

**Synthese S/N-funktionalisierter Dipeptide  
als Hemmstoffe von Zinkendoproteasen**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Claudius Schulze**  
aus Marburg

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

angenommen am: 31.03.2004

Erstgutachter: Prof. Dr. M. Haake

Zweitgutachter: Prof. Dr. G. Klebe

Tag der mündlichen Prüfung

am: 31.03.2004

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut  
für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie  
der Philipps-Universität Marburg/Lahn  
auf Anregung und unter Leitung von

**Herrn Prof. Dr. Manfred Haake**

Für seine wohlwollende Unterstützung, verständnisvolle Hilfe,  
die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen  
sowie stete Diskussionsbereitschaft möchte ich  
Herrn Professor Haake an dieser Stelle herzlich danken.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises sei für das sehr gute Arbeitsklima, ihre Hilfsbereitschaft und für zahlreiche gute Ratschläge gedankt.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. C. T. Supuran und seinen Mitarbeitern, sowie Herrn Prof. Dr. H. Tschesche und seinem Mitarbeiter Herrn J. Schröder für die Durchführung der biochemischen Tests an den Matrixmetalloproteasen und den Carboanhydrasen.

Weiterhin danke ich Frau Katrin Silber und Herrn Alexander Weber für die Hilfe bei der Durchführung der biochemischen Tests an Thermolysin und den Carboanhydrasen.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meinen Laborkollegen Herrn Reiner Müller und Herrn Jens Becker für die freundschaftliche Atmosphäre, ihre zahlreichen praktischen Anregungen und ihr stetiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit, sowie Herrn Jens Becker für das sorgfältige Korrekturlesen.

Allen Mitarbeitern des Instituts, die in welcher Form auch immer zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls danken.

## Inhaltsverzeichnis

### I. Theoretischer Teil

1.	Einleitung	2
2.	Zink-Endoproteasen	3
2.1.	Die Systematik der Familie der Zink-Endoproteasen	3
2.2.	Thermolysin als Zink-Endoprotease	4
2.2.1.	Herkunft und Eigenschaften	4
2.2.2.	Bindetaschenaufbau und Proteolysemechanismus	5
2.3.	Matrixmetalloproteasen (MMP's) als Zink-Endoproteasen	8
2.3.1.	Vorkommen und physiologische Funktion	8
2.3.2.	Prinzipieller Aufbau	9
2.3.3.	Struktur der Bindetasche und Proteolysemechanismus	11
2.3.4.	Rolle der MMP's bei der Tumorentwicklung	13
3.	Entwicklung und Bedeutung von Zinkendoproteaseinhibitoren	14
3.1.	Substrat-basiertes Design	14
3.2.	Screening von Naturstoffbibliotheken	17
4.	Aufgabenstellung	19
5.	Entwicklung peptidomimetischer Hemmstoffe von Zink-Endoproteasen	22
5.1.	Synthese von N-geschützten Dipeptiden (Z-Dipeptide)	22
5.2.	Synthese von Methioninsulfodiimid-Derivaten	24
5.3.	Synthese von Hydroxamsäure-Derivaten	31
5.4.	Synthese eines Thiols	33
5.5.	Synthese von Sulfonamid-Derivaten (N-Tosyldipeptide)	34

5.6.	Synthese von Arensulfinsäureamid-Derivaten (N-Arensulfinyldipeptide)	36
5.7.	Synthese von Arensulfinylharnstoffdipeptiden	39
5.8.	Synthese von Arensulfonylharnstoffdipeptiden	43
5.9.	Synthese von Arensulfonimidharnstoffdipeptiden	44
5.10.	Synthese von Sulfoximin- und Sulfodiiminharnstoffdipeptiden	46
5.11.	Synthese eines Dipeptidharnstoffs	48
5.12.	Synthese von N-Sulfamoyldipeptiden	49
5.13.	Synthese von N-Cyanisoharnstoff-Dipeptiden	50
5.14.	Cyclisierung zu Azol-Dipeptiden	52
5.15.	Synthesen mit Diphenyl-N-sulfamoyl-iminocarbonat (DIPHSAIC)	56
5.15.1.	Umsetzung von DIPHSAIC mit Aminosäureestern	56
5.15.2.	Umsetzungen von DIPHSAIC mit Dipeptidmethylamiden	63
6.	Biochemische Prüfung von Zinkprotease-Inhibitoren	66
6.1.	Thermolysin- Hemmtest	66
6.2.	Matrixmetalloproteasen- Hemmtest	68
7.	Hemmstoffe der Carboanhydrasen (CA's)	71
7.1.	Carboanhydrasen als Zink-bindende Enzyme	71
7.2.	Struktur der Carboanhydrasen am Beispiel der humanen Carboanhydrase II	72
7.3.	Mechanismus der Katalyse	74
7.4.	Inhibitoren der Carboanhydrasen	76
7.5.	Synthese und biochemische Prüfung neuer Carboanhydraseinhibitoren mit N-Sulfamoyldipeptid-Struktur	78
8.	Zusammenfassung	80

## **II. Experimenteller Teil**

Allgemeine Angaben	90
Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Verseifung von Carbonsäuremethylestern (AAV1)	92
N-Benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-phenylalanin ( <u>6a</u> )	92
N-Benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-tryptophan ( <u>6b</u> )	94
N-Benzyloxycarbonyl- $\beta$ -alanyl-L-phenylalanin ( <u>6e</u> )	95
N-Benzyloxycarbonyl- $\beta$ -alanyl-L-tryptophan ( <u>6f</u> )	97
Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Säure-Aktivierung von Carbonsäuren als gemischtes Anhydrid mit Chlorameisensäureisobutylester (AAV2)	98
N-Benzyloxycarbonyl-3-cyclohexylalanyl-L-phenylalaninmethylester ( <u>6c/1</u> )	99
N-Benzyloxycarbonyl-3-cyclohexylalanyl-L-phenylalanin ( <u>6c</u> )	101
N-Benzyloxycarbonyl-3-cyclohexylalanyl-L-tryptophanmethylester ( <u>6d/1</u> )	102
N-Benzyloxycarbonyl-3-cyclohexylalanyl-L-tryptophan ( <u>6d</u> )	104
Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Sulfodiimide (AAV3)	106
N-Benzyloxycarbonyl-D,L-methionin-S,S-diimid ( <u>8</u> )	106
N-Benzyloxycarbonyl-D,L-methionyl-L-phenylalaninmethylester-S,S-diimid ( <u>13</u> )	108
N-Glutaryl-L-phenylalanin ( <u>14</u> )	109
4-(Benzyloxycarbamoyl)-butyryl-L-phenylalaninmethylester ( <u>16a</u> )	111
4-(Benzyloxycarbonyl)-butyryl-L-phenylalanin ( <u>16b</u> )	113
4-Hydroxycarbamoyl-butyryl-L-phenylalanin ( <u>17</u> )	114
4-Brombutyryl-L-phenylalaninmethylester ( <u>18</u> )	116
4-Mercaptobutyryl-L-phenylalanin ( <u>19</u> )	118
N-(4-Methylbenzolsulfonyl)-L-leucyl-L-phenylalanin ( <u>22a</u> )	119
N-(4-Methylbenzolsulfonyl)- $\beta$ -alanyl-L-phenylalaninmethylester ( <u>22b/1</u> )	121
N-(4-Methylbenzolsulfonyl)- $\beta$ -alanyl-L-phenylalanin ( <u>22b</u> )	123
N-(4-Methylbenzolsulfonyl)- $\beta$ -alanyl-L-tryptophan ( <u>22c</u> )	124
Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von Arensulfinylpeptiden (AAV4)	126
N-Benzolsulfinyl-L-leucyl-L-phenylalaninbenzylester ( <u>24a</u> )	126
N-(4-Methylbenzolsulfinyl)-L-leucyl-L-phenylalaninbenzylester ( <u>24b</u> )	128
N-(4-Methylbenzolsulfinyl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid ( <u>25</u> )	129
Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von Arensulfinylharstoffpeptiden (AAV5)	132
N-[(Benzolsulfinyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid ( <u>28a</u> )	132

N-[(4-Methylbenzolsulfinyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid ( <u>28b</u> )	134
N-[(Benzolsulfinyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-tryptophan-N-methylamid ( <u>28c</u> )	136
N-[(4-Methylbenzolsulfinyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-tryptophan-N-methylamid ( <u>28d</u> )	138
N-[(4-Methylbenzolsulfinyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-phenylalaninbenzylester ( <u>28e</u> )	140
N-[(Benzolsulfonyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid ( <u>29a</u> )	142
N-[(4-Methylbenzolsulfonyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid ( <u>29b</u> )	144
N-[(Benzolsulfonyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-phenylalaninbenzylester ( <u>29c</u> )	145
N-[(Benzolsulfonimidoyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid ( <u>30a</u> )	147
N-[(Benzolsulfonimidoyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-tryptophan-N-methylamid ( <u>30b</u> )	149
Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Sulfoximinharnstoffdipeptide und Sulfodiiminharnstoffdipeptide (AAV13)	151
L-2-[3-(1-oxo-tetrahydro-1 $\lambda$ <sup>6</sup> -thiophen-1-yliden)-ureido]-isohexanoyl-L-phenylalanin-N-methylamid ( <u>36a</u> )	150
L-2-[3-(1-Imino-tetrahydro-1 $\lambda$ <sup>6</sup> -thiophen-1-yliden)-ureido]-isohexanoyl-L-phenylalanin-N-methylamid ( <u>36b</u> )	153
N-(S-Methyl-S-phenylsulfoximidocarbonyl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid ( <u>36c</u> )	154
N-(S-Methyl-S-phenylsulfodiimidocarbonyl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid ( <u>36d</u> )	156
N-[S,S-Bis-(4-chlorphenyl)-sulfoximidocarbonyl]-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid ( <u>36e</u> )	158
N-[S,S-Bis-(4-chlorphenyl)-sulfodiimidocarbonyl]-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid ( <u>36f</u> )	160
N-Carbamoyl-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid ( <u>37</u> )	161
Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung Boc-geschützter Sulfamoyldipeptide (AAV6)	163
N-(t.-Butoxycarbonylsulfamoyl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid ( <u>39a</u> )	164
N-(tert-Butoxycarbonylsulfamoyl)-D-leucyl-D-phenylalanin-N-methylamid ( <u>39b</u> )	166
N-(tert-Butoxycarbonylsulfamoyl)-D-alanyl-D-phenylalanin-N-methylamid ( <u>39c</u> )	167

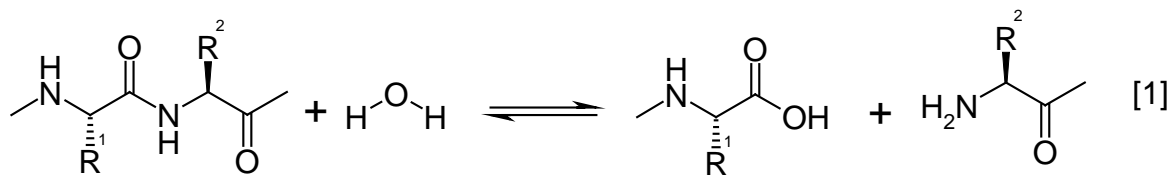
Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Entfernung der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure (AAV7)	169
N-Sulfamoyl-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (40a)	169
N-Sulfamoyl-D-leucyl-D-phenylalanin-N-methylamid (40b)	171
N-Sulfamoyl-D-alanyl-D-phenylalanin-N-methylamid (40c)	173
Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung Cyaniminophenoxymethyl-N-substituierter Dipeptide (AAV8)	174
N-(Cyaniminophenoxymethyl)-L-leucyl-L-phenylalaninbenzylester (42a)	174
N-(Cyaniminophenoxymethyl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (42b)	176
N-(Cyaniminophenoxymethyl)-L-leucyl-L-tryptophan-N-methylamid (42c)	178
Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung N-(5-Amino-2H-[1,2,4]triazol-3-yl)-dipeptide (AAV9)	179
N-(5-Amino-2H-[1,2,4]triazol-3-yl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (43a)	180
N-(5-Amino-2H-[1,2,4]triazol-3-yl)-L-leucyl-L-tryptophan-N-methylamid (43b)	182
N-(5-Amino-2H-[1,2,4]triazol-3-yl)-L-leucyl-L-phenylalaninbenzylester (43c)	184
N-(5-Amino-2H-[1,2,4]triazol-3-yl)-L-leucyl-L-phenylalanin (43d)	186
Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung N-(5-Amino-2-methyl-2H-[1,2,4]triazol-3-yl)-dipeptide	187
N-(5-Amino-2-methyl-2H-[1,2,4]triazol-3-yl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (44a)	188
N-(5-Amino-2-methyl-2H-[1,2,4]triazol-3-yl)-L-leucyl-L-tryptophan-N-methylamid (44b)	190
N-(5-Amino-[1,2,4]oxadiazol-3-yl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (45a)	192
Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Umsetzung von N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester mit $\alpha$ -Aminosäureesterhydrochloriden (AAV11)	194
N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-glycinethylester (47a)	194
N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-alaninmethylester (47b)	196
N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-alanintertiärbutylester (47c)	197
N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-methioninmethylester (47d)	199
N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-phenylalaninmethylester (47e)	201
N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-phenylalaninbenzylester (47f)	203
N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-tryptophanmethylester (47g)	204
N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-thyrosinmethylester (47h)	206

N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid ( <u>52a</u> )	208
N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-L-leucyl-L-tyrosin-N-methylamid ( <u>52b</u> )	210
N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-L-leucyl-L-tryptophan-N-methylamid ( <u>52c</u> )	211
2-Sulfamoylimino-thiazolidin-4-carbonsäureethylester ( <u>48a</u> )	213
2-Sulfamoylimino-oxazolidin-4-carbonsäureethylester ( <u>48b</u> )	215
N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-alanin ( <u>47i</u> )	217
Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der N <sup>2</sup> -Sulfamoylguanidine (AAV12)	218
N <sup>2</sup> -Sulfamoylguanidinoessigsäureethylester ( <u>49</u> )	219
N-(Sulfamoylcarbamidoyl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid ( <u>53a</u> )	220
N-(Sulfamoylcarbamidoyl)-L-leucyl-L-tyrosin-N-methylamid ( <u>53b</u> )	222
6-R,S-6,7-Dihydrothiazolo[2.3-c]-1,2,4,6-thiatriazin-6- carbonsäureethylester-S <sup>2</sup> ,S <sup>2</sup> -dioxid ( <u>51</u> )	223
N-[L-2-(1,1-Dioxo-3-phenoxy-1H-1λ <sup>6</sup> -[1,2,4,6]thiatriazin-4-yl)- L-phenylalanin-N-methylamid ( <u>54</u> )	225
Literaturverzeichnis	228

# **Theoretischer Teil**

## 1. Einleitung

Proteasen sind Enzyme, die die Spaltung einer Amidbindung in Proteinen oder Polypeptiden katalysieren [1].



Da Amide relativ stabil gegen Hydrolyse sind, katalysieren sie eine von Natur aus langsame Reaktion. Mechanistisch gibt es zwei große Klassen von Proteasen. In der ersten Enzymklasse dient ein vom Enzym gebundenes aktiviertes Wassermolekül als Nukleophil, das die Carbonylgruppe der zu spaltenden Amidgruppe angreift, d.h. das Enzym katalysiert die direkte Hydrolyse der Peptidbindung. Die zweite Enzymklasse aktiviert ein nukleophiles Atom eines Aminosäurerestes, um die Amidspaltung zu initiieren. Das Nukleophil greift die Carbonylgruppe der Peptidbindung an und bildet unter Spaltung der C-N-Bindung ein Acyl-Enzym-Zwischenprodukt, das anschließend durch Wasser gespalten wird (indirekte Hydrolyse)<sup>1</sup>.

Metalloproteasen gehören zur ersten Klasse von Proteasen. Sie enthalten ein Metallion im aktiven Zentrum, welches am katalytischen Prozess beteiligt ist. Neben Enzymen, die andere Metalle wie z.B. Kobalt, Magnesium oder Mangan binden, bilden Zinkproteasen den größten Anteil an der Familie der Metalloproteasen. Der Grund, warum die Natur  $\text{Zn}^{2+}$  anstatt von  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  oder  $\text{Cu}^{2+}$  für viele Hydrolyse-, Kondensations- oder andere Atom- und Gruppen-Transferreaktionen benutzt, liegt an seiner flexiblen Koordinationsgeometrie, dem schnellen Ligandenaustausch, dem Lewis-Säure-Charakter, der mittleren Polarisierbarkeit, der Verfügbarkeit und dem Fehlen von Redoxaktivität<sup>2</sup>.

Aufgrund ihres häufigen Vorkommens innerhalb biologischer und physiologischer Prozesse sind Zinkproteasen Bestandteil vieler Forschungsarbeiten. Zinkproteasen haben z.B. Funktionen während der Embryonenreife, der Knochenbildung und Blutdruckregulation, sie kommen aber auch in Tetanus- und Botulinum-Toxinen vor und spielen bei den Krankheiten Arthritis und Krebs eine Rolle<sup>3</sup>.

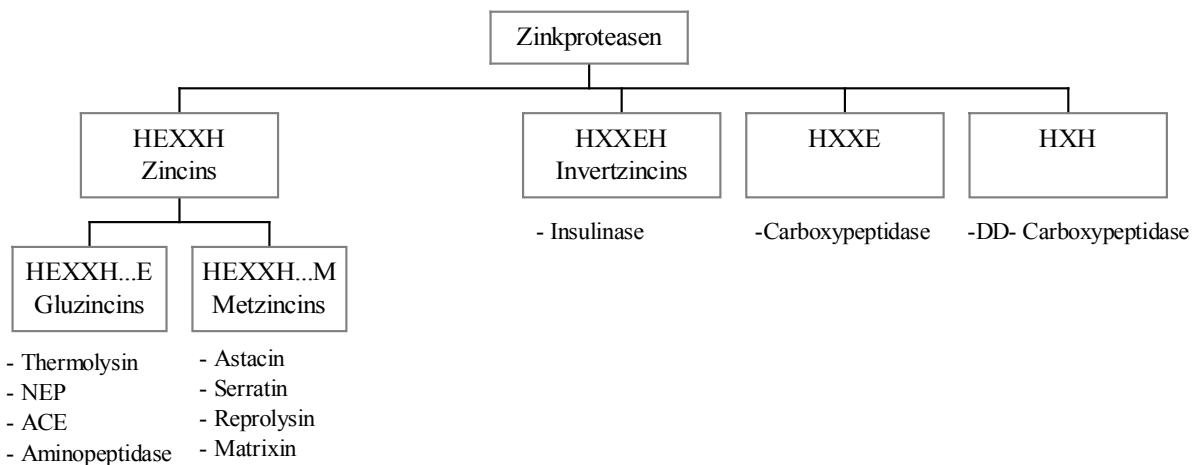
## 2. Zink-Endoproteasen

### 2.1. Die Systematik der Familie der Zink-Endoproteasen

Zinkproteasen lassen sich nach ihrer Funktionsweise, d.h. an welcher Stelle innerhalb eines Proteins sie die Peptidspaltung katalysieren, in drei Gruppen einteilen:

1. Aminopeptidasen: katalysieren die Abspaltung einer unsubstituierten Aminosäure am N-Terminus des Proteins,
2. Endopeptidasen: katalysieren eine Peptidspaltung innerhalb einer Proteinkette,
3. Carboxypeptidasen: katalysieren die Abspaltung der C-terminalen Aminosäure eines Proteins.

Eine weitere, sequenzbasierte Möglichkeit Zinkproteasen einzuteilen, die auch gleichzeitig der Identifikation neuer Zinkproteasen dienen kann, beruht auf dem Vergleich der Aminosäuren, die für die Bindung des katalytischen Zinkions im Enzym verantwortlich sind und das Zink-bindende Motiv bilden. Zur Identifikation einer Zinkprotease wird zunächst die Primärstruktur eines Enzyms auf das Vorhandensein der Aminosäuresequenz His-Glu-X-X-His (bzw. *HEXXH*, X steht für eine beliebige Aminosäure) untersucht [2.1.]. Das Zink-bindende Motiv kommt auch in inverser Laufrichtung (*HXXEH*) oder leicht abgewandelt vor (*HXH*). Die Klassifizierung innerhalb dieser Enzymfamilie hat sich in den letzten Jahren durch die steigende Anzahl neu untersuchter, untereinander verschiedener Enzyme immer wieder verändert<sup>4</sup>. Nach anfänglich fünf Klassen sind mittlerweile elf Unterfamilien der Zinkproteasen bekannt<sup>3</sup>.



