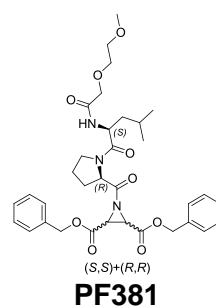
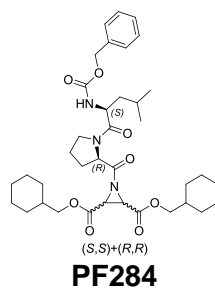
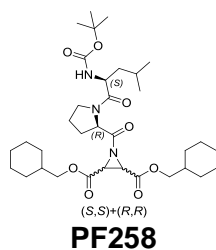
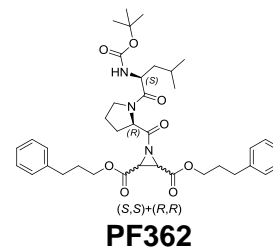
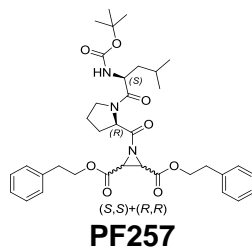
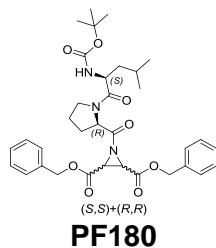
CH_2 , Leu- γ -CH), 0.92, 0.87 (je d, 6 H, Leu- δ - CH_3 , Leu- δ' - CH_3 , $^3J = 6.5$ Hz).

^{13}C -NMR: (CDCl_3 , 75 MHz), δ [ppm] = 171.47, 171.38, 168.97 (CO), 149.78, 149.73 (Py-2-CH), 144.48 (Py- C_q), 135.56 (Ar- C_q), 128.64, 128.09, 127.93 (Ar-CH), 124.61 (Py-3-CH), 66.77 ($\text{CO}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 59.19 (Pro- α -CH), 49.20 (Leu- α -CH), 47.08 (Pro- δ - CH_2), 42.08 (COCH_2Py), 41.35 (Leu- β - CH_2), 29.15 (Pro- β - CH_2), 24.77, 24.59 (Leu- γ -CH, Pro- γ - CH_2), 23.33 (Leu- δ -CH), 22.04 (Leu- δ' -CH).

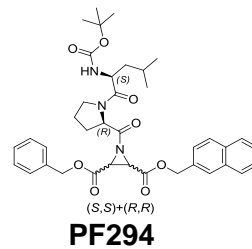
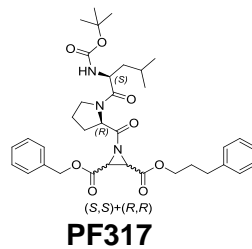
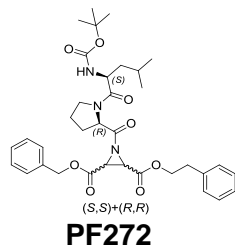
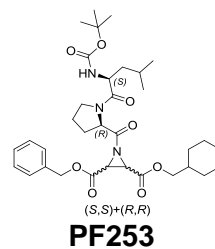
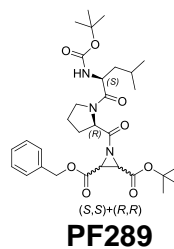
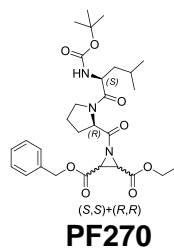
APPENDIX

11. Formelregister

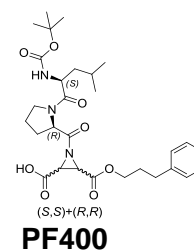
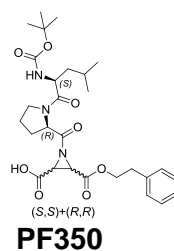
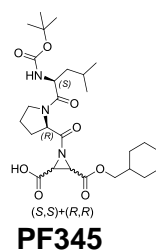
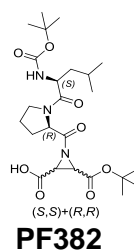
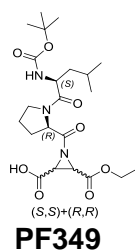
Symmetrische Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Inhibitoren