**[2.1.]** Klassifizierungssystem der Zinkproteasen (modifiziert nach Hooper 1994). Jeder Eintrag der Abbildung repräsentiert eine Unterfamilie. Zur Thermolysin- Unterfamilie gehören neben Thermolysin selbst u.a. *Pseudomonas aeruginosa elastase*, *Legionelle pneumophila protease* und *Bacillus sp. neutral protease*.

Die Unterfamilie der Zincins wird durch das Motiv HEXXH charakterisiert. Die katalytischen Domänen der Enzyme dieser Unterfamilie weisen alle eine topologisch ähnliche Faltung aus fünf  $\beta$ -Faltblattstrukturen und zwei  $\alpha$ -Helices auf. Eine dieser Helices beherbergt das HEXXH- Motiv. Darin binden die beiden Histidine an das Zinkion. Als dritte an das Zinkion koordinierende Aminosäure dient <sup>4</sup>

- bei Metzincins ein drittes Histidin, mit neun Aminosäuren Abstand zum ersten Histidin (*short spacer*),
- bei Gluzincins eine Glutaminsäure, die einen Abstand von mindestens 20 Aminosäuren zum ersten Histidin hat (*long spacer*).

## 2.2. Thermolysin als Zink-Endoprotease

### 2.2.1. Herkunft und Eigenschaften

Eine der am besten untersuchten Zink-bindenden Metalloproteasen ist das Thermolysin (TLN) (EC. 3.4.24.4). Diese zählt zu den sogenannten Zink-Endoproteasen, d.h. sie spaltet die Amidbindung innerhalb einer Peptidkette.

Thermolysin wird aus dem grampositiven Bakterium *Bacillus thermoproteolyticus* isoliert <sup>5</sup>. Seine Aminosäuresequenz ist seit 1972 bekannt <sup>6</sup>. Im selben Jahr konnte seine

dreidimensionale Struktur mit einer Auflösung von 2,3 Å geklärt werden <sup>7</sup>. Durch Weiterentwicklung der Kristallisationstechniken wurde in den folgenden zehn Jahren die Strukturbestimmung mit einer Auflösung von 1,6 Å erreicht <sup>8,9</sup>.

Obwohl *Bacillus thermoproteolyticus* selbst kein humanpathogener Keim ist, weist Thermolysin eine Reihe von Eigenschaften auf, die Untersuchungen zu neuen Inhibitoren an ihm rechtfertigen. Zum einen ist seine Bindetasche unter Substrat- und Inhibitorbindung weitgehend rigide. Zum anderen lässt sich das Enzym unter einfachen Bedingungen kristallisieren und ähnelt denen krankheitsverursachender Proteine wie z.B. *Neutral Endo Peptidase 24.11* (NEP), *Matrix- Metallo- Proteasen* (MMP), *Angiotensin Converting Enzym* (ACE) <sup>10,11,12</sup>.

### **2.2.2. Bindetaschenaufbau und Proteolysemechanismus**

Thermolysin ist eine thermostabile, extrazelluläre Endoprotease und besteht aus 316 Aminosäuren. Es katalysiert die Hydrolyse einer Peptidbindung auf der Iminoseite eines hydrophoben Restes <sup>13</sup>. Das Molekulargewicht beträgt 34600 Dalton <sup>5</sup>. Es enthält neben Zink noch vier Calciumionen, die für die Thermostabilität notwendig sind <sup>14</sup> und die aus der Oberfläche ins Lösungsmittel ragenden Schleifen vor Autoproteolyse schützen. Im nativen Zustand ist das Zinkion annähernd tetraedrisch von zwei Histidinresten (His-142, His-146), einem Glutamatrest (Glu-166) und einem Wassermolekül koordiniert [2.2.2.1].

### **Struktur der Thermolysin-Bindetasche**

Die Thermolysin- Bindetasche wird aus der Verknüpfung zweier Domänen geformt und kann nach dem Prinzip von Schlechter <sup>15</sup> in mehrere Unterbereiche eingeteilt werden (vgl. auch [3.1.1.], S.15):

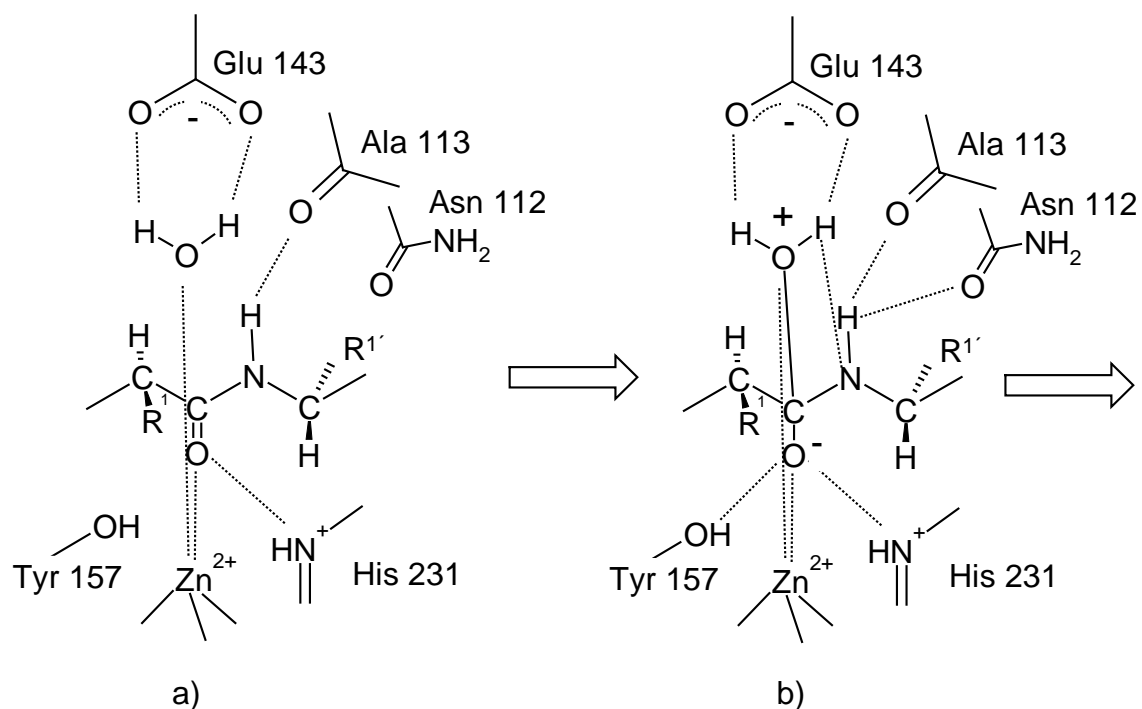
- „Zinkion-Bindestelle“: Das Zinkion im nativen Enzym ist annähernd tetraedrisch von drei Aminosäuren und einem Wassermolekül koordiniert.
- tiefe S<sub>1</sub>'-Tasche: Sie formt die hydrophobe Umgebung für den hydrophoben Aminosäurerest neben der zu spaltenden Bindung.

- große  $S_1$ -Tasche und  $S_2'$ -Tasche: Beide stabilisieren durch die Möglichkeit, Wasserstoffbrücken zu bilden, die Orientierung des Substrats.

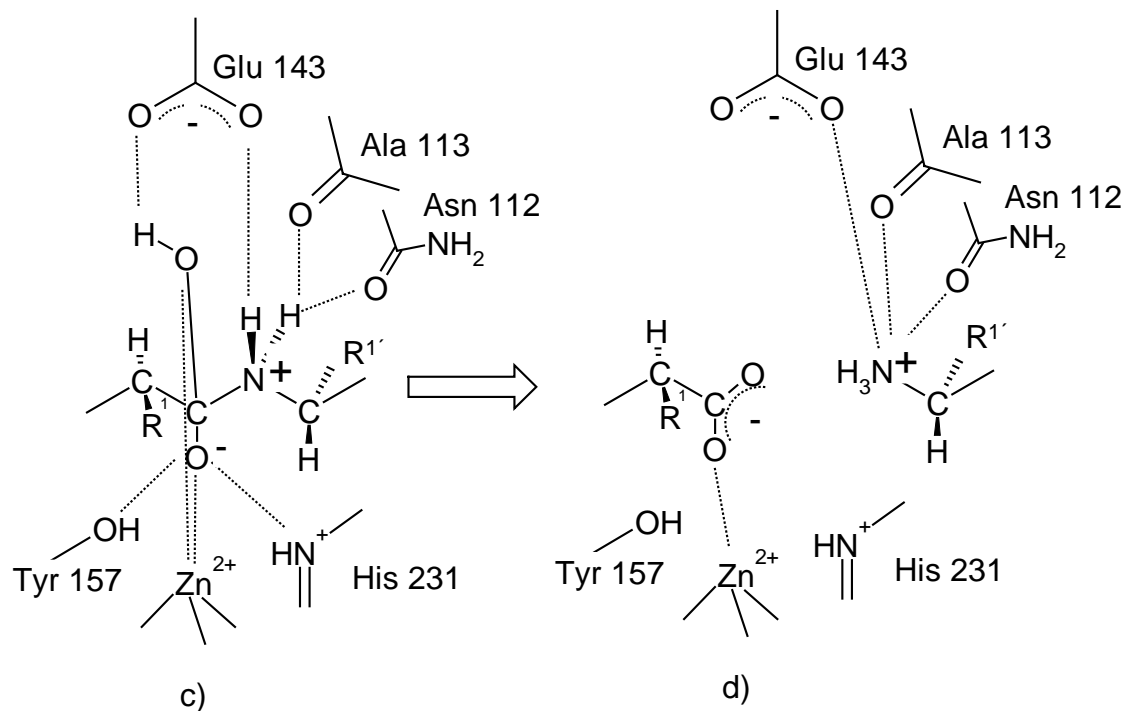
### Mechanismus der Katalyse:

Da der Katalysemechanismus nicht direkt beobachtbar ist, wurden zu seiner Aufklärung Röntgenkristallstrukturen von Enzym-Inhibitor-Komplexen herangezogen, von denen man annimmt, dass sie Übergangszustände nachahmen. Dadurch lassen sich durch geeignete Auswahl von Inhibitoren die verschiedenen Stadien der Katalyse erforschen. Da es für die röntgenkristallographische Aufklärung nötig ist, Enzym-Inhibitor-Komplexe mit einer ausreichenden Lebensdauer zu verwenden, ist jedoch zu beachten, dass diese keine wirklichen Übergangszustände, sondern eher stabilisierte Zwischenstufen repräsentieren<sup>9</sup>.

Aufgrund dieser Untersuchungen gilt heute der allgemeine Basenkatalyse-Weg als der wahrscheinlichste, der in [2.2.2.2.] gezeigt ist, in welchem das Zinkion pentakoordiniert ist:



[2.2.2.2]



[2.2.2.2.] Katalysemechanismus für Thermolysin nach Matthews<sup>9</sup>

Hierbei spielt das Zinkion die Rolle einer Lewis-Säure, welche zum einen die Carbonylgruppe der zu spaltenden Amidbindung polarisiert und gleichzeitig die Deprotonierung des Wasser-Nucleophils erleichtert. Die O-H-Bindungen des Wassers werden gleichzeitig stark von Glu-143 polarisiert (a). Dadurch wird ein nucleophiler Angriff des Wasser-Sauerstoffs an den Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung möglich. Die dadurch entstehende negative Ladung am Carbonylsauerstoff wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Tyr-157 und His-231 stabilisiert (b). Das von Glu-143 zwischenzeitlich gebundene Proton wird an das Stickstoffatom der Peptidbindung abgegeben, dessen nun positive Ladung durch die Carbonylsauerstoffe von Asn-112 und Ala-113 stabilisiert wird (c). Nach erfolgter Peptidspaltung (d) wird die frei werdende Koordinationsstelle am Zink wieder durch ein Wassermolekül besetzt.

## **2.3. Matrixmetalloproteasen (MMP's) als Zink-Endoproteasen**

### **2.3.1. Vorkommen und physiologische Funktion**

Die Matrixmetalloproteasen (MMP's) bilden eine Familie strukturell und funktionell verwandter Zinkendopeptidasen. Sie sind in der Lage, verschiedene Proteinkomponenten der extrazellulären Matrix abzubauen, z.B. Zwischenzellmembran-Kollagene, Basalmembrankollagene, Proteoglycane, Fribronectin und Laminin.

Sie katalysieren dabei die hydrolytische Spaltung der Peptidbindung. Sie sind an Umbauprozessen des Bindegewebes beteiligt, wie z.B. während der Embryonalentwicklung, der Schwangerschaft, des Wachstums und der Wundheilung<sup>16</sup>.

Bis heute wurden siebzehn verschiedene menschliche Matrixmetalloproteasen identifiziert. Sie weisen eine signifikante Sequenzhomologie und eine gemeinsame Multidomänenorganisation auf.

Zusammen mit weiteren, in anderen Wirbeltieren sowie Wirbellosen und Pflanzen gefundenen Matrixmetalloproteasen bilden sie die Unterfamilie der „Matrixins“ der Metalloproteinase M10-Familie<sup>17</sup>.

Aufgrund struktureller Eigenschaften und nach ihrer Funktionsweise lassen sich die menschlichen Matrixmetalloproteasen in fünf Gruppen einteilen:

- Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13)
- Gelatinasen (MMP-2, MMP-9)
- Stromelysine (MMP-3, MMP-10)
- Elastin/ Matrilysin-Gruppe (MMP-7, MMP-12, MMP-19, MMP-20)
- Membrangebundene Matrixmetalloproteasen (MT-MMPs)

Kollagenasen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, fibrilläre Kollagene abzubauen, welche im Allgemeinen gegen Proteolyse resistent sind. Kollagenasen spalten die  $\alpha$ -Kette bei  $\frac{3}{4}$  ihrer Länge<sup>18,19</sup>. Die Gelatinasen können Typ IV-Kollagen der Basalmembran, nichtfibrilläre Kollagene und Proteine wie Fibronectin und Laminin abbauen<sup>20</sup>. Stromelysine bauen

dagegen verschiedene Proteoglycankomponenten der extrazellulären Matrix sowie Fibronectin und Laminin ab<sup>21,22</sup>.

Eine eigene heterogene Subgruppe bilden Matrilysin (MMP-7), Macrophagen-Metalloelastase (MMP-12) und Enamelysin (MMP-20). Matrilysin baut nichtfibrilläres Kollagen, Fibronectin und Laminin ab, Macrophagen-Metalloelastase hingegen ist relativ unspezifisch und baut viele Substrate einschließlich Elastin ab.

Da Matrixmetalloproteasen für ihre natürliche Umgebung potentiell gefährlich sind, muss ihre Aktivität durch die Zelle bzw. den Organismus streng kontrolliert werden. Diese Kontrolle wird durch folgende Faktoren reguliert<sup>1</sup>:

- Regulation der Transkription
- Ausscheidung als inaktive Zymogene
- Hemmung durch endogene Inhibitoren (TIMP's)

Störungen in der Regulation von MMP's werden mit Krankheiten in Verbindung gebracht, die mit einem unerwünschten Abbau des Bindegewebes einhergehen, wie Arthritis oder Tumorwachstum.

### **2.3.2. Prinzipieller Aufbau**

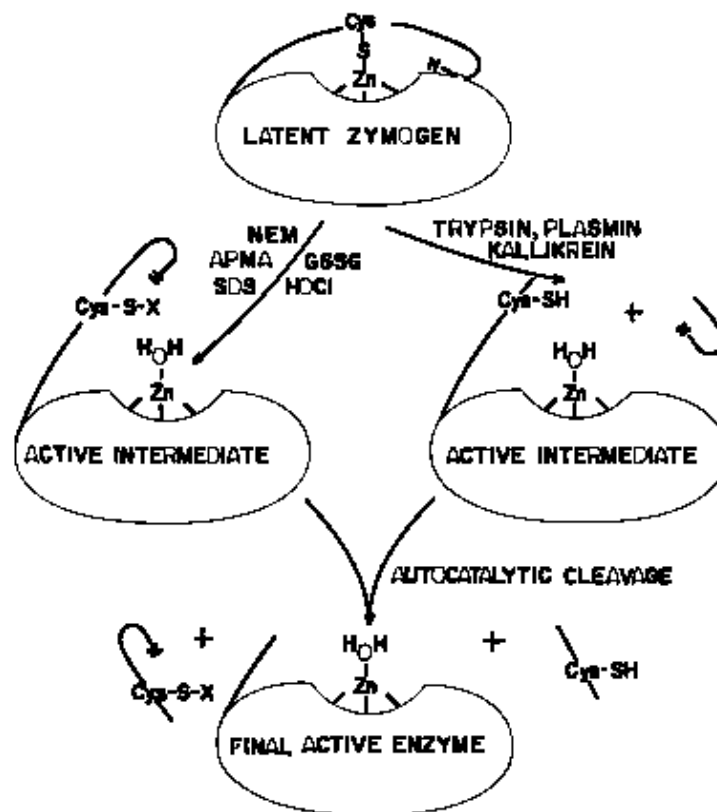
Allen Matrixmetalloproteasen gemeinsam ist ihre Multidomänenstruktur. Vergleichende Analysen der Aminosäuresequenzen der verschiedenen Matrixmetalloproteasen lassen vermuten, dass der Aufbau der Multidomänenstruktur zu einem frühen Zeitpunkt der Evolutionsgeschichte stattfand<sup>23</sup>. Matrixmetalloproteasen werden mit einem N-terminalen Signalpeptid gebildet und als inaktive Enzymvorstufen (Zymogene) ausgeschieden. Diese Vorstufen besitzen eine N-terminale Prodomäne, gefolgt von der katalytischen Domäne, die (mit Ausnahme von Matrilysin) über einen Prolin-reichen Linker mit der C-terminalen Haemopixin-artigen Domäne verbunden ist. Bei den membrangebundenen MMPs (MT-MMPs) folgt hierauf noch die Transmembran-Domäne, die für die Verankerung auf der Zelloberfläche sorgt.

Die Haemopixin-artige Domäne weist eine signifikante Sequenzhomologie mit Haemopixin auf, einem Glycoprotein, das für den Häm-Transport wichtig ist. Sie scheint eine wichtige

Rolle für die Substratbindung und für die Hemmung der Matrixmetalloproteasen durch körpereigene Inhibitoren, der sogenannten TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinase), zu spielen <sup>24</sup>.

### Aktivierung der Matrixmetalloproteasen

Wie schon oben erwähnt, werden Matrixmetalloproteasen als inaktive Zymogene ausgeschüttet. Nach Erkenntnissen aus der Kristallstruktur von C-terminal beschnittenem pro-MMP-3 hat die Prodomäne eine eiförmige Gestalt, die mit ihrer abgerundeten Seite die katalytische Domäne bedeckt <sup>24</sup>. Die Prodomäne enthält eine ungepaarte Thiolgruppe eines hochkonservierten Cystein-Restes, die an das Zinkion im katalytischen Zentrum koordiniert und somit das Enzym inaktiviert. Zur Aktivierung muss diese Wechselwirkung behoben werden. Das inaktive Enzym lässt sich folglich durch proteolytische Abspaltung der Prodomäne oder durch eine Änderung der Konformation der Prodomäne durch oberflächenaktive Substanzen aktivieren [2.3.2.1.].



[2.3.2.1.] Aktivierung der MMP's nach Woessner et al. <sup>16</sup>

### **2.3.3. Struktur der Bindetasche und Proteolysemechanismus**

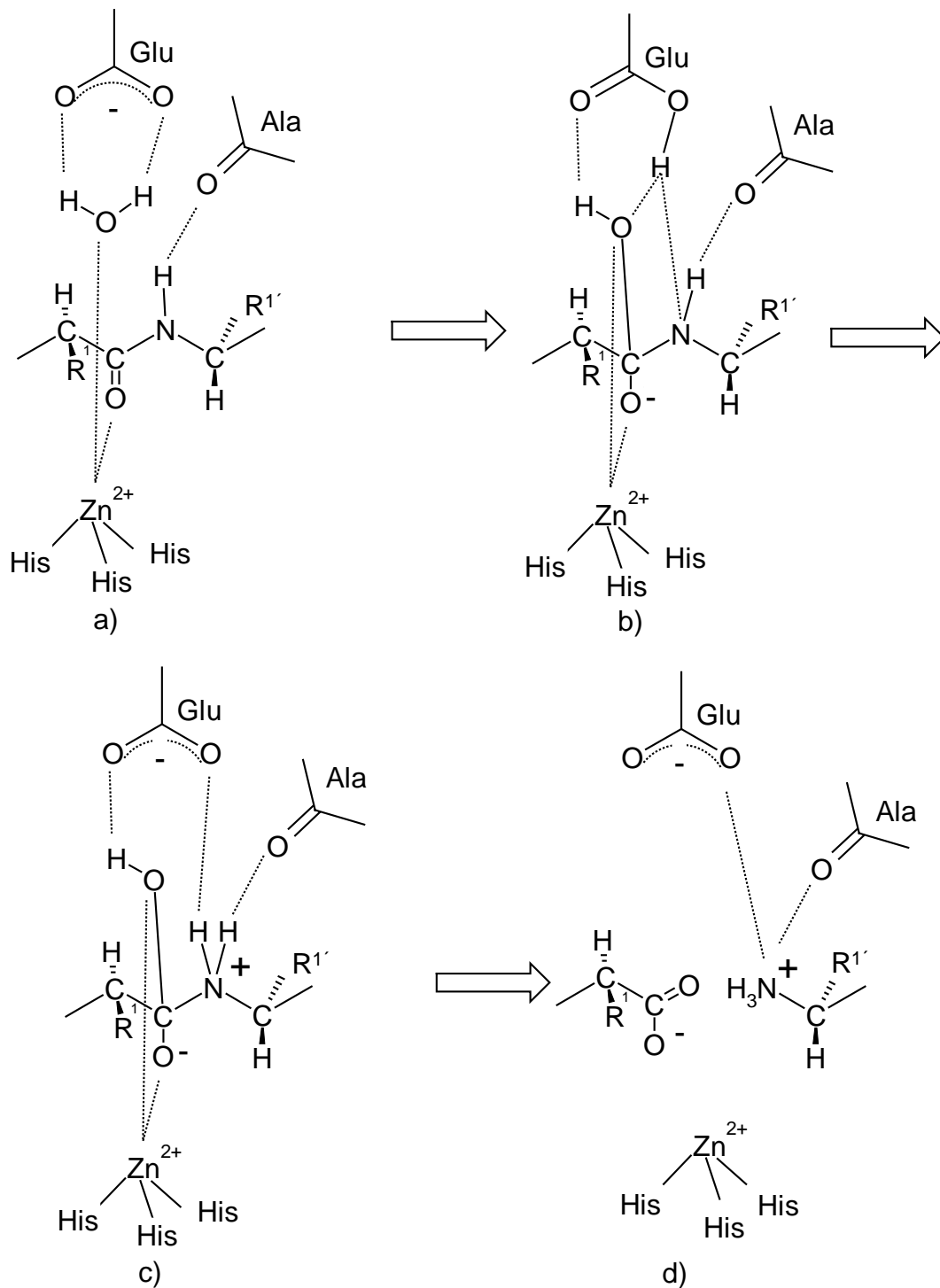
Die ersten Röntgenkristallstrukturen der katalytischen Domänen (cDs) von MMP-1<sup>25,26,27</sup> und MMP-8<sup>28,29</sup> wurden 1994 erhalten, ebenso die NMR-Struktur der katalytischen Domäne von MMP-3<sup>30</sup>. Später folgte die Aufklärung der Strukturen weiterer katalytischer Domänen.

Die katalytische Domäne hat die Form eines Ellipsoids. Sie besteht im wesentlichen aus einem fünf-strängigen, verdrillten  $\beta$ -Faltblatt, das auf der einen Seite durch eine S-Schleife begrenzt wird, auf der gegenüberliegenden Seite durch drei  $\alpha$ -Helices und große Schleifen. Die Bindetasche, in der das aktive Zentrum liegt, ist in die flache Oberfläche der ellipsoidförmigen Domäne eingeschnitten. Im Zentrum liegt das katalytische Zinkion. Alle Matrixmetalloproteasen enthalten neben dem katalytischen Zinkion noch ein weiteres Zinkion, das für die Struktur wichtig ist, sowie noch zwei oder drei Calciumionen.

Die Spalte, in der das katalytische Zinkion liegt, ist relativ flach auf der Seite links von der zu spaltenden Peptidbindung (S3-S1 nach der Nomenklatur von Schechter & Berger), schneidet beim katalytischen Zinkion und rechts davon tief in die Oberfläche (S1' und S2') und flacht dahinter wieder ab. Das katalytische Zinkion wird im ungebundenen Enzym von den drei hochkonservierten Histidinresten des HEXXHXXGXXH-Motiv koordiniert, das für die Unterfamilie der Metzincins charakteristisch ist. Dieses Motiv enthält ebenso einen Glutamatrest, der eine entscheidende Rolle bei der Katalyse spielt.

Die von den Matrixmetalloproteasen katalysierte Hydrolyse einer Peptidbindung erfolgt wahrscheinlich ebenso wie die von Thermolysin über einen allgemeinen Basenkatalyse-Weg<sup>31</sup>.

Der Reaktionsmechanismus für die Proteolyse wurde auf der Basis von Kristallstrukturen von Enzym- Inhibitor- Komplexen abgeleitet.



[2.3.3.] Katalysemechanismus für die MMP's nach Lovejoy<sup>32</sup>

Es wird angenommen, dass die Carbonylgruppe der zu spaltenden Amidbindung an das Zinkion koordiniert und von diesem polarisiert wird. Diese Carbonylgruppe wird durch ein Wassermolekül angegriffen, das Wasserstoffbrückenbindungen zu einem konservierten Glutamatrest und dem Zinkion unterhält.

Aus Vergleichen der Röntgenkristallstrukturen lassen sich die Matrixmetalloproteasen in zwei Gruppen einteilen, die die Tiefe der  $S_1'$ -Tasche betreffen. Diese auch als Selektivitätstasche bezeichnete Tasche ist bei den meisten Enzymen relativ tief (z.B. MMP-2, MMP-9, MMP-3, MMP-8, MMP-13 ect.). Für bestimmte Enzyme (MMP-1, MMP-7, MMP-11) ist sie teilweise oder ganz verschlossen. Die Seitenkette der Aminosäure 193 (Nummerierung nach MMP-8), die die  $S_1'$ -Tasche formt, wächst von Leucin (für Enzyme mit tiefer Tasche) zu Arginin (für MMP-1), Tyrosin (für MMP-7) und Glutamin (für MMP-11). Somit lässt sich durch Einbau eines langen Restes bei  $P_1'$  in Hemmstoffe eine Selektivität für die Hemmung von Enzymen mit tiefer  $S_1'$ -Tasche gegenüber solchen mit einer flachen  $S_1'$ -Tasche erreichen, wogegen kurze  $P_1'$ -Reste zu einer breiten Hemmung aller Enzyme führen. Die  $S_2'$ -Tasche ist eine dem Lösungsmittel ausgesetzte Spalte, die generell unpolare  $P_2'$ -Reste bevorzugt.

Die  $S_3'$ -Tasche ist eine relativ offene Region. Veränderungen der  $P_3'$ -Substituenten haben nur einen geringen Einfluss auf die Hemmwirkung.

#### **2.3.4. Rolle der MMP's bei der Tumorentwicklung**

Eines der kennzeichnenden Merkmale von Krebs ist die Bildung von Metastasen, d.h. die Ausbreitung eines primären Tumors in entfernte Teile des Körpers. Die Feststellung der Metastasenbildung ist durch das Erkennen von Endpunkten festgelegt, wie z.B. die Entdeckung von Metastasen in Organen, die vom Primärtumor entfernt liegen. Da sich die für die Metastasenbildung nötigen Schritte schwer beobachten lassen, werden diese eher aus Untersuchungen gefolgert als direkt beobachtet. Folgende Schritte werden dabei als nötig angenommen:

1. der Ausbruch der Zellen aus dem primären Tumor
2. die Intravasation, d.h. der Eintritt von Tumorzellen in den Blut- oder Lymphkreislauf
3. das Überleben und der Transport der Zellen im Blut- oder Lymphkreislauf
4. die Ankunft der Tumorzellen im Zielorgan
5. die Extravasation, d.h. der Austritt der Zellen aus dem Transportkreislauf in das Zielorgan
6. das Wachstum der Zellen, um einen sekundären Tumor in der neuen Umgebung zu bilden.

Damit sowohl der primäre als auch der sekundäre Tumor über eine Minimalgröße wachsen können, ist es für den Tumor nötig, neue Blutgefäße zu seiner Versorgung zu rekrutieren (Angiogenesis). Weiterhin muss, während aller Schritte, gewährleistet sein, dass die Tumorzellen Angriffen des Immunsystems ausweichen. Die Unterbrechung einer oder mehrere dieser Schritte sollte es ermöglichen, die Metastasenbildung zu verhindern.

Die Metastasenbildung ist nach experimentellen Studien und klinischen Beobachtungen ein sehr ineffizienter Prozess. Werden z.B. Tumorzellen in den Kreislauf von Testtieren injiziert, bildet nur ein kleiner Anteil dieser Zellen Metastasen. Die Mehrheit der Zellen, die aus einem Primärtumor ausbricht, scheitert folglich an einem der obengenannten Schritte. Die Schritte, die als limitierender Faktor für die Metastasenbildung angenommen werden, sind das Überleben im Transportsystem und der Ausbruch aus diesem.

Für die Matrixmetalloproteasen wurde schon lange angenommen, dass sie eine Rolle im Prozess der Metastasenbildung spielen. Ihre Hauptfunktion schien dabei im Abbau physikalischer Barrieren zwischen dem Primärtumor und entfernt gelegenen Stellen für die Metastasen zu liegen. Darin eingeschlossen sind demnach die lokale Invasion und Intravasation der Krebszellen, wobei die Matrixmetalloproteasen den Ausbruch aus dem Primärtumor und den Eintritt in den Lymph- oder Blutkreislauf erleichtern, den Austritt aus diesem und die lokale Invasion in entfernt gelegene Organe als ein erster Schritt zur Bildung von sekundären Tumoren. Weiterhin scheinen die Matrixmetalloproteasen beim Wachstum der primären und sekundären Tumoren wichtig zu sein, indem sie das den Tumor umgebende Gewebe abbauen und für dessen Wachstum umbauen. Weiterhin ist es für das Wachstum eines Tumors über eine bestimmte Größe hinaus erforderlich, dass dieser für seine Versorgung Blutgefäße bildet (Angiogenesis), wobei die Matrixmetalloproteasen eine wichtige Rolle zu spielen scheinen<sup>33</sup>.

### **3. Entwicklung von Zink- Endoproteaseinhibitoren**

#### **3.1. Substrat- basiertes Design**

Das Zinkion spielt die entscheidende Rolle beim katalytischen Mechanismus der Metalloproteasen. Aus 3D- Strukturen von Metalloprotease- Inhibitor-Komplexen ist bekannt, dass alle wirksamen Inhibitoren eine funktionelle Gruppe enthalten, die an das Zinkion

bindet, im Folgenden „Zink-bindende Gruppe“ (ZBG) genannt<sup>34</sup>. Diese leistet den größten Beitrag zur Affinität.

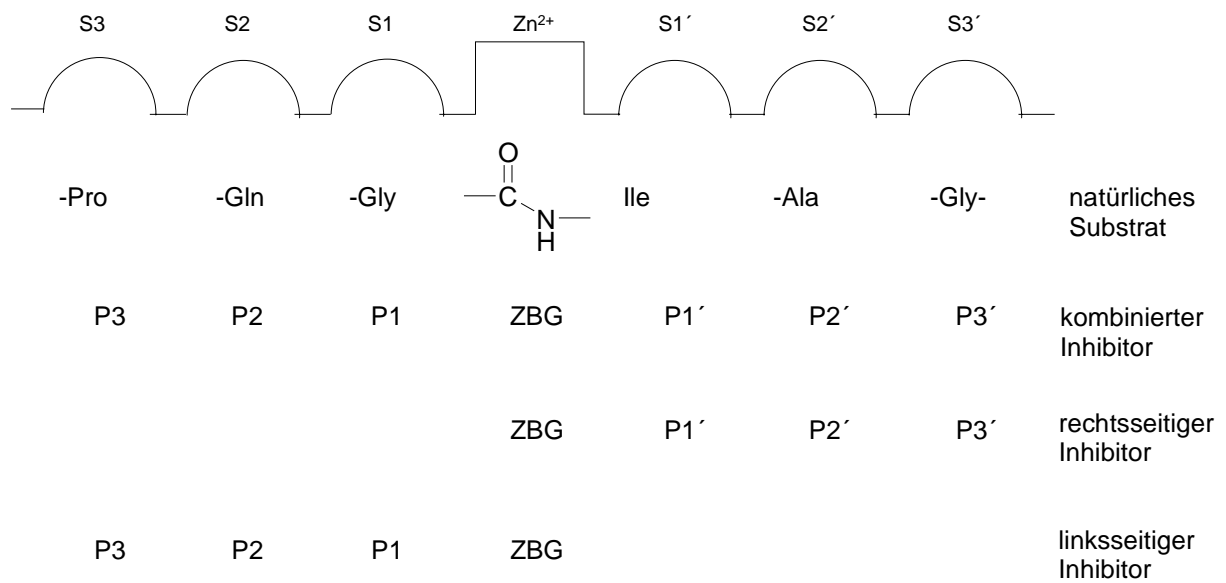
Bei der Entwicklung von Inhibitoren von Thermolysin und insbesondere der Matrixmetalloproteasen stand das Substrat-basierte Design im Vordergrund. Dabei geht man von der Struktur des Substrates des Enzyms aus. In unserem Fall wird die zu spaltende Amidbindung durch eine Zink- bindende Gruppe ersetzt, die von der Protease nicht gespalten werden kann und mit einem Peptidgerüst verknüpft, welches Teile der Spaltsequenz des Substrates nachahmt.

Dadurch lassen sich drei Klassen von Inhibitoren entwickeln [3.1.1.]:

1. Inhibitoren, bei denen die Zink-bindende Gruppe auf beiden Seiten von Aminosäureresten flankiert ist,
2. Inhibitoren, bei denen die Zink-bindende Gruppe linksseitig (N-terminal) mit Aminosäureresten verknüpft ist,
3. Inhibitoren, bei denen die Zink-bindende Gruppe rechtsseitig (C-terminal) mit Aminosäureresten verbunden ist.

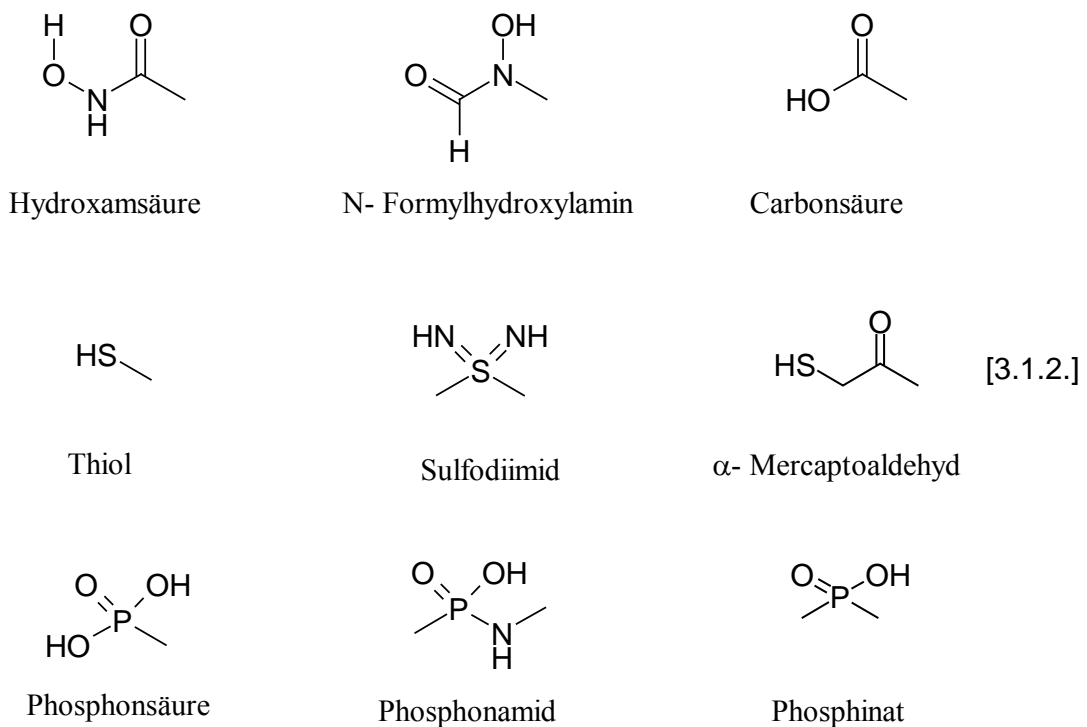
Für die Matrixmetalloproteasen lag dabei das Wissen über die Aminosäuresequenz an der Spaltstelle von humanem Tripelhelix-Kollagen durch MMP-1 zugrunde. Da die Matrixmetalloproteasen unterschiedliche Selektivitäten für die verschiedenen Matrixkomponenten besitzen, konzentrierten sich die anfänglichen Studien auf die Bestimmung der Aminosäuresequenz um die Spaltstelle in Proteinsubstraten für die einzelnen Enzyme<sup>35,36,37</sup>. Es folgten Erkenntnisse aus Spezifitätsstudien von Peptidsubstraten<sup>38,39,40,41</sup>.

Die vorwiegenden Bindungsdeterminanten der Peptidsubstrate für Zinkmetalloproteasen haben ihren Platz rechts von der Spaltstelle. Diese Vorliebe rührt wahrscheinlich daher, dass eine starke Produkthemmung durch die entstehende Carboxylgruppe, die eine gute Zink-bindende Gruppe darstellt, vermieden werden soll. Daraus ergibt sich, dass der überwiegende Teil der Thermolysin- sowie der Matrixmetalloproteaseinhibitoren eine Zink-bindende Gruppe besitzt, die mit einem Gerüst verknüpft ist, das mit Regionen rechts der Spaltstelle in Wechselwirkung tritt.