Unsymmetrische Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Inhibitoren



3-Carbonylaziridin-2-carbonsäure-basierte Inhibitoren



12. Abkürzungsverzeichnis

(±)	<i>trans</i> -konfiguriertes Diastereomerenpaar	de	Diastereomerenüberschuss
(Boc) ₂ O	Di- <i>tert</i> -butylpyrocarbonat	DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
1Cy	Cyclohexylmethyl	DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
2Naph	Naphthalin-2-ylmethyl	DMF	Dimethylformamid
2Ph	2-Phenylethyl	DMSO	Dimethylsulfoxid
3Ph	3-Phenylpropyl	DPSI	<i>S,S</i> -Diphenylsulfimin
abs.	absolut	EA	Ethylacetat
Abu	Buttersäure	EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ACN	Acetonitril	ESI-MS	Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie
Aib	Aminoisobuttersäure	Et	Ethyl
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>	EtOH	Ethanol
Ala	Alanin	EtPh	2-Phenylethyl
AMC	7-Amido-4-methylcoumarin	Fal-2	Falcipain-2
Äq.	Äquivalent	Fal-3	Falcipain-3
Arg	Arginin	Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
AS	Aminosäure	ges.	gesättigt
Asn	Asparagin	Gly	Glycin
Asp	Asparaginsäure	Gln	Glutamin
Azi	Aziridin	GlycAc	2-(2-Methoxyethoxy)acetyl
Azy	Aziridin-2-carboxylat	h	Stunde
BM	Bindungsmodus	HA	<i>heavy atom count</i>
Bn	Benzyl	His	Histidin
BnOH	Benzylalkohol	HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl	HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
Caa	offenkettige Aminosäure	hPhe	Homophenylalanin
Cath	Cathepsin	HPLC	high performance liquid chromatography
Cath-B	Cathepsin-B	i. Vak.	im Vakuum
Cath-L	Cathepsin-L	<i>i</i> Am	Isoamyl
Cbz	Benzoyloxycarbonyl	<i>t</i> Bu	Isobutyl
CD ₃ OD	deuteriertes Methanol	IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform	IL	Interleukin
Cha	Cyclohexylalanin	Ile	Isoleucin
Chg	Cyclohexylglycin	IR	Infrarotspektroskopie
clogP	<i>calculated logP</i>	kat.	katalytisch
CPA,CPB,CPC	<i>Leishmania</i> Cysteinproteasegruppen A,B,C	konz.	konzentriert
Cruz	Cruzain	<i>L. m.</i> (A)	<i>Leishmania-major</i> -Amastigoten
Cy	Cyclohexan	<i>L. m.</i> (P)	<i>Leishmania-major</i> -Promastigoten
Cys	Cystein	LE	Ligandeneffizienz
d	Tage	Leu	Leucin
DC	Dünnschichtchromatographie	LLE	lipophile Ligandeneffizienz
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid	Lsm.	Lösemittel
DCM	Dichlormethan	m	Multipllett

Me	Methyl	PropPh	3-Phenylpropyl
MeCy	Cyclohexylmethyl	<i>p</i> -TosOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
MeNaph	Naphthalin-2-ylmethyl	Py	Pyridin
MeOH	Methanol	PyAc	2-(Pyridin-4-yl)acetyl
min	Minute	R	Rest
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium	Rho	Rhodesain
nd	not determined	Rkt	Reaktion
NEt ₃	Triethylamin	ROH	Alkohol (unspezifisch)
NTD	<i>neglected tropical disease</i>	RT	Raumtemperatur
ni	no inhibition	SARS	<i>severe acute respiratory syndrome</i>
Nip	Nipecotinsäure	SC	Säulenchromatographie
Nle	Norleucin	SG	Schutzgruppe
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin	Smp.	Schmelzpunkt
NMO	<i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -oxid	<i>T. b. b.</i>	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>
NMR	Magnetische Kernresonanzspektroskopie	<i>t</i> Bu	tert-Butyl
Nva	Norvalin	<i>t</i> BuOH	tert-Butanol
<i>P. falc.</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>t</i> BuOOH	tert-Butylhydrogenperoxid
Pd/C	Palladium auf Kohlenstoff	TFA	Trifluoressigsäure
PDB	<i>protein data bank</i>	THF	Tetrahydrofuran
Pe	Petrolether	TMS-Cl	Trimethylsilylchlorid
Ph	Phenyl	Trp	Tryptophan
Phe	Phenylalanin	Tyr	Tyrosin
Phg	Phenylglycin	Val	Valin
PPA	Propylphosphonsäuretrianhydrid	WH	<i>warhead</i>
ppm	<i>parts per million</i>	WHO	<i>world health organization</i>
Pro	Prolin	Z	siehe Cbz, Benzyloxycarbonyl

13. Literaturverzeichnis

1. Hoppe, B. & Martens, J. Aminosäuren - Bausteine des Lebens. *Chemie unserer Zeit* **17**, Jahrg., 41–53 (1983).
2. Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Bateman, A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **27**, 325–331 (1999).
3. Rawlings, N. D., Tolle, D. P. & Barrett, A. J. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **32**, D160–4 (2004).
4. Salvesen, G. S. NIH Public Access. **9**, 690–701 (2010).
5. Turk, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 785–99 (2006).
6. Leung, D., Abbenante, G. & Fairlie, D. P. Protease inhibitors: current status and future prospects. *J. Med. Chem.* **43**, 305–41 (2000).
7. Madala, P. K., Tyndall, J. D. a, Nall, T. & Fairlie, D. P. Update 1 of: Proteases universally recognize beta strands in their active sites. *Chem. Rev.* **110**, PR1–31 (2010).
8. Castro, H. C. *et al.* Looking at the proteases from a simple perspective. *J. Mol. Recognit.* **24**, 165–81 (2011).
9. Fear, G., Komarnytsky, S. & Raskin, I. Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. *Pharmacol. Ther.* **113**, 354–68 (2007).
10. Deu, E., Verdoes, M. & Bogoy, M. New approaches for dissecting protease functions to improve probe development and drug discovery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 9–16 (2012).
11. Drag, M. & Salvesen, G. S. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 690–701 (2010).
12. Lipinski, C. a, Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 3–26 (2001).
13. Schechter, I. & Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. 1967. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**, 497–502 (2012).
14. IUBMB. IUBMB Nomenclature Home Page accessed on 28.10.2013. at <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/index.html>>
15. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. *Biochemie*. (Spektrum Akademischer Verlag, 2003).
16. Rawlings, N. D. & Barrett, a J. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* **290** (Pt 1, 205–18 (1993).
17. Atkinson, H. J., Babbitt, P. C. & Sajid, M. The global cysteine peptidase landscape in parasites. *Trends Parasitol.* **25**, 573–81 (2009).
18. Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Bateman, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **40**, D343–50 (2012).
19. Drenth, J., Jansonius, J. N., Koekoek, R., Swen, H. M. & Wolthers, B. G. Structure of Papain. *Nature* **218**, 929–932 (1968).
20. Husain, S. S. & Lowe, G. Completion of the amino acid sequence of papain. *Biochem. J.* **114**, 279–88 (1969).
21. Otto, H.-H. & Schirmeister, T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem. Rev.* **97**, 133–172 (1997).
22. Schilling, K., Pietschmann, S., Fehn, M., Wenz, I. & Wiederander, B. Folding Incompetence of Cathepsin L-Like Cysteine Proteases May Be Compensated by the Highly Conserved, Domain-Building N-Terminal Extension of the Proregion. *Biol. Chem.* **382**, 859–865 (2001).
23. Yamamoto, Y., Watabe, S., Kageyama, T. & Takahashi, S. Y. Proregion of Bombyx mori cysteine proteinase functions as an intramolecular chaperone to promote proper folding of the mature enzyme. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **42**, 167–78 (1999).