### [3.1.1.] Substrat- basiertes Design von Matrixmetalloprotease-Inhibitoren

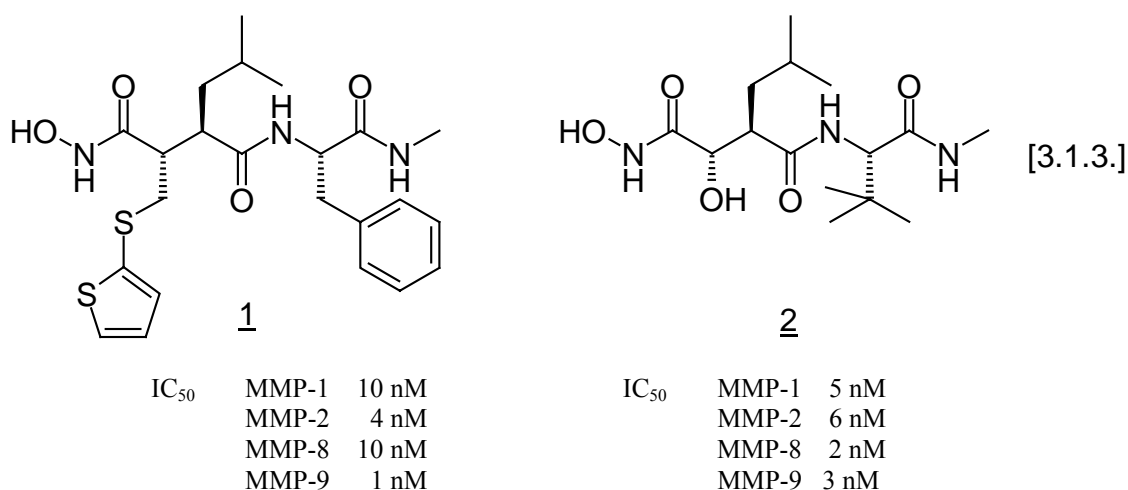
Da wie oben erwähnt die Zink- bindende Gruppe den größten Beitrag zur Affinität leistet, wurden verschiedene funktionelle Gruppen auf ihre Zinkion-komplexierenden Eigenschaften hin untersucht. [3.1.2.] zeigt häufig eingesetzte Zink-bindende Gruppen<sup>34,35</sup>:



Beispiele häufig als Zink-bindende Gruppen eingesetzter funktioneller Gruppen

Die bisher größte Wirkung zeigen die Hydroxamsäuren, während die N-Formylhydroxylaminderivate ca. 5- 10-fach schwächer sind. Beide binden an das Zinkion als zweizähliger Ligand <sup>43</sup>. Die Mercaptogruppe bindet an das Zinkion nur als einzähliger Ligand, ist aber dennoch nur 20- 50-fach weniger wirksam als die Hydroxamsäuren. Dieses ist wahrscheinlich auf die leichtere Ionisierbarkeit und den geringen Aufwand zur Desolvatation zurückzuführen <sup>1</sup>. Carbonsäuren, Phosphonsäuren und Phosphinate sind 100- 2000-fach schwächer wirksam als die Hydroxamsäuren <sup>44</sup>, während die Sulfodiimide die schwächste Wirkung zeigten <sup>45</sup>.

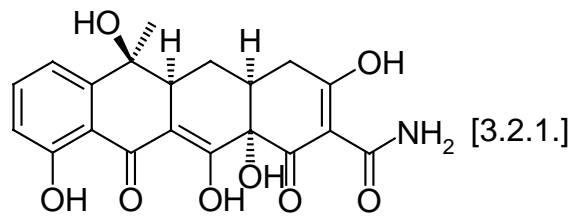
[3.1.3] zeigt als zwei Beispiele die Hydroxamsäureinhibitoren Bastimastat 1 und Marimastat 2, die bereits klinisch geprüft wurden <sup>46</sup>.



### 3.2. Screening von Naturstoffbibliotheken

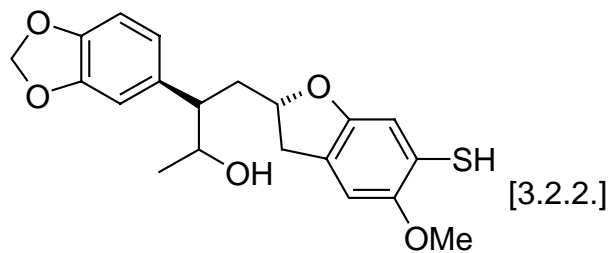
Unter Screening (engl. *to screen* "durchmustern", durch Eliminierung auswählen) versteht man die mehr oder weniger gezielte biologische Prüfung großer Zahlen von Substanzen. Dieser erste Schritt auf der Suche nach neuen Wirkstoffen wurde früher an Versuchstieren durchgeführt. Heute überwiegen molekulare Testsysteme und Zellkulturmodelle <sup>47</sup>.

Screening führte zu der Entdeckung von Matrixmetalloproteaseinhibitoren, die auf Naturprodukte zurückgehen, wie z.B. Tetracycline wie Aranciamycin und Minocycline, für die herausgefunden wurde, dass die Aktivität gegenüber Matrixmetalloproteasen von der antibiotischen Wirkung durch chemische Modifikation getrennt werden kann <sup>48,49</sup>, wie z.B.:

3

IC<sub>50</sub> MMP-8 30 μM  
MMP-13 1 μM

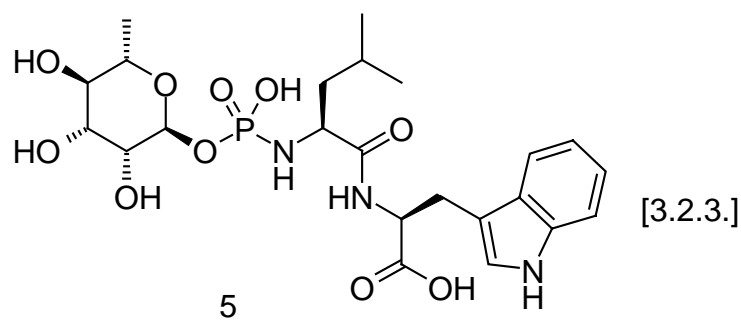
Weitere Naturstoffe beinhalten Catechin- Derivate <sup>50</sup>, Pycnidione <sup>51</sup> und eine Reihe von Futoenon- Derivaten <sup>52</sup>, z.B.:

4

IC<sub>50</sub> MMP-3 600 nM

Es ist nicht unmittelbar ersichtlich, wie diese diversen Stoffe mit den Matrixmetalloproteasen in Wechselwirkung treten. Möglicherweise bindet eine Hydroxylgruppe des Rings und/ oder eine Carbonylgruppe an das Zinkion. So verstärkte der Austausch einer Hydroxylgruppe gegen eine Thiolfunktion wie in [3.2.2.] die Hemmwirkung gegen Stromelysin. Dieses ist wahrscheinlich auf die stärkere Zinkion-Komplexierung zurückzuführen <sup>52</sup>.

Als Beispiel für einen natürlichen Hemmstoff für Thermolysin ist Phosphoramidon zu nennen, das mit einem K<sub>i</sub>- Wert von  $2,8 \cdot 10^{-8}$  M eine starke Affinität aufweist.

5

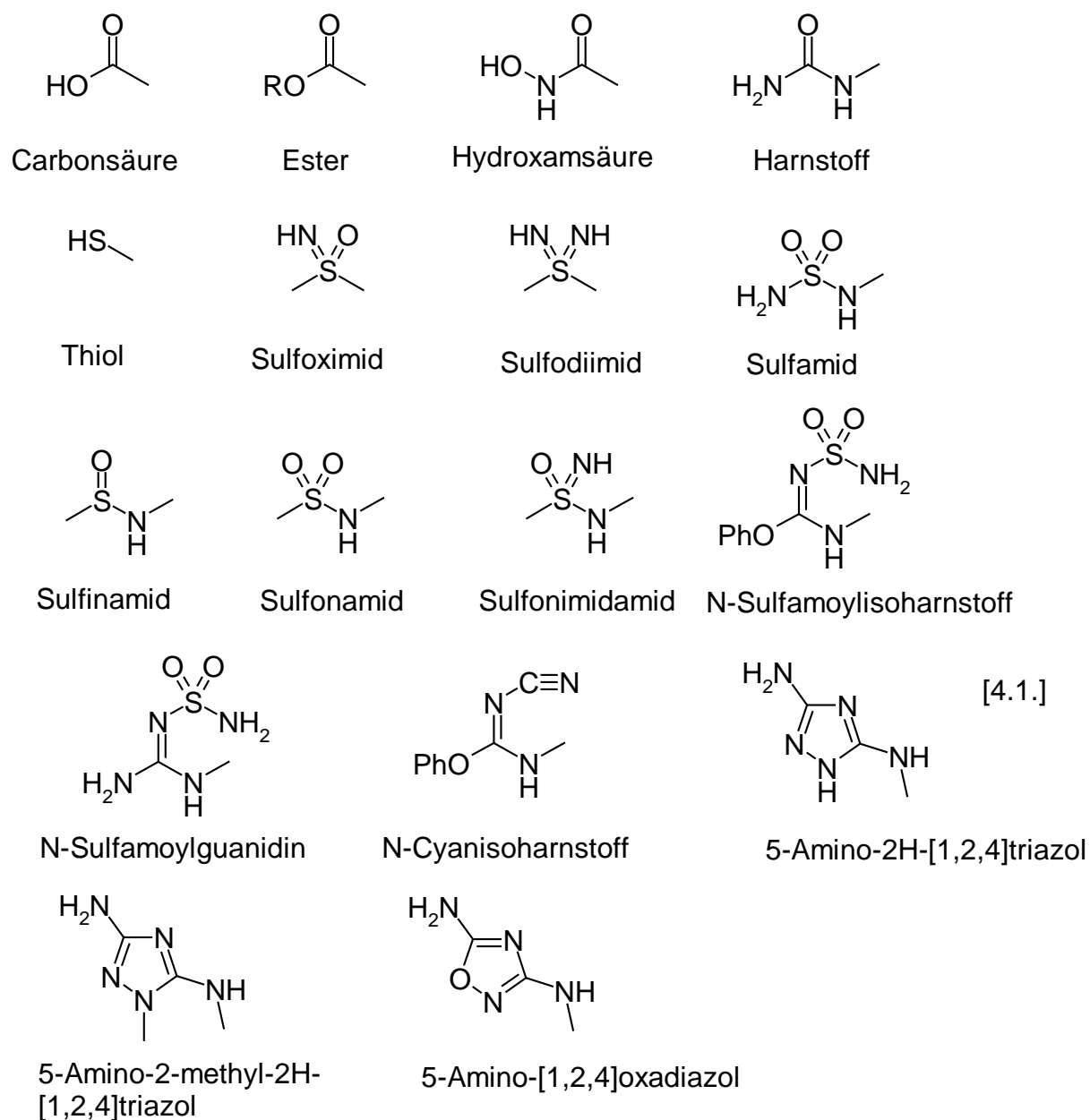
#### 4. Aufgabenstellung

Meine Aufgabe bestand in der Darstellung von Hemmstoffen der Zinkendoproteasen Thermolysin und der Matrixmetalloproteasen. Dabei sollte von einem peptidischen Grundgerüst ausgegangen werden, welches mit neuen Zink- bindenden Gruppen verknüpft werden sollte. Das Grundgerüst sollte nach einem Substrat-basierten Ansatz aus einem Dipeptid bestehen. Mit diesem sollten vor allem solche funktionellen Gruppen verknüpft werden, deren Zink-bindenden Eigenschaften eine hemmende Wirkung auf Thermolysin und die Matrixmetalloproteasen erwarten ließen. Hierbei standen neuartige Bausteine-vorzugsweise auf der Basis S-/N-funktioneller Strukturen- im Vordergrund.

Zunächst untersuchte ich, welche Aminosäuren sich als geeignet erweisen, in das dipeptidische Grundgerüst eingebaut zu werden. Dabei ging ich aufgrund der Literatur von dem Ergebnis aus, dass die meisten bisher entwickelten Hemmstoffe rechts (nach der Nomenklatur von Schlechter & Berger) vom aktiven Zentrum binden. Da die  $S_2'$ - Bindetasche eine relativ offene Region mit einer gewissen Vorliebe für aromatische Aminosäuren ist, sollten an dieser Stelle Phenylalanin oder Tryptophan eingesetzt werden. Ich versuchte also zunächst eine geeignete Aminosäure zu finden, die an die  $S_1'$ - Bindetasche bindet.

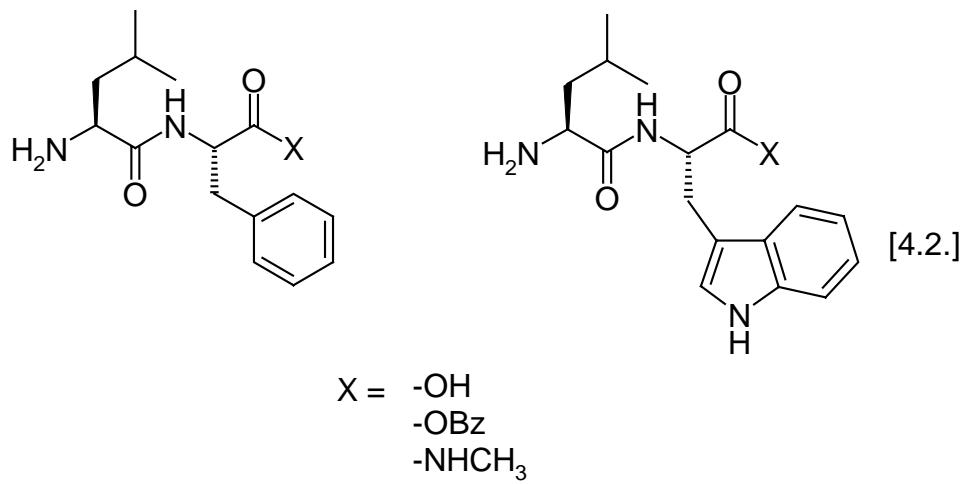
Danach sollten verschiedene Bausteine mit diesem Grundgerüst verknüpft werden, um deren Eignung auf ihre Zink- bindenden Eigenschaften auf die genannten Metalloproteasen zu testen.

Hierbei wurden z.B. folgende funktionelle Gruppen berücksichtigt [4.1.]:



Eine synthetische Herausforderung bildete in diesem Zusammenhang insbesondere die Verknüpfung von Dipeptidbausteinen mit vorstehend genannten Schwefel-/Stickstofffunktionen.

Als konstant gehaltene Strukturelemente wurde gemäß [4.2] vorwiegend mit folgenden Dipeptiden eine Verknüpfung vorgenommen:



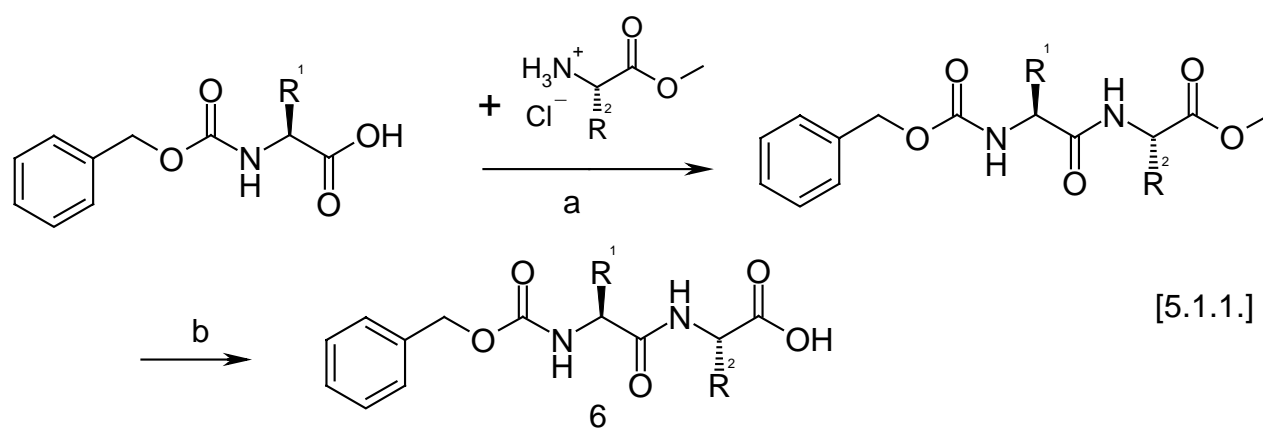
Darüber hinaus kamen jedoch an Stelle von Leucin auch  $\beta$ -Alanin sowie, als sterisch anspruchsvolle Aminosäure, Cyclohexylalanin zum Einsatz.

## 5. Entwicklung neuer peptidomimetischer Hemmstoffe von Zink- Endoproteasen

### 5.1. Synthese von N-geschützten Dipeptiden (Z-Dipeptide)

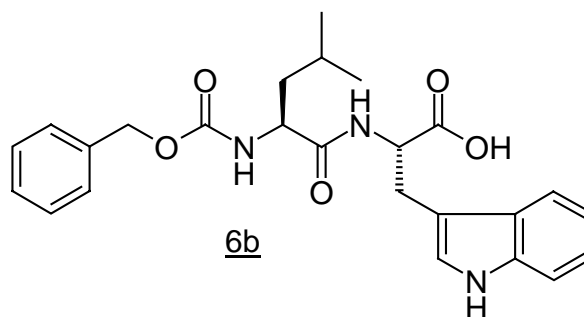
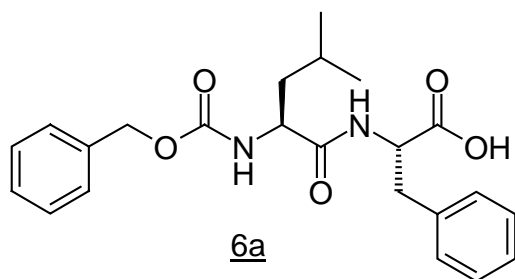
Um einen Überblick darüber zu bekommen, welche Aminosäuren sich als Gerüst für die weitere Verknüpfung mit einer Zink- bindenden Gruppe eignen und somit möglicherweise die S1'- und S2'-Tasche besetzen, stellte ich eine Reihe von Z-geschützten Dipeptiden 6 dar.

Dabei wurde gemäß Schema [5.1.1.] eine N-Z-geschützte Aminosäure mit Chlorameisensäureisobutylester als gemischtes Anhydrid aktiviert und mit dem Methylester der zweiten Aminosäure gekoppelt. Um die freie Carboxylfunktion zu erhalten, wurde der Methylester anschließend mit Lithiumhydroxid verseift.

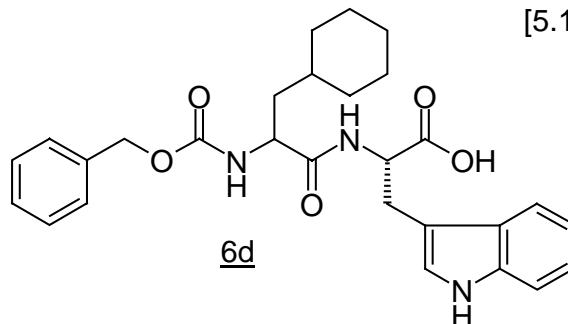
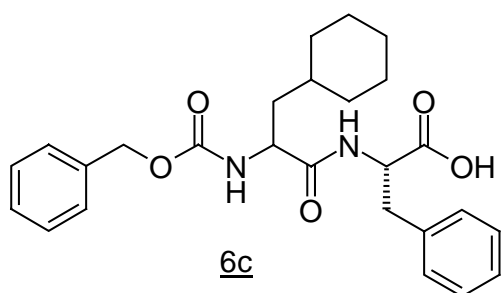


- a) Chlorameisensäureisobutylester, N-Methylmorpholin, DMF,  $-15^{\circ}\text{C}$  5 min., dann über Nacht RT,  
b) LiOH, THF, über Nacht, c) Pd-C/  $\text{H}_2$ , Ethanol

Auf diese Weise wurden die N-geschützten Dipeptide 6a-e hergestellt ([5.1.2.] bzw. [5.1.3.]):

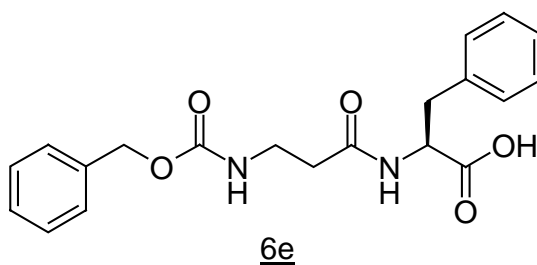


[5.1.2.]



Für diese Bausteine ergaben sich auf Grund einer fehlenden Zink-bindenden Gruppe bei der Testung an Thermolysin keine Hinweise auf eine hemmende Wirkung (vgl. Kap.6).

In diesem Zusammenhang wurde auch als sterisch nicht anspruchsvolles Strukturelement Z-β-Alanin mit Phenylalanin zum Dipeptid **6e** (Z-β-Ala-Phe-OH) verknüpft. Seine Testung an Thermolysin führte ebenfalls zu keiner nennenswerten Aktivität. Hingegen lieferten Wirkungsprüfungen an den MMP's 1, 2, 8 und 9 sowie an Chlostridium-Kollagenase (ChC) die unter [5.1.3.] genannten IC<sub>50</sub>-Werte im mikromolaren Bereich. Offensichtlich vermag diese Substanz im aktiven Zentrum von Matrixmetalloproteasen Bindungstaschen zu besetzen.



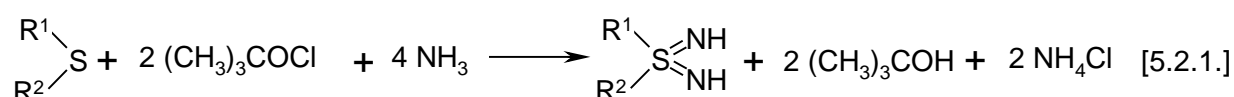
[5.1.3.]

**IC<sub>50</sub>-Werte**

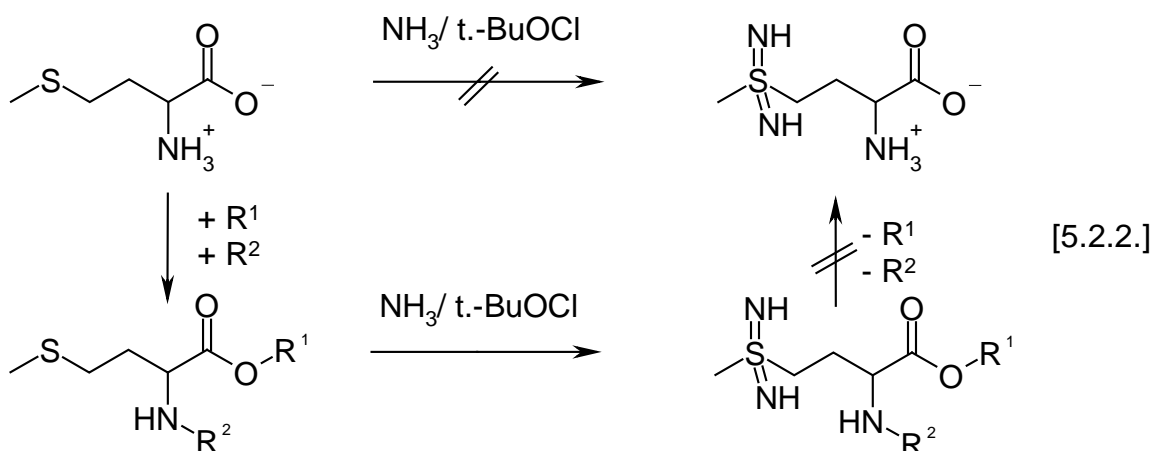
MMP-1	80 μM
MMP-2	67 μM
MMP-8	58 μM
MMP-9	51 μM
ChC	87 μM

## 5.2. Synthese von Methioninsulfodiimid-Derivaten

Da die Sulfodiimidgruppe in der Literatur als Zink-bindende Gruppe beschrieben ist, versuchte ich, ausgehend von Methionin als Modellsubstanz (vgl. [5.2.2]), das freie Methioninsulfodiimid herzustellen, um es später als Aminosäure-Baustein einsetzen zu können. Untersuchungen hierzu lagen bereits im Arbeitskreis vor. Zur Überführung von Thioethern in Sulfodiimide wurde von Haake<sup>53,54</sup> die „Hypochlorit/ Ammoniak- Methode“ entwickelt, die sich vor allem zur Darstellung von symmetrischen, unsymmetrischen und cyclischen S,S- Dialkylsulfodiimiden eignet. Hierbei wird t.-Butylhypochlorit als Chlorierungsreagenz benutzt [5.2.1.]. Es bildet mit dem in Acetonitril gelöstem Ammoniak bei  $-50^{\circ}\text{C}$  Chloramin „in situ“. Dieses greift dann den Thioether chlorierend bzw. aminierend an.



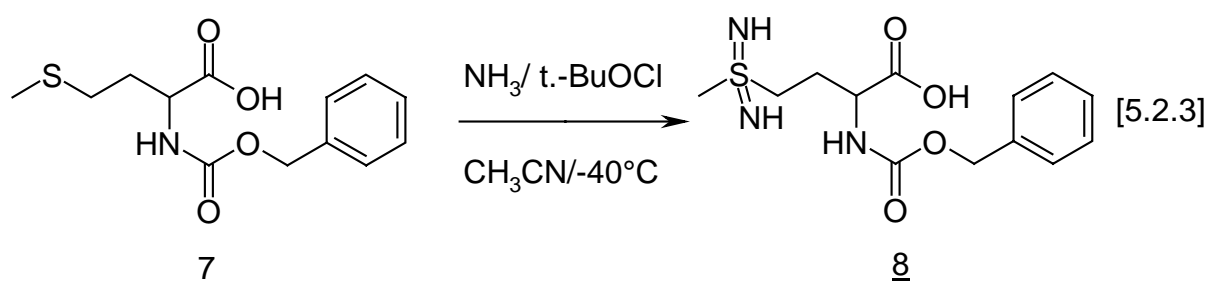
Methionin weist neben der Thioethergruppe noch eine primäre Aminofunktion auf, die besonders empfindlich gegenüber den oxidativen Bedingungen zur Darstellung der Sulfodiimide ist. Schon Pothmann<sup>55</sup> stellte fest, dass sich Methionin ohne Schutzgruppen nicht nach der „Hypochlorit/ Ammoniak- Methode“ in das freie Methioninsulfodiimid überführen lässt.



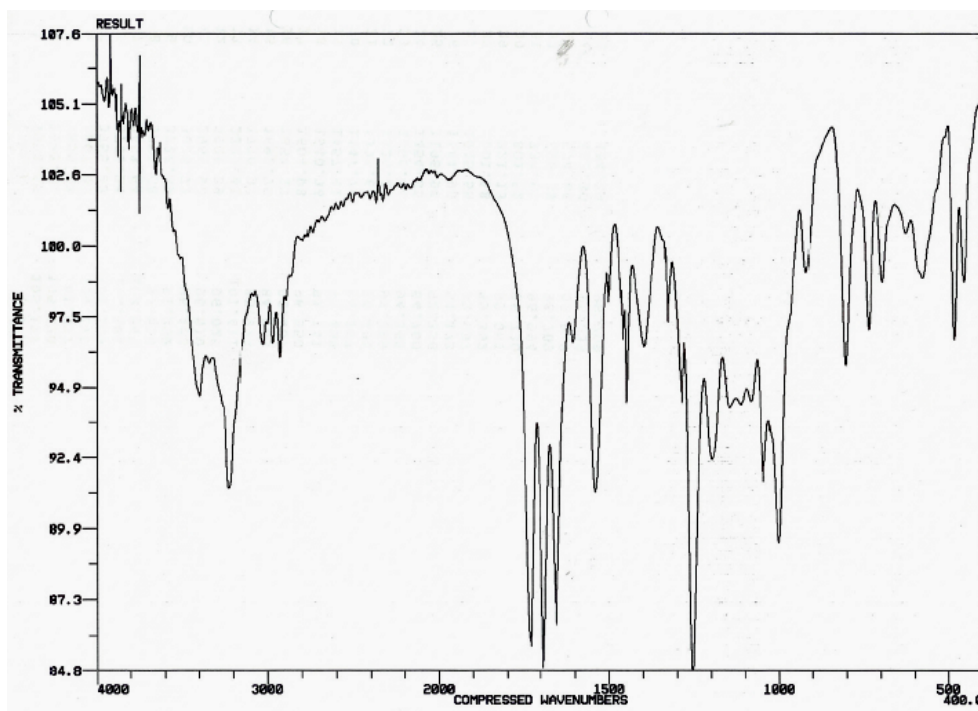
Mit geeigneten Schutzgruppen sowohl an der Amino- als auch an der Carboxylfunktion gelang Pothmann und später Zimmermann <sup>56</sup> zwar die Umsetzung zum geschützten Methioninsulfodiimid, jedoch nicht die weitere Abspaltung der Schutzgruppen zum „freien“ Methioninsulfodiimid. Stattdessen führten die Abspaltungsversuche zur Zersetzung oder es trat keine Reaktion ein.

Um die Abspaltung von zwei Schutzgruppen zu umgehen, versuchte ich daher, nur die Aminofunktion zu schützen und die Carboxylgruppe ungeschützt zu lassen. Über diesen Weg hatte bereits Schrage <sup>57</sup> ebenfalls versucht, zum freien Methioninsulfodiimid zu gelangen. Da nach den Erfahrungen von Pothmann, Zimmermann und Schrage die Abspaltung der N-Schutzgruppe unter sauren Hydrolysebedingungen nicht zum Erfolg geführt hatte, entschied ich mich für die N-Carbobenzoxycarbonylgruppe (Z), die sich hydrogenolytisch abspalten lässt.

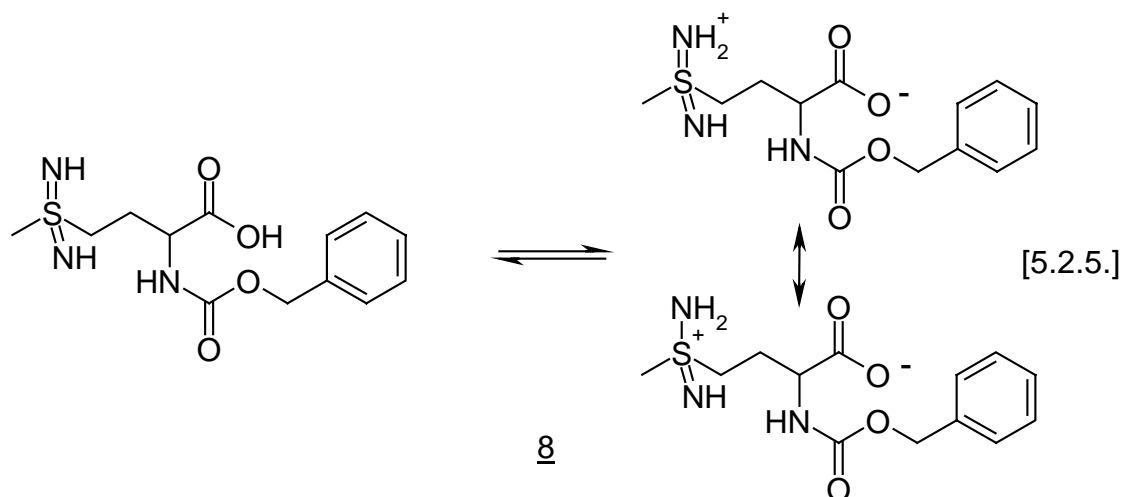
Dazu unterwarf ich N-Z-Methionin 7 der Hypochlorit/ Ammoniak- Methode, die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel 60. Die Ausbeute an isoliertem 8 lag bei 10%.



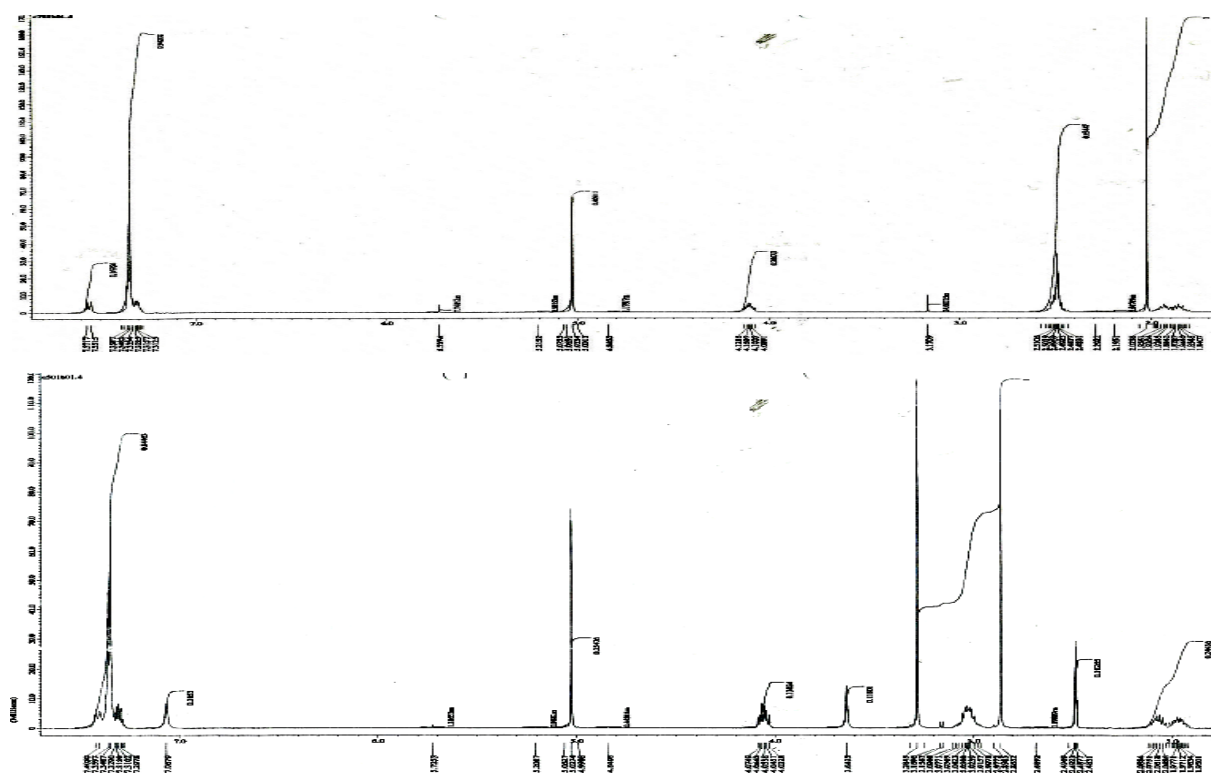
Im IR-Spektrum fallen insbesondere die Banden für die symmetrische und asymmetrische Streckschwingung der N=S=N- Bindung bei 1047 und 970  $\text{cm}^{-1}$  auf [5.2.4.]. Im Vergleich zu 7 tritt in 8 bei 3215  $\text{cm}^{-1}$  eine zusätzliche starke Bande auf, die wahrscheinlich der NH-Streckschwingung der S=NH-Gruppe zu zuschreiben ist.

[5.2.4.] IR-Spektrum von 8

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ergeben die  $\text{S}=\text{NH}$ -Protonen zwei Singulett-Signale bei 3.54 und 3.28 ppm. Dem Integral des Signals bei 3.54 ppm entspricht dabei ein Proton, dem Integral des Signals bei 3.28 ppm zwei Protonen. Dies spricht für das Vorliegen von 8 in einer Art „Betain-Struktur“ [5.2.5.]. 8 besitzt mit der Carbonsäurefunktion eine saure Gruppe, während die Sulfodiimid-Funktion schwach basische Eigenschaften aufweist mit  $\text{pK}_\text{B}$ -Werten zwischen 8 und 9<sup>58</sup>. 8 ist damit mit einer Aminosäure vergleichbar, und es ist vorstellbar, dass es als Zwitterion vorliegt.



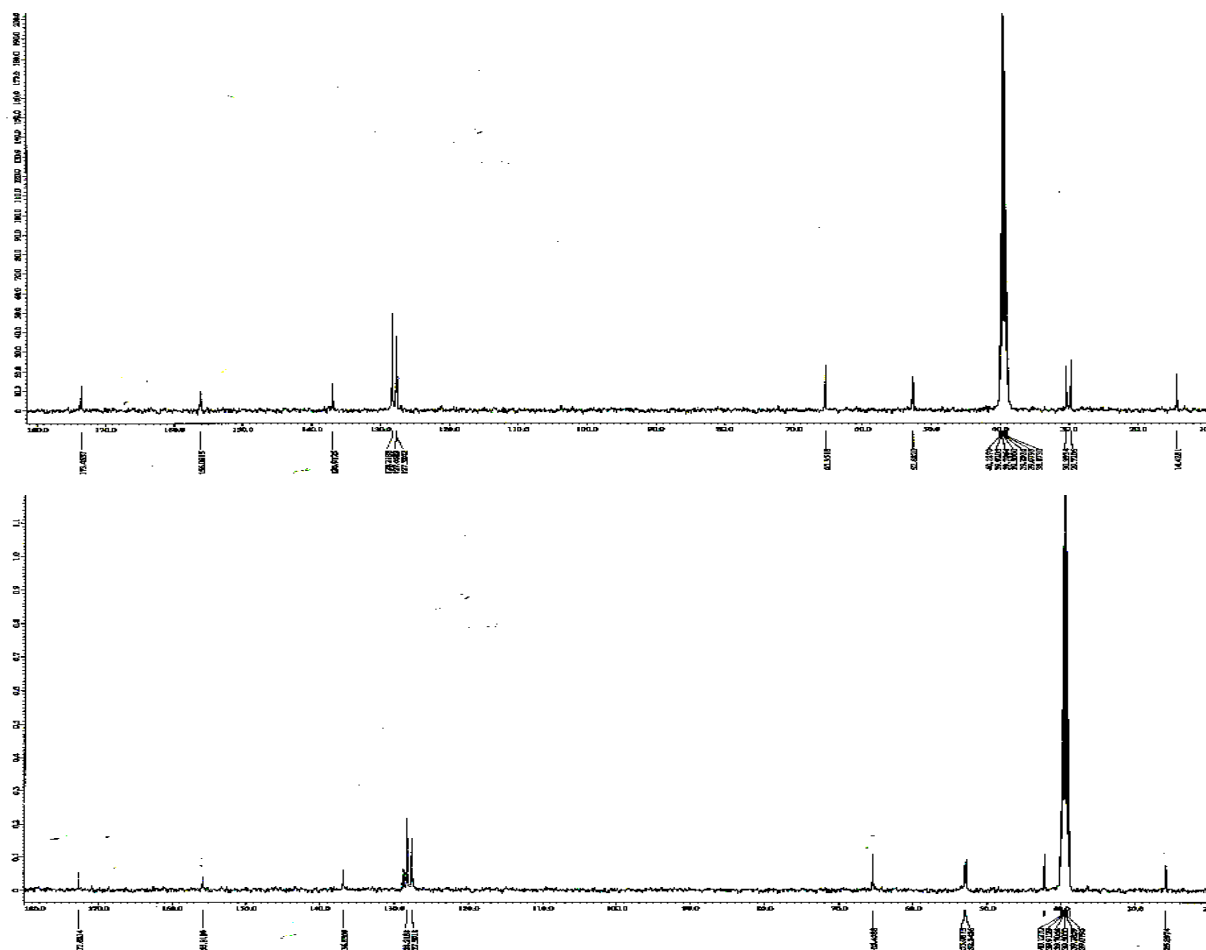
Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von N-Z-Methionin-sulfodiimid 8 zeigt gegenüber von N-Z-Methionin 7 eine charakteristische Tieffeldverschiebung der S-Methyl- und S-Methylenprotonen, die von der Oxydation des Schwefels herrührt und schon von Zimmermann beobachtet wurde. Die als Singulett auftretenden Protonen der S-Methylgruppe sind gegenüber dem Edukt von 2.02 ppm auf 2.87 ppm verschoben, die dem Schwefel benachbarten Methylenprotonen ergeben ein Multipllett bei 3.11 – 2.97 ppm, die im Edukt bei 2.57 – 2.07 ppm erscheinen. Die Tieffeldverschiebung setzt sich bei den zum Schwefel  $\beta$ -ständigen Methylenprotonen fort, sie treten als Multipllett bei 2.13 – 1.92 ppm auf gegenüber 1.99 – 1.84 ppm beim Edukt.



[5.2.6.]  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 7 (oben) und 8 (unten) in  $\text{DMSO-d}_6$

Noch deutlicher als im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ist die Tieffeldverschiebung im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum erkennbar. Die S-Methylgruppe ist im Sulfodiimid gegenüber dem Edukt um 11.5 ppm verschoben und erscheint bei 25.9 ppm. Die Signale der Kohlenstoffe in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Position zum Schwefel treten bei 52.9 und 42.3 ppm auf, im Edukt liegen sie bei 29.7 und 30.4 ppm. Neben der Oxidation des Schwefels ist als weiterer Grund für die Tieffeldverschiebung das Vorliegen von 8 in der Betain-Struktur denkbar, da durch die

Protonierung der Sulfodiimid-Gruppe am Stickstoff die Signale der benachbarten Methyl- und Methylengruppe ebenfalls zu tieferem Feld verschoben werden.