24. Kane, S. E. Abnormal Glycosylation of Procathepsin L Due to N-terminal Point Mutations Correlates with Failure to Sort to Lysosomes. *J. Biol. Chem.* **272**, 8808–8816 (1997).
25. Fox, T., De Miguel, E., Mort, J. S. & Storer, A. C. Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry* **31**, 12571–12576 (1992).
26. Carmona, E. *et al.* Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases. *Biochemistry* **35**, 8149–57 (1996).
27. Guo, Y. L. *et al.* The α 1/2 helical backbone of the prodomains defines the intrinsic inhibitory specificity in the cathepsin L-like cysteine protease subfamily. *FEBS Lett.* **469**, 203–207 (2000).
28. Lecaille, F., Kaleta, J. & Brömme, D. Human and Parasitic Papain-Like Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design. *Chem. Rev.* **102**, 4459–4488 (2002).
29. Hardegger, L. A. *et al.* Halogen bonding at the active sites of human cathepsin L and MEK1 kinase: efficient interactions in different environments. *ChemMedChem* **6**, 2048–54 (2011).
30. Rawlings, N. D., Morton, F. R., Kok, C. Y., Kong, J. & Barrett, A. J. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **36**, D320–5 (2008).
31. Turk, V. & Turk, B. Lysosomal Cysteine Proteases and Their Protein Inhibitors : Recent Developments. *Acta Chim. Slov* **55**, 727–738 (2008).
32. Kamphuis, I. G., Kalk, K. H., Swarte, M. B. & Drenth, J. Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **179**, 233–56 (1984).
33. Mirković, B. *et al.* Novel mechanism of cathepsin B inhibition by antibiotic nitroxoline and related compounds. *ChemMedChem* **6**, 1351–6 (2011).
34. RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB accessed on 27.11.2013. at <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>
35. Berman, H. M. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
36. Welcome to the Worldwide Protein Data Bank accessed on 27.11.2013. at <<http://www.wwpdb.org/>>
37. Berman, H., Henrick, K. & Nakamura, H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 980 (2003).
38. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC.
39. Cathers, B. E., Barrett, C., Palmer, J. T. & Ryzewski, R. M. pH Dependence of inhibitors targeting the occluding loop of cathepsin B. *Bioorg. Chem.* **30**, 264–275 (2002).
40. Musil, D. *et al.* The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.* **10**, 2321–30 (1991).
41. Shenoy, R. T. & Sivaraman, J. Structural basis for reversible and irreversible inhibition of human cathepsin L by their respective dipeptidyl glyoxal and diazomethylketone inhibitors. *J. Struct. Biol.* **173**, 14–9 (2011).
42. Ménard, R. *et al.* The specificity of the S1' subsite of cysteine proteases. *FEBS Lett.* **328**, 107–110 (1993).
43. Helten, H., Schirmeister, T. & Engels, B. Model Calculations about the Influence of Protic Environments on the Alkylation Step of Epoxide, Aziridine, and Thiirane Based Cysteine Protease Inhibitors. *J. Phys. Chem. A* **108**, 7691–7701 (2004).
44. Conus, S. & Simon, H.-U. Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 1374–82 (2008).
45. Conus, S. & Simon, H.-U. Cathepsins and their involvement in immune responses. *Swiss Med. Wkly.* **140**, w13042 (2010).
46. McKerrow, J. H., Rosenthal, P. J., Swenerton, R. & Doyle, P. Development of protease inhibitors for protozoan infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **21**, 668–72 (2008).
47. Renslo, A. R. & McKerrow, J. H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 701–10 (2006).

48. WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases First WHO report on neglected tropical diseases. (2010).
49. Utzinger, J. *et al.* Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Med. Wkly.* **142**, w13727 (2012).
50. Dostálová, A. & Volf, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit. Vectors* **5**, 276 (2012).
51. Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V. & Volf, P. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Euro Surveill.* **18**, 20540 (2013).
52. Kling, J. C. & Körner, H. Different regulatory mechanisms in protozoan parasitic infections. *Int. J. Parasitol.* **43**, 417–25 (2013).
53. Antinori, S., Schifanella, L. & Corbellino, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**, 109–18 (2012).
54. Handman, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 229–43 (2001).
55. Shapira, M. & Zinoviev, A. Leishmania parasites act as a Trojan horse that paralyzes the translation system of host macrophages. *Cell Host Microbe* **9**, 257–9 (2011).
56. Olivier, M., Gregory, D. J. & Forget, G. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 293–305 (2005).
57. Duthie, M. S., Raman, V. S., Piazza, F. M. & Reed, S. G. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. *Vaccine* **30**, 134–41 (2012).
58. Kidd, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.* **8**, 223–46 (2003).
59. Laskay, T., van Zandbergen, G. & Solbach, W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* **11**, 210–214 (2003).
60. Kappagoda, S., Singh, U. & Blackburn, B. G. Antiparasitic therapy. *Mayo Clin. Proc.* **86**, 561–83 (2011).
61. Von Stebut, E., Schleicher, U. & Bogdan, C. [Cutaneous leishmaniasis as travelers' disease. Clinical presentation, diagnostics and therapy]. *Hautarzt.* **63**, 233–46; 247–8 (2012).
62. Astelbauer, F. & Walochnik, J. Antiprotozoal compounds: state of the art and new developments. *Int. J. Antimicrob. Agents* **38**, 118–24 (2011).
63. Croft, S. L. & Olliaro, P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 1478–83 (2011).
64. Singh, N., Kumar, M. & Singh, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **5**, 485–97 (2012).
65. Schröder, J. *et al.* Identification of semicarbazones, thiosemicarbazones and triazine nitriles as inhibitors of Leishmania mexicana cysteine protease CPB. *PLoS One* **8**, e77460 (2013).
66. Huang, L., Brinen, L. S. & Ellman, J. A. Crystal structures of reversible ketone-Based inhibitors of the cysteine protease cruzain. *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 21–29 (2003).
67. Kerr, I. D. *et al.* Structures of falcipain-2 and falcipain-3 bound to small molecule inhibitors: implications for substrate specificity. *J. Med. Chem.* **52**, 852–7 (2009).
68. Kerr, I. D. *et al.* Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. *J. Biol. Chem.* **284**, 25697–703 (2009).
69. Kerr, I. D., Wu, P., Marion-Tsukamaki, R., Mackey, Z. B. & Brinen, L. S. Crystal Structures of TbCatB and rhodesain, potential chemotherapeutic targets and major cysteine proteases of Trypanosoma brucei. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, e701 (2010).
70. Singh, B. & Sundar, S. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine* **30**, 3834–42 (2012).

71. Olivier, M., Atayde, V. D., Isnard, A., Hassani, K. & Shio, M. T. Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect.* **14**, 1377–89 (2012).
72. Mottram, J. C., Coombs, G. H. & Alexander, J. Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 375–81 (2004).
73. Mahmoudzadeh-Niknam, H. & McKerrow, J. H. Leishmania tropica: cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. *Exp. Parasitol.* **106**, 158–63 (2004).
74. Sanderson, S. J. *et al.* Leishmania mexicana. **388**, 383–388 (2000).
75. Alves, L. C. *et al.* S1 subsite specificity of a recombinant cysteine proteinase, CPB, of Leishmania mexicana compared with cruzain, human cathepsin L and papain using substrates containing non-natural basic amino acids. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1206–12 (2001).
76. Polticelli, F. *et al.* Probing the cruzain S2 recognition subsite: a kinetic and binding energy calculation study. *Biochemistry* **44**, 2781–9 (2005).
77. Alves, L. C. *et al.* Analysis of the S(2) subsite specificities of the recombinant cysteine proteinases CPB of Leishmania mexicana, and cruzain of Trypanosoma cruzi, using fluorescent substrates containing non-natural basic amino acids. *Mol. Biochem. Parasitol.* **117**, 137–43 (2001).
78. Juliano, M. a *et al.* Differences in substrate specificities between cysteine protease CPB isoforms of Leishmania mexicana are mediated by a few amino acid changes. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3704–14 (2004).
79. Powers, J. C., Asgian, J. L., Ekici, O. D. & James, K. E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem. Rev.* **102**, 4639–750 (2002).
80. Schirmeister, T. & Klockow, a. Cysteine protease inhibitors containing small rings. *Mini Rev. Med. Chem.* **3**, 585–96 (2003).
81. Schaschke, N. (2S,3S)-Oxirane-2,3-dicarboxylic acid: a privileged platform for probing human cysteine cathepsins. *J. Biotechnol.* **129**, 308–15 (2007).
82. Schirmeister, T. New peptidic cysteine protease inhibitors derived from the electrophilic alpha-amino acid aziridine-2,3-dicarboxylic acid. *J. Med. Chem.* **42**, 560–72 (1999).
83. Satoyoshi, E. & Hospital, S. Satoyoshi. **31**, 841–846 (1992).
84. Gour-Salin, B. J., Lachance, P., Plouffe, C., Storer, a C. & Ménard, R. Epoxysuccinyl dipeptides as selective inhibitors of cathepsin B. *J. Med. Chem.* **36**, 720–5 (1993).
85. Vicik, R., Busemann, M., Baumann, K. & Schirmeister, T. Inhibitors of Cysteine Proteases. *Curr. Top. Med. Chem.* **6**, 331–353 (2006).
86. Schirmeister, T. Inhibition of cysteine proteases by peptides containing aziridine-2,3-dicarboxylic acid building blocks. *Biopolymers* **51**, 87–97 (1999).
87. Martichonok, V., Plouffe, C., Storer, a C., Ménard, R. & Jones, J. B. Aziridine analogs of [[trans-(epoxysuccinyl)-L-leucyl]amino]-4-guanidinobutane (E-64) as inhibitors of cysteine proteases. *J. Med. Chem.* **38**, 3078–85 (1995).
88. Mladenovic, M. *et al.* Atomistic insights into the inhibition of cysteine proteases: first QM/MM calculations clarifying the regiospecificity and the inhibition potency of epoxide- and aziridine-based inhibitors. *J. Phys. Chem. B* **112**, 5458–69 (2008).
89. Schirmeister, T. *et al.* Conformation and Hydrogen Bonding Properties of an Aziridinyl Peptide: X-ray Structure Analysis, Raman Spectroscopy and Theoretical Investigations. *J. Phys. Chem. A* **108**, 11398–11408 (2004).
90. Buback, V., Mladenovic, M., Engels, B. & Schirmeister, T. Rational design of improved aziridine-based inhibitors of cysteine proteases. *J. Phys. Chem. B* **113**, 5282–9 (2009).
91. Schirmeister, T. & Peric, M. Aziridinyl peptides as inhibitors of cysteine proteases: effect of a free carboxylic acid function on inhibition. *Bioorg. Med. Chem.* **8**, 1281–91 (2000).
92. Schirmeister, T. Aziridine-2,3-dicarboxylic Acid Derivatives as Inhibitors of Papain. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **329**, 239–244 (1996).