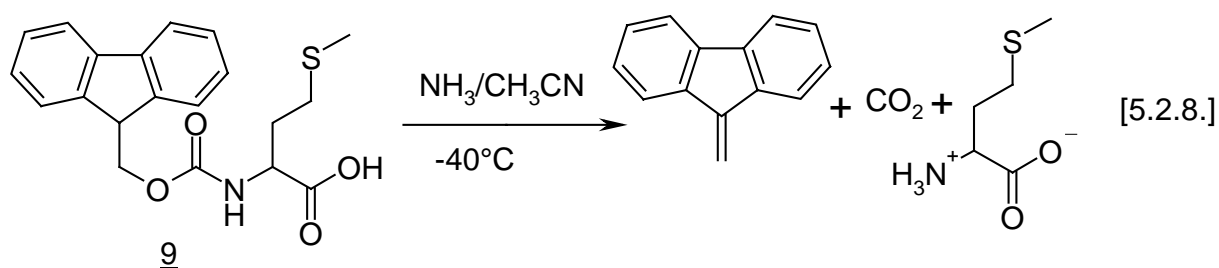
[5.2.7]  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von 7 (oben) und 8 in  $\text{DMSO-d}_6$

Im weiteren versuchte ich, die N-Carbobenzoxycarbonylgruppe hydrogenolytisch abzuspalten. Setzte ich Palladium auf Aktivkohle ein, trat keine Reaktion ein. Auch die Abspaltung mit Palladium-Mohr in flüssigem Ammoniak, welche für die Entfernung der Carbobenzoxycarbonylgruppe bei Anwesenheit schwefelhaltiger Gruppen wie Methionin- und Cystein geeignet sein soll, führte zu keinem Erfolg<sup>59</sup>. Setzte ich Ammoniumformiat als Wasserstoff-Donator und Palladium auf Aktivkohle ein, kam es lediglich zur Zersetzung.

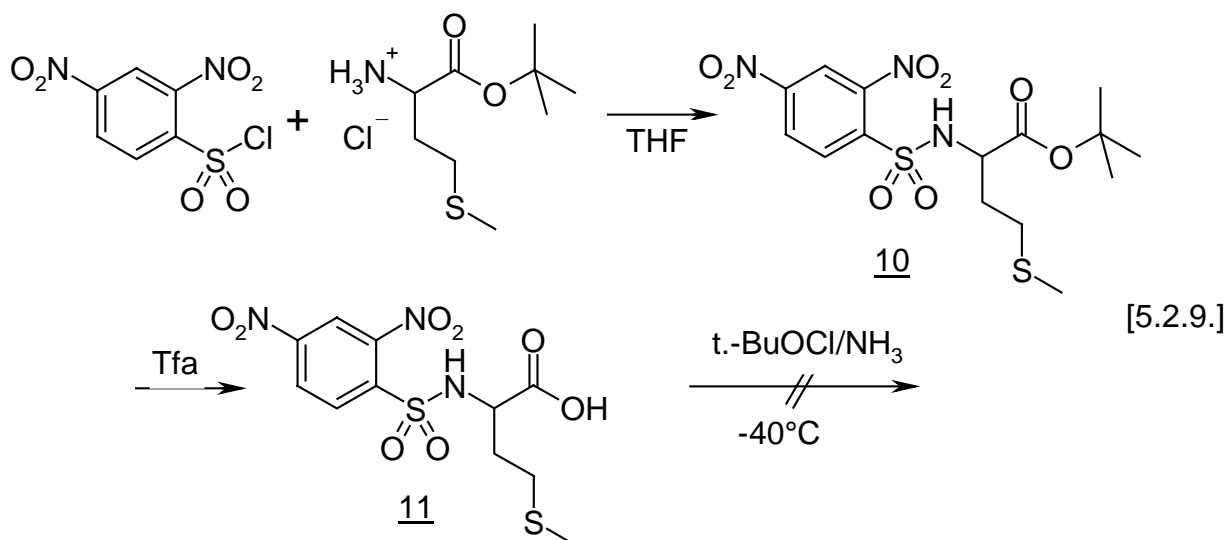
Da ich mit der hydrogenolytischen Abspaltung der Z-Schutzgruppe keinen Erfolg hatte, suchte ich nach Schutzgruppen, die sich unter milden basischen Bedingungen entfernen lassen. Die 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-Gruppe (Fmoc) wird zwar in der Literatur als solche beschrieben<sup>60</sup>, jedoch bestand die Gefahr, dass eine Eliminierung auch schon beim

Edukt Fmoc-Methionin unter den gewählten Bedingungen ( $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{CN}$ ) stattfinden kann. Trotzdem schien mir diese Schutzgruppe einen Versuch wert. Daher sollte Fmoc-Methionin 9 den Bedingungen der Sulfodiimid-Synthese unterworfen werden.

Leider kam es schon nach Zugabe von flüssigem Ammoniak zur Lösung von Fmoc-Methionin in Acetonitril zur Abspaltung der Schutzgruppe [5.2.8.]:



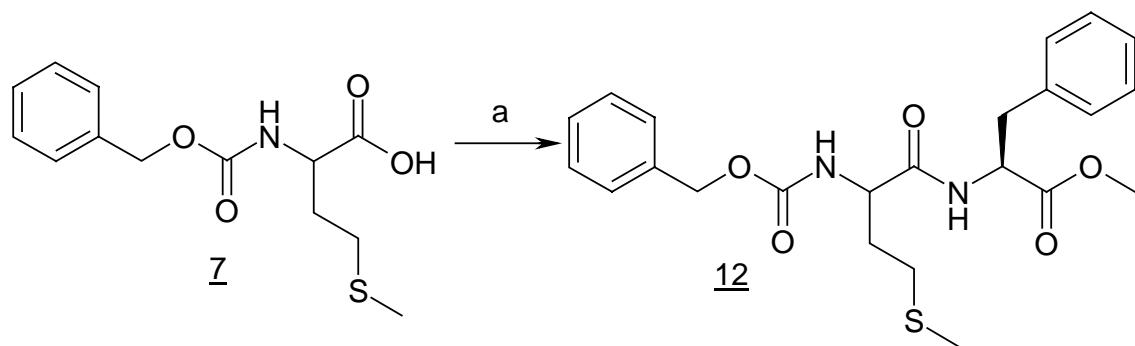
Eine weitere günstige Schutzgruppe für die Aminofunktion schien die 2,4-Dinitrobenzensulfonamidgruppe [5.2.9.], die sich laut Literatur <sup>61</sup> ebenfalls unter milden Bedingungen mittels 2-Mercaptoethanol/DBU oder Phenylmercaptan/Cäsiumcarbonat abspalten lässt. Daher setzte ich Methionin-t.-butylester mit 2,4-Dinitrobenzensulfonylchlorid zu 2,4-Dinitrobenzensulfonyl-methionin-t.-butylester 10 um und spaltete diesen mit Trifluoressigsäure zur freien Säure 11.



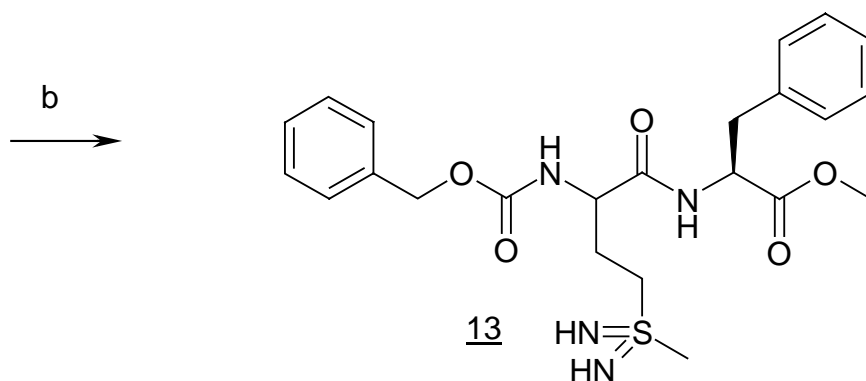
Der Versuch, N-2,4-Dinitrobenzensulfonyl-methionin 11 zum Sulfodiimid umzusetzen, scheiterte, da auch diese Schutzgruppe unter den basischen Bedingungen der Hypochlorit/

Ammoniak- Methode bereits abgespalten wurde (wahrscheinlich unter Bildung von freiem Methionin).

Da der Zugang zum freien Methioninsulfodiimid als Synthesebaustein für Dipeptide nicht gelang, versuchte ich zunächst, das noch nicht oxydierte Z-Methionin 7 mit Phenylalaninmethylester über die gemischte Anhydridmethode zu koppeln [5.2.10.]. Das geschützte Dipeptid 12 unterwarf ich anschließend der Hypochlorit/ Ammoniak- Methode. Nach chromatographischer Aufarbeitung erhielt ich das gewünschte Produkt 13 mit 63,5% Ausbeute.



[5.2.10.]



a) Chlorameisensäureisobutylester, N-Methylmorpholin, H-Phe-OMe x HCl, DMF, -15°C 5min., dann über Nacht RT

b) tert.-Butylhypochlorit, Ammoniak, Acetonitril, -40°C

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum ist wieder die Tieffeldverschiebung der Signale für die Kohlenstoffe um den Schwefel infolge der oxidativen Aminierung beobachtbar. So erscheint das Signal für den Kohlenstoff der  $\text{SCH}_3$ -Gruppe bei 27.5 ppm, die Signale der Kohlenstoffe in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Position zum Schwefel treten bei 51.2 ppm und 46.5 ppm auf.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum treten die Signale für die beiden  $\text{S}=\text{NH}$ -Protonen als Singulets bei 3.04 ppm und 2.95 ppm auf. Das Signal der Protonen der  $\text{SCH}_3$ -Gruppe ist tieffeldverschoben und erscheint bei 2.16 ppm, die Signale der Protonen der Methylengruppen in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Position zum Schwefel treten als Multipletts bei 2.55 – 2.24 ppm und 2.03 – 1.85 ppm auf.

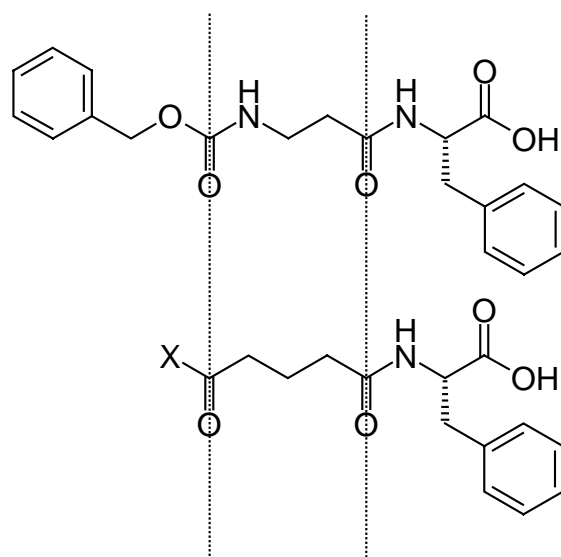
Im IR-Spektrum erscheinen die Banden für die symmetrische und die asymmetrische Streckschwingung der  $\text{N}=\text{S}=\text{N}$ - Bindung bei 1084 und 978  $\text{cm}^{-1}$ .

Der Versuch, den Methyl ester 13 mit Lithiumhydroxid zu verseifen, führte leider nicht zur gewünschten freien Carbonsäure, sondern zur Zersetzung.

Gegenüber Thermolysin zeigte weder 13 noch sein Methioninbaustein 8 inhibitorische Wirkung. An MMP's liegen noch keine Testergebnisse vor.

### 5.3. Synthese von Hydroxamsäure-Derivaten

In der Literatur sind sowohl die Carbonsäuregruppe als auch die Hydroxamsäuregruppe als gute Zink- bindende Gruppen beschrieben. Es erschien mir daher sinnvoll, zwei Vertreter dieser Stoffklassen herzustellen. Da Z- $\beta$ -Ala-Phe-OH 6e bei den Wirkungsprüfungen an den MMP's 1, 2, 8 und 9 sowie an Chlostridium-Kollagenase  $\text{IC}_{50}$ -Werte im mikromolaren Bereich gezeigt hatte (vgl. [5.1.3.]), entschied ich mich, zwischen der Zink-bindenden Gruppe (Carbonsäure, Hydroxamsäure) und der Aminosäure P2' (Phe) einen möglichst beweglichen Linker einzubauen [5.3.1.].

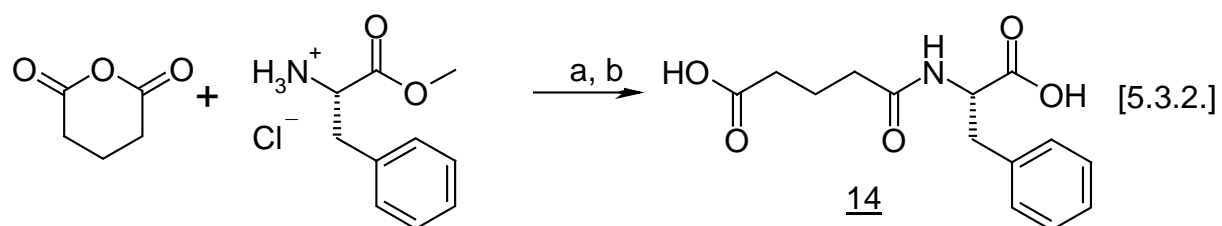


[5.3.1]

$\text{X} = -\text{OH}, -\text{NHOH}$

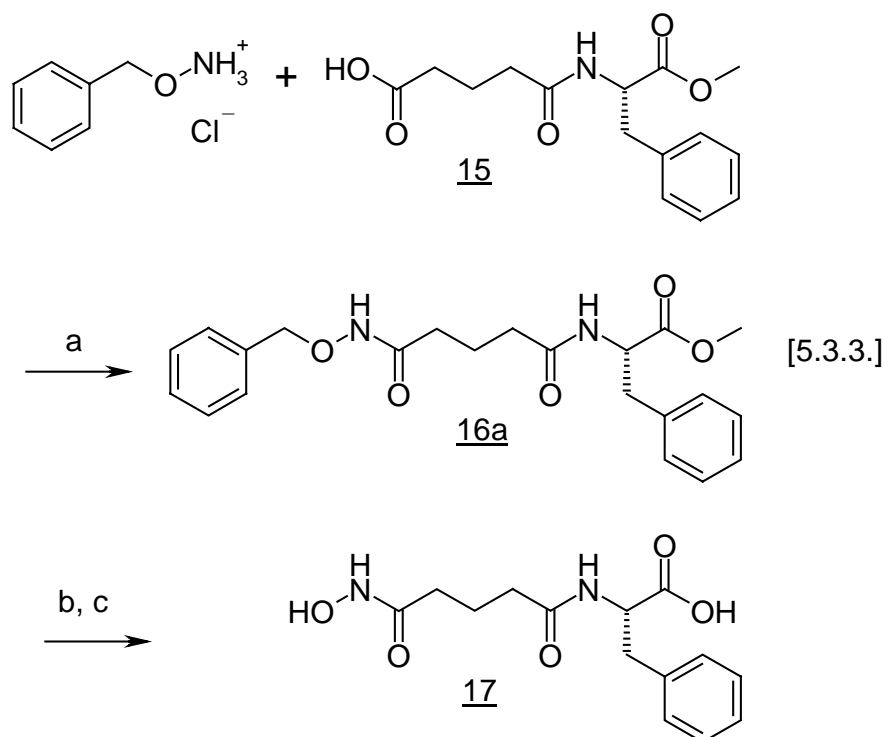
Meine Wahl fiel auf Glutarsäure, da der Abstand zwischen den Carbonylgruppen dem bei 6e ähnelt. Daher setzte ich Glutarsäureanhydrid mit Phenylalaninmethylester um [5.3.2.].

Der entstandene N-Glutaryl-phenylalaninmethylester wurde anschließend mit Lithiumhydroxid verseift, um N-Glutaryl-phenylalanin 14 mit freien Carbonsäurefunktionen zu erhalten. Die Gesamtausbeute betrug 47%.



a) N-Methylmorpholin, Dioxan, 2h Rückfluss; b) LiOH, THF, RT, über Nacht

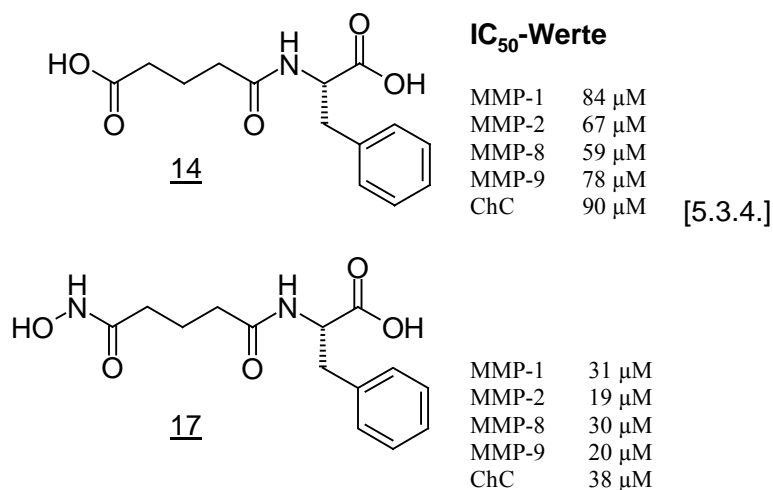
Weiterhin kuppelte ich den N-Glutaryl-phenylalaninmethylester 15 mit O-Benzylhydroxylamin über die gemischtes Anhydrid-Methode mittels Chlorameisensäureisobutylester zum Methylester als Zwischenprodukt [5.3.3.]. Dessen Verseifung mit Lithiumhydroxid und anschließende Hydrogenolyse der Benzylgruppe lieferte die gewünschte Hydroxamsäure. Die Gesamtausbeute an 17 (a→c) betrug 15%.



a) Chlorameisensäureisobutylester, N-Methylmorpholin, DMF,  $-15^{\circ}\text{C}$  5 min., dann über Nacht RT, b) LiOH, THF, über Nacht, c) Pd-C/  $\text{H}_2$ , Ethanol

Sowohl die freie Carbonsäure 14 als auch die entsprechende Hydroxamsäure 17 zeigten keine Wirkung gegenüber Thermolysin.

Gegenüber den Matrixmetalloproteasen (MMP-1, -2, -8 und -9) wurden folgende IC<sub>50</sub>-Werte gemessen [5.3.4.]:

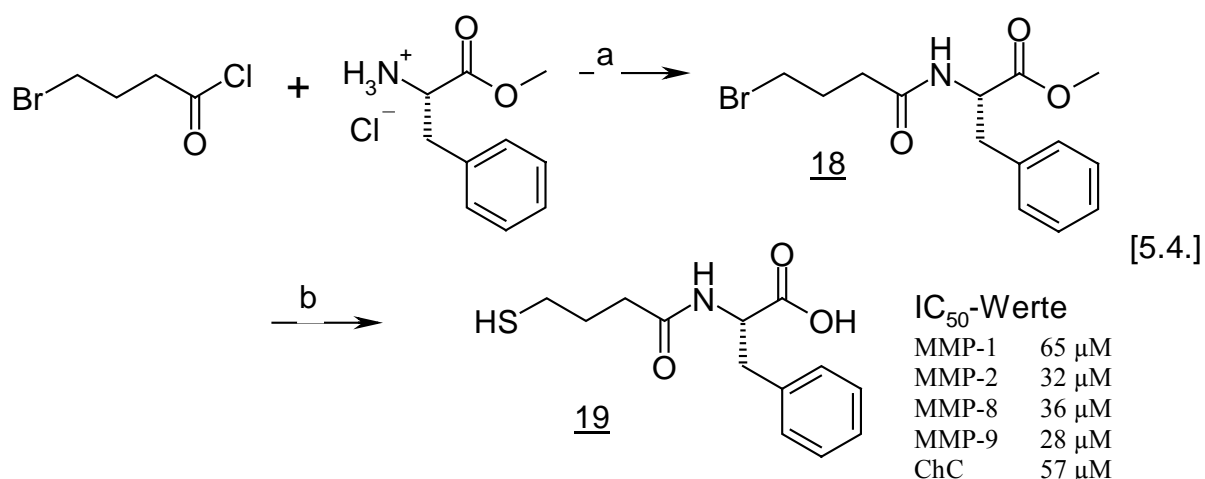


Erwartungsgemäß erwies sich die Hydroxamsäure 17 um ca. Faktor 2 stärker als die Carbonsäure 14. Die Werte für 14 entsprechen in etwa denen, die bei 6e gefunden wurden.