93. Gelhaus, C., Vicik, R., Schirmeister, T. & Leippe, M. Blocking effect of a biotinylated protease inhibitor on the egress of *Plasmodium falciparum* merozoites from infected red blood cells. *Biol. Chem.* **386**, 499–502 (2005).
94. Gelhaus, C. *et al.* Synthesis and antiplasmodial activity of a cysteine protease-inhibiting biotinylated aziridine-2,3-dicarboxylate. *Biol. Chem.* **385**, 435–8 (2004).
95. Vicik, R. *et al.* Aziridine-2,3-dicarboxylate inhibitors targeting the major cysteine protease of *Trypanosoma brucei* as lead trypanocidal agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 2753–7 (2006).
96. Vicik, R. *et al.* Aziridine-based inhibitors of cathepsin L: synthesis, inhibition activity, and docking studies. *ChemMedChem* **1**, 1126–41 (2006).
97. Ponte-Sucre, A., Vicik, R., Schultheis, M., Schirmeister, T. & Moll, H. Aziridine-2,3-dicarboxylates, peptidomimetic cysteine protease inhibitors with antileishmanial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2439–47 (2006).
98. Schad, C. Dissertation: Synthese und Testung neuartiger peptidomimetischer, selektiver Inhibitoren parasitärer Cystein-Proteasen. (2013).
99. Chowdhury, S. F. *et al.* Design of Noncovalent Inhibitors of Human Cathepsin L. From the 96-Residue Proregion to Optimized Tripeptides. *J. Med. Chem.* **45**, 5321–5329 (2002).
100. Bryson, K. *et al.* Overexpression of the natural inhibitor of cysteine peptidases in *Leishmania mexicana* leads to reduced virulence and a Th1 response. *Infect. Immun.* **77**, 2971–8 (2009).
101. Vicik, R. Dissertation: Synthese und Eigenschaften N-acylierter Aziridin-2,3-dicarboxylate als selektive, peptidomimetische Inhibitoren von Cystein-Proteasen der Cathepsin-L-Subfamilie. (2004).
102. Schad, C. (Julius-M.-U. W. Diplomarbeit: Synthese und Testung neuer N-acylierter Aziridin-2,3-carbonsäure-Derivate als Inhibitoren von parasitären Cystein-Proteasen. (2009).
103. Schulz, F. *et al.* Screening of protease inhibitors as antiplasmodial agents. Part I: Aziridines and epoxides. *ChemMedChem* **2**, 1214–24 (2007).
104. Ham, G. E. Activated Aziridines. I. Reaction of Anilines with O-Ethyl-N,N-Ethyleneurethane. Mechanism and Hammett p -Constant. *J. Org. Chem.* **29**, 3052–3055 (1964).
105. Stanković, S. *et al.* Regioselectivity in the ring opening of non-activated aziridines. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 643–65 (2012).
106. Berlin, K. D., Williams, L. G. & Dermer, O. C. Stereochemistry of the reaction of ammonia with diethyl bromofumarate and diethyl bromomaleate. *Tetrahedron Lett.* **9**, 873–876 (1968).
107. Cardillo, G., Gentilucci, L., Tomasini, C. & Castejon-Bordas, M. P. V. Synthesis of enantiomerically pure trans aziridine-2-carboxylates by diastereoselective Gabriel-cromwell reaction. *Tetrahedron: Asymmetry* **7**, 755–762 (1996).
108. Furukawa, N., Oae, S. & Yoshimura, T. The Michael Type Addition of Free Sulfilimine. *Synthesis (Stuttg.)* **1976**, 30–32 (1976).
109. Legters, J., Thijs, L. & Zwanenburg, B. Synthesis of naturally occurring (2S,3S)-(+)-aziridine-2,3-dicarboxylic acid. *Tetrahedron* **47**, 5287–5294 (1991).
110. Hili, R., Rai, V. & Yudin, A. K. Macrocyclization of linear peptides enabled by amphoteric molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 2889–91 (2010).
111. Breuning, A., Vicik, R. & Schirmeister, T. An improved synthesis of aziridine-2,3-dicarboxylates via azido alcohols—epimerization studies. *Tetrahedron: Asymmetry* **14**, 3301–3312 (2003).
112. Page, P. C. *et al.* A Short Preparation of an Advanced Intermediate for Lactacystin Synthesis: The Complete Carbon Skeleton of Clasto-Lactacystin Dihydroxyacid. *Synlett* **2003**, 1025–1027 (2003).
113. Ceretti, S. *et al.* Total Synthesis of Sequential Retro-Peptide Oligomers. *European J. Org. Chem.* **2004**, 4188–4196 (2004).
114. Breuning, A. Diplomarbeit: Ex-Chiral-Pool-Synthese von Vorläufern peptidischer Cystein-Protease-Inhibitoren mit Aziridin-Baustein. (2002).

115. Fey, P. Diplomarbeit: Neue wasserlösliche Protease-Inhibitoren mit Aziridin-2,3-dicarbonsäure-Baustein. (2010).
116. Clayden, J. P. , Greeves, N., Warren, S., Wothers, P. D. *Organic Chemistry*. (Oxford University Press, 2006).
117. Yamashita, H. & Mukaiyama, T. Asymmetric Michael addition of thiophenol to maleic acid esters. *Chem. Lett.* **14**, 363–366 (1985).
118. Janus, E., Lozynski, M. & Pernak, J. Protic, Imidazolium Ionic Liquids as Media for (Z)- to (E)-Alkene Isomerization. *Chem. Lett.* **35**, 210–211 (2006).
119. Cook, A. G., Voges, A. B. & Kammrath, A. E. Amino-catalyzed isomerization of and addition to dimethyl maleate. *Tetrahedron Lett.* **42**, 7349–7352 (2001).
120. Davies, M. & Evans, F. P. The kinetics of some cis-trans isomerization reactions in solutions. *Trans. Faraday Soc.* **51**, 1506 (1955).
121. Kar, A. & Argade, N. P. A Facile Synthesis of Natural Products Chaetomelic Acid A and 1,7(Z)- Nonadecadiene-2,3-dicarboxylic Acid † , ‡. *J. Org. Chem.* **67**, 7131–7134 (2002).
122. Neises, B. & Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **17**, 522–524 (1978).
123. Sheikh, M. C., Takagi, S., Yoshimura, T. & Morita, H. Mechanistic studies of DCC/HOBT-mediated reaction of 3-phenylpropionic acid with benzyl alcohol and studies on the reactivities of “active ester” and the related derivatives with nucleophiles. *Tetrahedron* **66**, 7272–7278 (2010).
124. Brückner, R. *Reaktionsmechanismen: Organische Reaktionen, Stereochemie, Moderne Synthesemethoden*. (Spektrum Akademischer Verlag, 2004).
125. Roush, W. R. & Spada, A. P. Synthesis of trichoverrol B. *Tetrahedron Lett.* **24**, 3693–3696 (1983).
126. Christensen, M. S., Pedersen, P. J., Andresen, T. L., Madsen, R. & Clausen, M. H. Isomerization of all-(E)-Retinoic Acid Mediated by Carbodiimide Activation - Synthesis of ATRA Ether Lipid Conjugates. *European J. Org. Chem.* **2010**, 719–724 (2010).
127. Gaunt, M. J. Preferential hydrogenolysis of NAP esters provides a new orthogonal protecting group strategy for carboxylic acids. **40**, 1803–1806 (1999).
128. Zhu, J. *et al.* A Mild Method for the Cleavage of the 4-Picoloyloxy Group with Magnesium under Neutral Conditions. *Synlett* **2012**, 142–144 (2011).
129. Furukawa, N., Yoshimura, T., Ohtsu, M., Akasaka, T. & Oae, S. One step synthesis of aziridines by the Michael type addition of free sulfimides. *Tetrahedron* **36**, 73–80 (1980).
130. Green, T. W. & Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*. 531–537, 736–739 (Wiley-Interscience, 1999).
131. König, W. & Geiger, R. Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen. *Chem. Ber.* **103**, 788–798 (1970).
132. Han, S.-Y. & Kim, Y.-A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **60**, 2447–2467 (2004).
133. Bodanszky, M. *Principles of Peptide Synthesis*. (Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, 1993).
134. Bodanszky, M. & Bodanszky, A. *The Practice of Peptide Synthesis*. (Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, 1994).
135. Kent, H. E., Lilley, T. H., Milburn, P. J., Bloemendal, M. & Somsen, G. Interactions between terminally substituted amino acids in an aqueous and a non-aqueous environment. Enthalpic interaction coefficients in water and in N,N-dimethylformamide at 25 °C. *J. Solution Chem.* **14**, 101–115 (1985).
136. Wissmann, H. & Kleiner, H.-J. New Peptide Synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **19**, 133–134 (1980).
137. Eicher, T. & Hauptmann, S. *Chemie der Heterocyclen*. (Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1994).