#### 5.4. Synthese eines Thiols

Außer der Hydroxamsäuregruppe ist auch die Thiolgruppe eine der wirksamsten Funktionen, um das katalytische Zinkion in Metalloproteasen zu komplexieren. Für die Herstellung eines Thiols ging ich wiederum von den Ergebnissen von 6e aus und beschloss, die Zink-bindende Gruppe mit der zweiten Aminosäure P2' mit einem beweglichen Linker in einem Abstand von drei Methylengruppen zwischen der Thiolgruppe und der Amidgruppe zu verknüpfen.

Ausgehend von 4-Brombuttersäurechlorid stellte ich daher 4-Brombuttersäurephenylalaninmethylester durch Kupplung mit Phenylalaninmethylester her. Die Überführung in das Thiol erfolgte in bekannter Weise <sup>62</sup> mit Thioharnstoff über das S-Alkylthiuroniumsalz [5.4.].

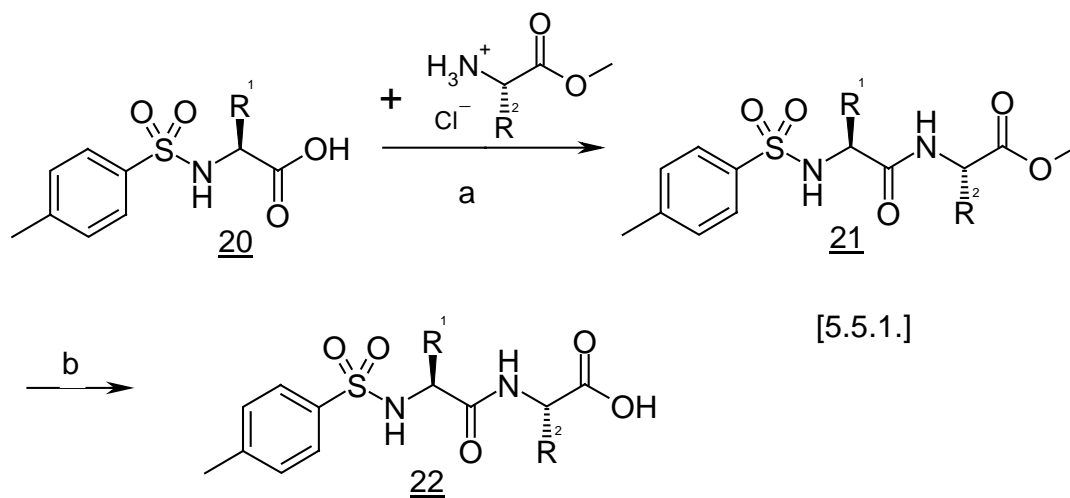


a) NMM, Acetonitril, 30 min. 0°C dann über Nacht RT; b) Thioharnstoff, Ethanol, 2h Rückfluss dann NaOH über Nacht RT

Das Thiol 19 ließ gegenüber Thermolysin keine Wirkung erkennen. Gegenüber den Matrixmetalloproteasen (MMP-1, -2, -8 und -9) sowie gegenüber Chlostridium-Kollagenase (ChC) lag die Hemmwirkung im mikromolaren Bereich. Im Vergleich mit der Carbonsäure 14 und der Hydroxamsäure 17 liegen die IC<sub>50</sub>-Werte von 19 in etwa zwischen den beiden.

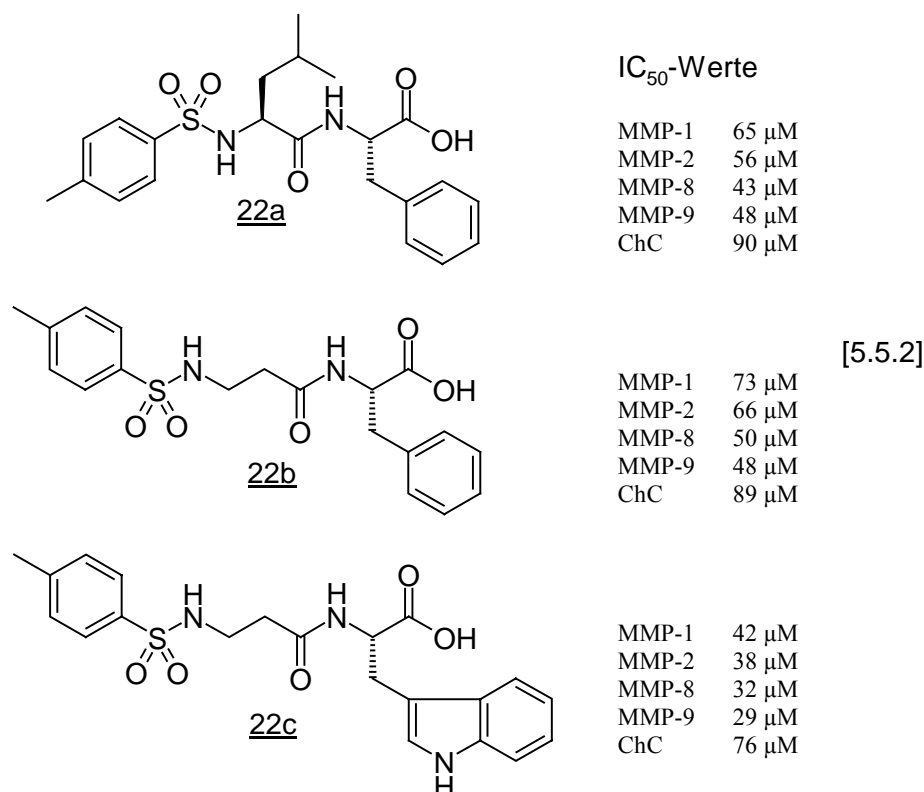
### 5.5. Synthese von Sulfonamid-Derivaten (N-Tosyldipeptiden)

Da die Sulfonamidgruppe in der Literatur als Zink- bindende Gruppe beschrieben ist, stellte ich auch eine Reihe von N-Tosyldipeptiden vom Typ 22 [5.5.1.] her. Dazu wurde die jeweilige Aminosäurekomponente (L-Leucin, β-Alanin) in Aceton mit Tosylchlorid umgesetzt und die sich ergebende N-Tosylaminosäure 20 als gemischtes Anhydrid mit Chlorameisensäureisobutylester mit der zweiten Aminosäurekomponente als Methylester zum Dipeptidester 21 gekuppelt. Die anschließende Verseifung des Methylesters mit Lithiumhydroxid ergab die freie Carbonsäure 22.



a) Chlorameisensäureisobutylester, N-Methylmorpholin, DMF,  $-15^{\circ}\text{C}$  5 min., dann über Nacht RT, b) LiOH, THF, über Nacht

Auf diese Weise wurden die folgenden N-Tosyldipeptide 22a-c hergestellt und deren  $\text{IC}_{50}$ -Werte an den genannten MMP's gemessen [5.5.2.]:



Sie lassen keine überraschenden Resultate erkennen und entsprechen denen von 6e. Beim Vergleich von 22b mit 22c, führte der Austausch von Phenylalanin gegen Tryptophan zu einer

etwas verbesserten Hemmwirkung, dennoch liegen die  $IC_{50}$ -Werte beider Verbindungen im gleichen, mikromolaren Bereich.

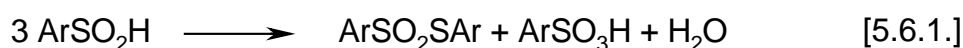
Gegenüber Thermolysin wurde keine hemmende Wirkung festgestellt.

### 5.6. Synthese von Arensulfinsäureamid-Derivaten (N-Arensulfinyldipeptide)

Neben der Sulfonsäureamidgruppe bot sich auch die Sulfinsäureamidfunktion als mögliche Zink-bindende Gruppe an. Daher versuchte ich, Arensulfinsäuren mit einem Dipeptidgerüst zu verknüpfen. In der Literatur ist diese den Sulfonamiden strukturanaloge funktionelle Gruppe bisher anscheinend nicht näher auf ihre Eigenschaften an  $Zn^{2+}$ -abhängigen Enzymen untersucht worden. Ein möglicher Grund könnte die geringe Stabilität der Sulfinamide sein. Ihre Stabilität nimmt in der Reihe Alkan- zu Arensulfinamiden erheblich zu.

Sie lassen sich durch eine Vielzahl von Methoden gut herstellen<sup>63</sup> (z.B. durch Aminolyse von Sulfinsäurechloriden, Umsetzung von N-Sulfinylaminen mit Grignard- Verbindungen oder durch Umamidierung von Sulfinsäure-phthalimiden). Zur Knüpfung der S-N-Bindung wählte ich die Darstellung aus Sulfinsäuren mit Aminen in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als Kondensationsmittel in 1,4- Dioxan<sup>64,65</sup>.

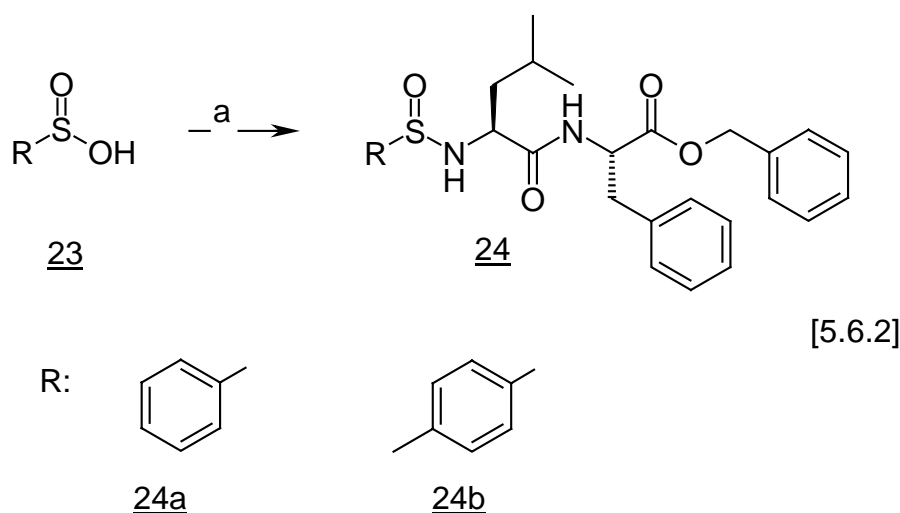
Ausgehend von den käuflichen Natriumsalzen aromatischer Sulfinsäuren wurden zunächst die freien Säuren durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure aus wässriger Lösung der Natriumsalze ausgefällt und unter milden Bedingungen getrocknet, da auch aromatische Sulfinsäuren dazu neigen, mehr oder weniger schnell zu Thiosulfonaten und Sulfonsäuren [5.6.1.] zu disproportionieren<sup>66</sup>.



Da Substituenten mit einem +I-Effekt in para-Stellung des aromatischen Ringes die Disproportionierung verzögern, während solche mit einem –I-Effekt diese beschleunigen<sup>66</sup>, wählte ich neben Benzol- auch p-Toluolsulfinsäure als geeignete Edukte. Außerdem war es sehr wichtig, darauf zu achten, dass die hergestellten Säuren möglichst schnell weiter umgesetzt wurden.

Zur weiteren Überführung in die Sulfinsäureamide 24 setzte ich als Aminokomponente das Trifluoressigsäuresalz von L-Leu-L-Phe-OBz ein. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der

Aminokomponente in Dioxan verwendete ich THF als Lösungsmittel. Die Sulfinssäure 23 wurde zusammen mit dem Amin in trockenem THF gelöst, zu dieser Lösung unter Eiskühlung DCC in THF innerhalb einer Stunde zugetropft und der Reaktionsansatz 12h gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert, das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt und der Rückstand mit Essigsäureethylester versetzt, um noch vorhandenen Dicyclohexylharnstoff auszufällen. Nach Filtration wurde das Filtrat eingengt und säulenchromatographisch gereinigt. Die Ausbeuten an den gewünschten Dipeptiden 24a bzw. 24b lagen bei 40%.

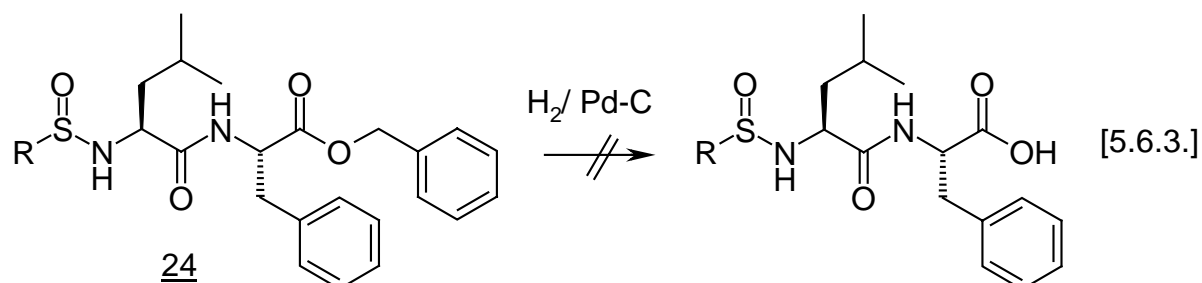


a) Tfa x H-Leu-Phe-OBz, DCC, THF, 1h 0°C dann 12 h RT

Im IR-Spektrum zeigen die Verbindungen die Banden der S=O- Streckschwingung bei 1037 und 1013  $\text{cm}^{-1}$  <sup>67</sup>. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 24b erscheinen die Signale der Wasserstoffe in ortho- Stellung zum Schwefel als Dublett bei 7.76 – 7.74 ppm. Die anderen Protonensignale des Arylsulfinylrestes fallen mit denen der Phenylreste des Phenylalanins und des Benzylesters zusammen. Der Methylgruppe des Arylsulfinylrestes von 24b entspricht ein Singulett bei 2.40 ppm. Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum erscheint das Signal der Methylgruppe bei 21.6 ppm, die Signale des 4-Methylphenylsulfinylrestes treten bei 143.9 ppm auf für das direkt an die Sulfinylgruppe gebundene Kohlenstoffatom und bei 127.3, 129.8 und 141.9 ppm für die Kohlenstoffatome in ortho-, meta- und para- Stellung.

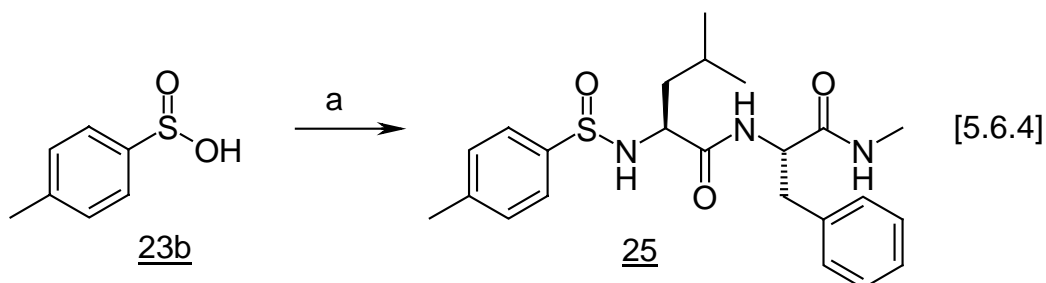
Obwohl der Schwefel in den hergestellten Sulfinamid-Dipeptiden chiral ist, finden sich weder im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum, noch im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum Hinweise auf Diastereomeren-Bildung in Form von doppelten Signalen.

Der Versuch die Benzylester von 24a und 24b hydrogenolytisch zu spalten, führte nicht zur gewünschten freien Carbonsäure, sondern zur Zersetzung.



Aus der Literatur über peptidische Metalloproteaseinhibitoren ist bekannt, dass am C-terminalen Ende die freie Carbonsäuregruppe auch durch eine N-Methylamidgruppierung vertreten werden kann<sup>42</sup>.

Daher kuppelte ich die p-Toluolsulfinsäure 23b mit der Aminokomponente in Form ihres N-Methylamids (H-Leu-Phe-NMe) ebenfalls zum Dipeptid 25 [5.6.4].



a) H-Leu-Phe-NMe, DCC, Dioxan, 1h bei 0°C dann über Nacht RT

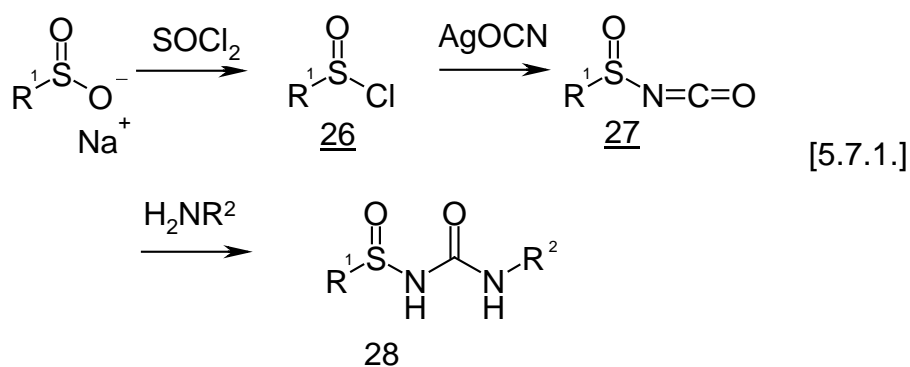
Für 25 treten die Banden für die S=O-Streckschwingung der Sulfinamidgruppierung bei 1093 und 1074  $\text{cm}^{-1}$  auf. Die Signale für den 4-Methylarylsulfonylrest im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum und im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum entsprechen denen für 24b genannten.

Im Test zeigten jedoch weder die Sulfonyldipeptidbenzylester 24a und 24b noch das N-Methylamid 25 gegenüber Thermolysin oder den Matrixmetalloproteasen eine hemmende Wirkung. Offenbar kann die Sulfinamid-Funktion in der Zink-bindenden Enzymtasche die Sulfonamid- bzw. Hydroxamsäuregruppierung nicht vertreten. Eine mögliche Ursache könnte die geringere NH-Acidität der Sulfinamidfunktion sein (die abgeschätzten  $\text{pK}_\text{S}$ -Werte liegen bei 18 – 21)<sup>63</sup>.

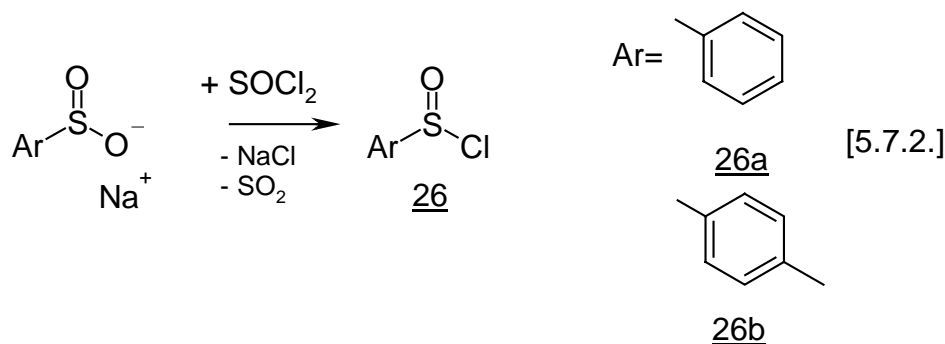
### 5.7. Synthese von Arensulfinylharnstoffdipeptiden

Als weitere potentielle Zink- bindende Gruppe wurde die Sulfinylharnstoffgruppe erachtet, da die NH-Acidität zwischen Sulfinyl- und Carbonylfunktion erheblich gesteigert ist und sie möglicherweise über den Carbonylsauerstoff der Harnstoffgruppe als zweizähliger Ligand agieren kann.