138. Sweeney, J. B. Aziridines: epoxides??? ugly cousins? *Chem. Soc. Rev.* **31**, 247–258 (2002).
139. Kaiser, E., Picart, F., Kubiak, T., Tam, J. P. & Merrifield, R. B. Selective deprotection of the N.alpha.-tert-butyloxycarbonyl group in solid phase peptide synthesis with chlorotrimethylsilane in phenol. *J. Org. Chem.* **58**, 5167–5175 (1993).
140. García-Egido, E., Paz, J., Iglesias, B. & Muñoz, L. Synthesis of cyanoforamides from primary amines and carbon dioxide under mild conditions. Synthesis of ceratinamine. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 3991–9 (2009).
141. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–61 (2010).
142. Chang, M. W., Ayeni, C., Breuer, S. & Torbett, B. E. Virtual screening for HIV protease inhibitors: a comparison of AutoDock 4 and Vina. *PLoS One* **5**, e11955 (2010).
143. Houston, D. R. & Walkinshaw, M. D. Consensus docking: improving the reliability of docking in a virtual screening context. *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 384–90 (2013).
144. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina is an open-source program for doing molecular docking accessed on 14.01.2014. at <<http://vina.scripps.edu/manual.html>>
145. Kim, M. J. *et al.* Crystal structure of papain-E64-c complex. Binding diversity of E64-c to papain S2 and S3 subsites. *Biochem. J.* **287** (Pt 3, 797–803 (1992).
146. Tsuge, H. *et al.* Inhibition mechanism of cathepsin L-specific inhibitors based on the crystal structure of papain-CLIK148 complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 411–6 (1999).
147. Turk, D. *et al.* Crystal structure of cathepsin B inhibited with CA030 at 2.0-Å resolution: A basis for the design of specific epoxysuccinyl inhibitors. *Biochemistry* **34**, 4791–7 (1995).
148. Yamamoto, A. *et al.* Structural basis for development of cathepsin B-specific noncovalent-type inhibitor: crystal structure of cathepsin B-E64c complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1597**, 244–51 (2002).
149. Chowdhury, S. F. *et al.* Exploring inhibitor binding at the S' subsites of cathepsin L. *J. Med. Chem.* **51**, 1361–8 (2008).
150. Asaad, N. *et al.* Dipeptidyl nitrile inhibitors of Cathepsin L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 4280–3 (2009).
151. Norgan, A. P., Coffman, P. K., Kocher, J.-P. A., Katzmann, D. J. & Sosa, C. P. Multilevel Parallelization of AutoDock 4.2. *J. Cheminform.* **3**, 12 (2011).
152. Gasteiger, J. & Marsili, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* **36**, 3219–3228 (1980).
153. ChemBio3D Ultra 13.0 Suite. at <http://www.cambridgesoft.com/Ensemble_for_Chemistry/ChemBio3D/ChemBio3DUltra13.0Suite/Default.aspx>
154. Halgren, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **17**, 490–519 (1996).
155. Degel, B. *et al.* Cis-Configured aziridines are new pseudo-irreversible dual-mode inhibitors of *Candida albicans* secreted aspartic protease 2. *ChemMedChem* **3**, 302–15 (2008).
156. Renold, P. & Tamm, C. Stereoselective hydrolysis of dimethyl aziridin-2,3-dicarboxylates with pig liver esterase (PLE). *Tetrahedron: Asymmetry* **4**, 2295–2298 (1993).
157. Pöchlauer, P., Müller, E. P. & Peringer, P. Zum Mechanismus der Aziridinsynthese aus 2-Azidoalkoholen und Triphenylphosphin. *Helv. Chim. Acta* **67**, 1238–1247 (1984).
158. Clark, C. *et al.* A powerful new stereo-controlled method for epoxidation of electrophilic alkenes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1378 (1986).
159. Meth-Cohn, O., Moore, C. & Taljaard, H. C. A stereocontrolled approach to electrophilic epoxides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 2663 (1988).
160. Degel, B. Dissertation: Synthese und Testung elektrophiler Verbindungen als Inhibitoren der sekretorischen Aspartat-Proteasen (SAPs) von *Candida Albicans*. (2006).

161. Dupau, P., Epple, R., Thomas, A. A., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. Osmium-Catalyzed Dihydroxylation of Olefins in Acidic Media: Old Process, New Tricks. *Adv. Synth. Catalysis* **344**, 421–433 (2002).
162. Éll, A. H., Closson, A., Adolfsson, H. & Bäckvall, J.-E. Efficient Osmium/Rhenium-Catalyzed Dihydroxylation of Olefins with Hydrogen Peroxide under Acidic Conditions. *Adv. Synth. Catal.* **345**, 1012–1016 (2003).
163. Chow, T. W.-S., Liu, Y. & Che, C.-M. Practical manganese-catalysed highly enantioselective cis-dihydroxylation of electron-deficient alkenes and detection of a cis-dioxomanganese(V) intermediate by high resolution ESI-MS analysis. *Chem. Commun. (Camb)*. **47**, 11204–6 (2011).
164. Unger, S. H. & Feuerman, T. F. Octanol-aqueous partition, distribution and ionization coefficients of lipophilic acids and their anions by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **176**, 426–429 (1979).
165. Unger, S. H. & Chiang, G. H. Octanol-physiological buffer distribution coefficients of lipophilic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography and their correlation with biological activity. *J. Med. Chem.* **24**, 262–70 (1981).
166. Scherrer, R. a & Howard, S. M. Use of distribution coefficients in quantitative structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **20**, 53–8 (1977).
167. Slater, B., McCormack, A., Avdeef, A. & Comer, J. E. A. Ph-metric logP. 4. Comparison of partition coefficients determined by HPLC and potentiometric methods to literature values. *J. Pharm. Sci.* **83**, 1280–1283 (1994).
168. Hammers, W. E., Meurs, G. J. & de Ligny, C. L. Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol—water system. *J. Chromatogr. A* **247**, 1–13 (1982).
169. Unger, S. H., Cook, J. R. & Hollenberg, J. S. Simple procedure for determining octanol-aqueous partition, distribution, and ionization coefficients by reversed-phase high-pressure liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* **67**, 1364–1367 (1978).
170. ChemBioOffice Ultra 13.0 Suite. at <http://www.cambridgesoft.com/Ensemble_for_Chemistry/ChemBioOffice/ChemBioOfficeUltra13.0Suite/>
171. ChemAxon Calculator Plugins were used for structure property prediction and calculation. (2014). at <<http://www.chemaxon.com>>
172. VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory accessed on 04.02.2014. (2005). at <<http://www.vcclab.org>>
173. Tetko, I. V *et al.* Virtual computational chemistry laboratory--design and description. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **19**, 453–63 (2005).
174. BioByte accessed on 01.05.2014. at <<http://www.biobyte.com/index.html>>
175. Michaelis, L., Menten, M. L., Johnson, K. A. & Goody, R. S. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* **50**, 8264–9 (2011).
176. Bisswanger, H. *Enzymkinetik*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000).
177. Lineweaver, H. & Burk, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658–666 (1934).
178. Schurigt, U. *et al.* Aziridine-2,3-dicarboxylate-based cysteine cathepsin inhibitors induce cell death in *Leishmania major* associated with accumulation of debris in autophagy-related lysosome-like vacuoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 5028–41 (2010).
179. Ludewig, S., Kossner, M., Schiller, M., Baumann, K. & Schirmeister, T. Enzyme Kinetics and Hit Validation in Fluorimetric Protease Assays. *Curr. Top. Med. Chem.* **10**, 368–382 (2010).
180. Schirmeister, T. (S)-Thiirancarboxylic acid as a reactive building block for a new class of cysteine protease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 2647–2651 (2000).
181. GraFit Version 5.0.13. at <<http://www.erithacus.com/grafit/index.html>>

182. Yung-Chi, C. & Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108 (1973).
183. Tian, W. X. & Tsou, C. L. Determination of the rate constant of enzyme modification by measuring the substrate reaction in the presence of the modifier. *Biochemistry* **21**, 1028–1032 (1982).
184. Morita, T., Kato, H., Iwanaga, S., Takada, K. & Kimura, T. New fluorogenic substrates for alpha-thrombin, factor Xa, kallikreins, and urokinase. *J. Biochem.* **82**, 1495–8 (1977).
185. Tratnyek, P. G. *et al.* Visualizing Redox Chemistry: Probing Environmental Oxidation/Reduction Reactions with Indicator Dyes. *Chem. Educ.* **6**, 172–179 (2001).
186. Hof, F. *et al.* Aushungern des Malaria-Erregers: Hemmer der Aspartylproteasen Plasmeprin I, II und IV. *Angew. Chemie* **118**, 2193–2196 (2006).
187. SOP:M-Z1-007-02.
188. SOP:M-B3-005-02.
189. Leeson, P. D. & Springthorpe, B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 881–90 (2007).
190. Hopkins, A. L., Groom, C. R. & Alex, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug Discov. Today* **9**, 430–1 (2004).
191. Leeson, P. D. & Oprea, T. I. *Drug Design Strategies*. (Royal Society of Chemistry, 2011).
192. Inc., C. C. G. Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08. (2013).
193. The UniProt Consortium. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* **42**, D191–8 (2014).
194. Mineno, T., Nikaido, N. & Kansui, H. One-step transformation of tetrahydropyranyl ethers using indium(III) triflate as the catalyst. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **57**, 1167–1170 (2009).
195. Sun, W. S. *et al.* Rational design of an indolebutanoic acid derivative as a novel aldose reductase inhibitor based on docking and 3D QSAR studies of phenethylamine derivatives. *J. Med. Chem.* **46**, 5619–27 (2003).
196. Ekici, O. D. *et al.* Aza-peptide Michael acceptors: a new class of inhibitors specific for caspases and other clan CD cysteine proteases. *J. Med. Chem.* **47**, 1889–92 (2004).
197. Mocci, F., Usai, M. & Cerioni, G. DFT and multinuclear magnetic resonance studies of diazenedicarboxylates and related compounds. *Magn. Reson. Chem.* **47**, 31–7 (2009).
198. Hodgson, D. M. & Angrish, D. Highly chemo- and stereoselective intermolecular coupling of diazoacetates to give cis-olefins by using Grubbs second-generation catalyst. *Chemistry* **13**, 3470–9 (2007).
199. Volwiler, E. H. & Vliet, E. B. Preparation and Hydrolysis of Benzyl Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **43**, 1672–1676 (1921).
200. Corina, D. L., Wright, J. N. & Ballard, K. E. The mass spectra of some benzyl esters and thioethers. *Org. Mass Spectrom.* **18**, 60–63 (1983).
201. T.-M. Chana, Jianshe Konga, P. M. & J. K. W. Syntheses of Potential Degradation Products of Phenylephrine in OTC Products. *Synth. Commun. An Int. J. Rapid Commun. Synth. Org. Chem.* **38**, 2252 (2008).
202. Kushner, S. & Williams, J. H. No. 26. **32**, 1283–1288 (1951).
203. Streuff, J. & Muñoz, K. Efficient synthesis of fumaric amides through cross-metathesis of acrylic amides with the NHC Grubbs ruthenium catalyst. *J. Organomet. Chem.* **690**, 5973–5978 (2005).
204. Huy, P., Neudörfl, J.-M. & Schmalz, H.-G. A practical synthesis of trans-3-substituted proline derivatives through 1,4-addition. *Org. Lett.* **13**, 216–9 (2011).
205. Dai, N. & Etzkorn, F. a. Cis-trans proline isomerization effects on collagen triple-helix stability are limited. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 13728–32 (2009).

-
206. Harju, K., Manevski, N. & Yli-Kauhaluoma, J. Microwave-assisted synthesis of pyridylpyrroles from N-acylated amino acids. *Tetrahedron* **65**, 9702–9706 (2009).
 207. Deng, G. *et al.* Tryptophan-containing dipeptide derivatives as potent PPARgamma antagonists: design, synthesis, biological evaluation, and molecular modeling. *Eur. J. Med. Chem.* **43**, 2699–716 (2008).
 208. Wu, F.-C. *et al.* N-primary-amine-terminal beta-turn tetrapeptides as organocatalysts for highly enantioselective aldol reaction. *J. Org. Chem.* **74**, 4812–8 (2009).
 209. Moseley, J. D. & Staunton, J. Preparation of dicarboxylate analogues of cerulenin. *J. Heterocycl. Chem.* **42**, 819–830 (2005).
 210. Smith, H. L., Brown, E. S., Smith, J. D. & Andrako, J. Hydrogenolysis of benzyl esters with palladium-on-carbon catalysts. *J. Pharm. Sci.* **54**, 1269–73 (1965).