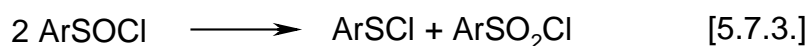
Die Synthese von Arylsulfinylharnstoffen kann, ausgehend von den Natriumsalzen der Sulfinsäuren, durchgeführt werden [5.7.1.]. Die Umsetzung mit Thionylchlorid führt dabei zunächst zu Sulfinsäurechloriden 26. Aus deren Reaktion mit Silbercyanat resultieren die Sulfinylisocyanate 27, die mit primären Aminokomponenten die Sulfinylharnstoffe vom Typ 28 ergeben.



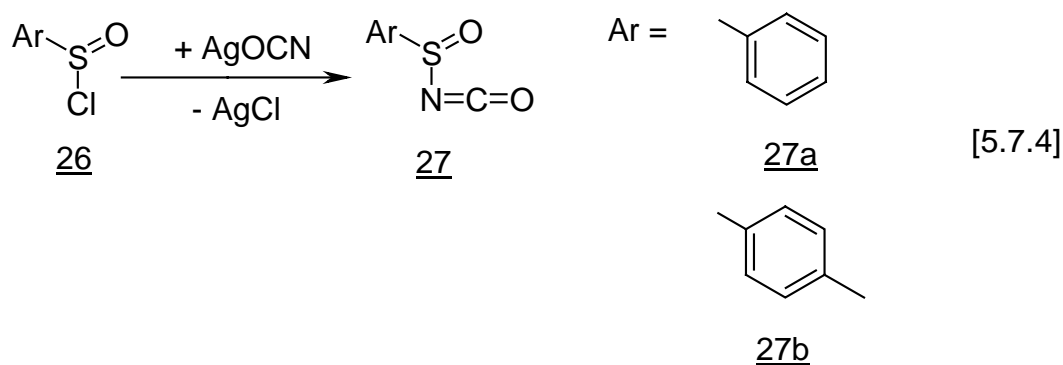
Als Sulfinsäure-Edukte wählte ich wiederum käufliche Arensulfinatate [5.7.2.]. Daraus lassen sich Sulfinsäurechloride 26 in guter Ausbeute durch Einwirkung von überschüssigem Thionylchlorid erhalten<sup>68</sup>.



Da sich aromatische Sulfinylchloride bei dem Versuch, sie zu destillieren, teilweise explosionsartig zu Sulfensäurechloriden und Sulfonsäurechloriden zersetzen können <sup>69</sup> [5.7.3.], wurde auf eine Reinigung verzichtet, zumal sie sich für weitere Umsetzungen als rein genug erwiesen.

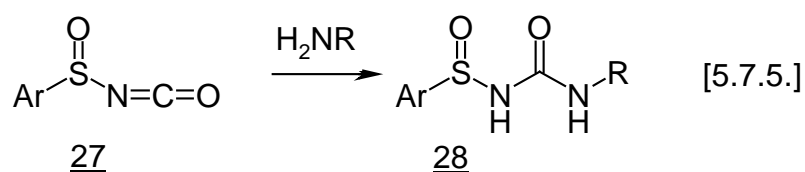


Die weitere Umsetzung der so erhaltenen Sulfinylchloride 26 zu Sulfinylisocyanaten 27 erfolgte nach einer Vorschrift von Jähnchen und Westphal [5.7.4.], welche die Darstellung von Toluolsulfinylisocyanat durch Zutropfen von Toluolsulfinylchlorid zu einer Suspension von Silbercyanat in trockenem Ether beschreibt <sup>70</sup>.

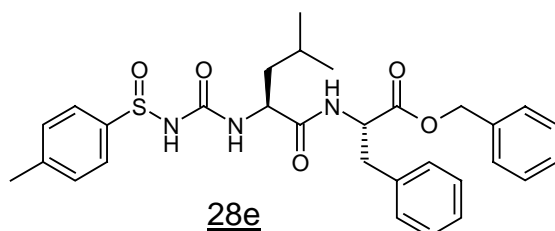
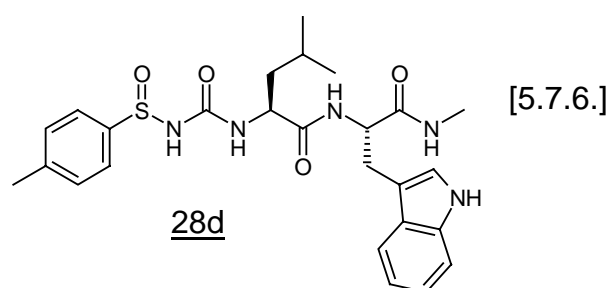
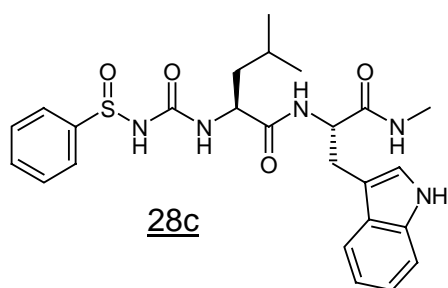
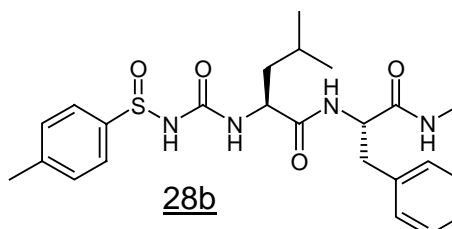
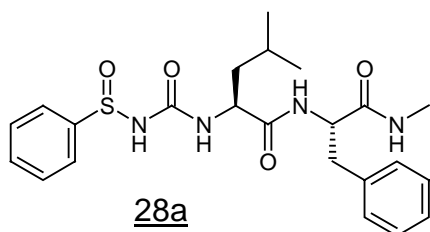


Die Suspension wurde vom ausgefallenen Silberchlorid abfiltriert. Da die entstandenen Sulfinylisocyanate sehr hydrolyseempfindlich sind, wurde auf eine Isolierung verzichtet und gleich weiter mit Dipeptidbausteinen als Aminokomponenten umgesetzt [5.7.5.].

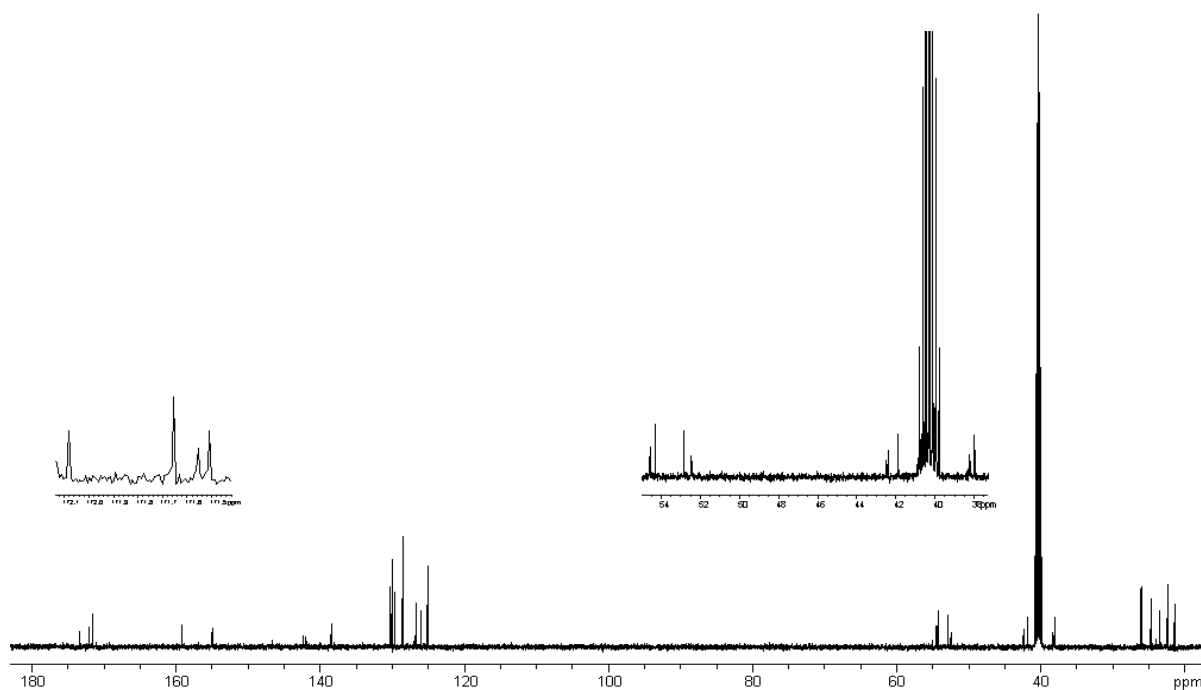
Hierzu wurden die in Ether gelösten Sulfinylisocyanate zu einer Lösung der Aminokomponente in THF getropft. Die Arylsulfinylharnstoffe fielen als unlösliche Addukte aus und wurden durch Umkristallisation aus einem geeigneten Lösungsmittel oder säulenchromatographisch gereinigt.



Auf diese Weise wurden die folgenden Arensulfinylharnstoffe 28a-e hergestellt. Die Gesamtausbeuten lagen zwischen 30 und 50%.

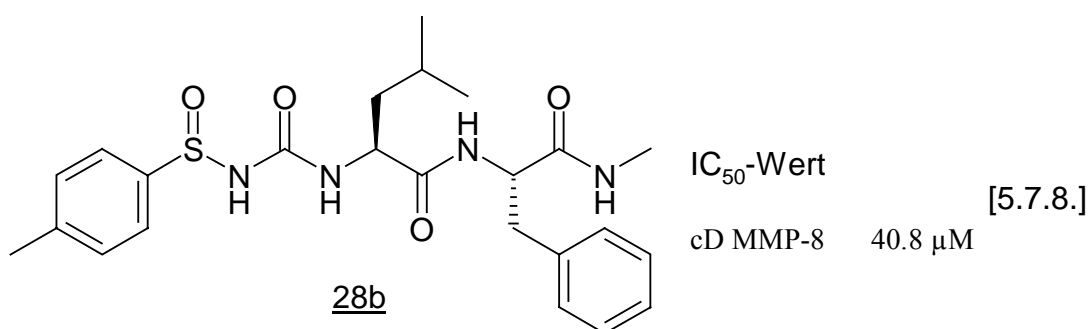


Ihre analytische Charakterisierung ist besonders gut im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum an dem Signal bei ca. 154 ppm für den Carbonyl- Kohlenstoff der Harnstoffgruppierung erkennbar [5.7.7.]. Die vier Signale des Phenylsulfinylrestes erscheinen bei 144.5 ppm für das direkt an die Sulfinylgruppe gebundene Kohlenstoffatom, sowie bei 124.4, ~129.0 und 131.1 ppm für die Kohlenstoffatome in ortho-, meta- und para- Stellung. Für den 4-Methylsulfinylrest liegt das Signal für das direkt an den Schwefel gebundene Kohlenstoffatom zwischen 141 bis 146 ppm, die Kohlenstoffatome in ortho-, meta- und para- Stellung erscheinen bei ~ 124.5, 128.8 und 141.4 ppm. Bei 28b und 28c liegen die Signale verdoppelt vor, was auf die Bildung von Diastereomeren hinweist, die in Folge des chiralen Schwefels auftreten.



[5.7.7.]  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von 28b in  $\text{DMSO-d}_6$  mit verdoppelten Signalen (die Signale für die Carbonylkohlenstoffe und die Methinkohlenstoffe der Aminosäurereste sind gedehnt)

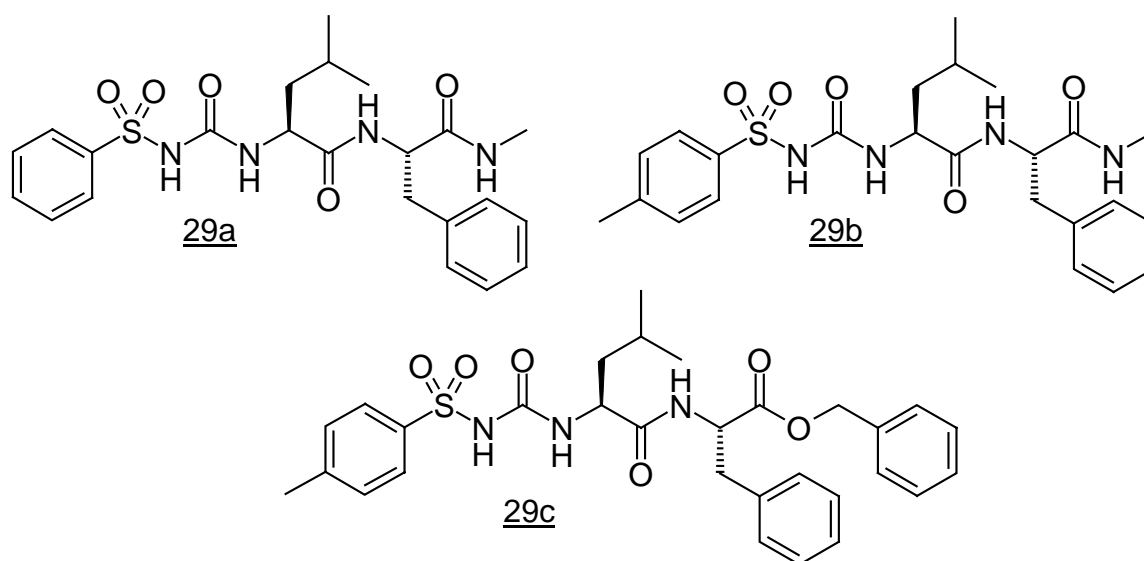
Im pharmakologischen Test (vgl. Kap. 6) wies 28b eine Hemmwirkung gegenüber der katalytischen Domäne von MMP-8 (cD MMP-8) auf [5.7.8.].



Aktivitätsmessungen an MMP-1, -2, -8 und -9 in einer anderen Arbeitsgruppe (vgl. Kap. 6) verliefen sowohl für 28b als auch die analogen Dipeptide 28a-e nicht erfolgreich. Eine endgültige Abklärung steht noch aus.

Ausgehend von der Sulfinylharnstoffgruppierung als möglicher Zink- bindender Gruppe, kamen weitere Variationen am Schwefel in Betracht, wie zum einen die durch Oxidation am





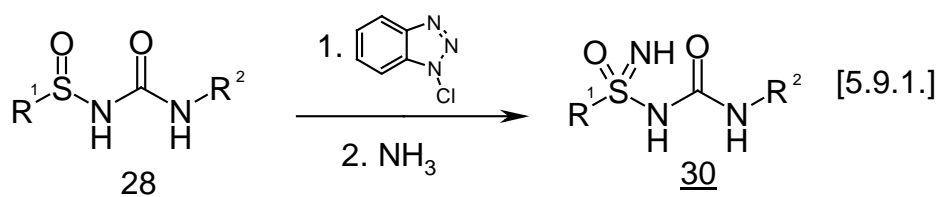
Im IR-Spektrum erscheinen die Banden für die symmetrische und asymmetrische  $\text{SO}_2$ -Streckschwingung bei ca.  $1340$  und  $1160\text{ cm}^{-1}$ . Das Signal für den Carbonyl-Kohlenstoff der Harnstoffgruppe tritt im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum bei ca.  $151\text{ ppm}$  auf.

Leider zeigten die hergestellten Substanzen weder eine Wirkung gegenüber Thermolysin noch gegenüber den Matrixmetalloproteasen.

Da laut Thoth<sup>73</sup> die Sulfonylharnstoff-Gruppierung aufgrund ihrer aciden Eigenschaften ( $\text{pK}_\text{S} \sim 5\text{-}7$ ) im physiologischen pH-Bereich schon weitgehend ionisiert vorliegt, sollte sich die Ionisation nach formalem Austausch von Sauerstoff am Schwefel gegen eine NH-Funktion im Sinne der Sulfonimidharnstoffstrukturen 30 ( $\text{pK}_\text{S} \sim 9\text{-}11$ ) zurückdrängen lassen.

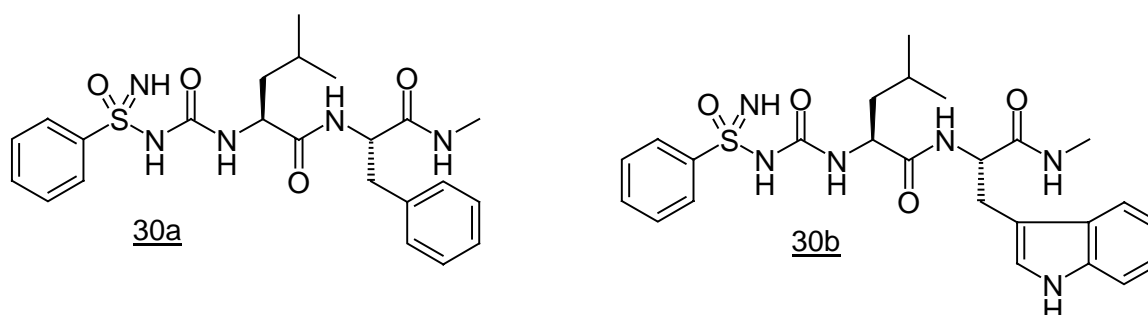
### 5.9. Synthese von Arensulfonimidharnstoffdipeptiden

Die Darstellung von Sulfonimid-Analogen von Sulfonylharnstoffen vom Typ 30 wird bei Toth et al.<sup>73</sup> beschrieben. Stoffe dieses Typs ( $\text{R}^1, \text{R}^2 = \text{Aryl}$ ) zeigten, ähnlich wie die entsprechenden Sulfonylharnstoffe, zytotoxische Eigenschaften, welche sie als potentielle Cytostatika bei Krebserkrankungen interessant erscheinen lassen<sup>73</sup>. Diese lassen sich aus den entsprechenden Sulfonylharnstoffen durch oxidative Aminierung mit N-Chlorbenzotriazol oder t.-Butylhypochlorit<sup>74</sup> und Ammoniak herstellen [5.9.1.].



In meinem Falle überführte ich auf diesem Wege in Kap. 5.7. beschriebene N-Sulfonyldipeptide vom Typ 28 in die entsprechenden Sulfonimide 30a und 30b in der Erwartung, dass die neue S/N-funktionelle Gruppe über gute Zink-bindende Eigenschaften verfügt [5.9.2.].

Dazu wurde der entsprechende Arensulfonylharnstoff 28 in trockenem THF suspendiert, mit N-Chlorbenzotriazol versetzt und 30 Minuten gerührt. Der Ansatz wurde anschließend zu einer Lösung von Ammoniak in trockenem THF getropft und über Nacht gerührt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch, die Ausbeuten lagen bei 40%.



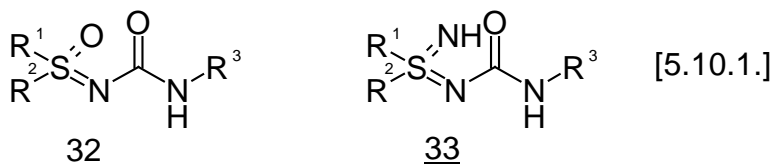
Aufgrund des chiralen Schwefels liegen die Signale im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum und im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum verdoppelt vor. Für 30a erscheint das Signal für den Carbonylkohlenstoff der Harnstoffgruppe bei 159.4/158.6 ppm. Das Signal für den direkt mit der Sulfonimidgruppe verknüpften Kohlenstoff des Phenylrings tritt bei 143.8/ 140.8 ppm auf, die Signale für die Kohlenstoffe in ortho-, meta- und para-Stellung erscheinen bei 126.2/ 126.1 ppm, 128.6 ppm und 132.1/ 131.7 ppm. Im Vergleich zum Edukt 28a tritt also durch die oxidative Aminierung am Schwefel keine gravierende Tieffeld-Verschiebung auf.

Im IR-Spektrum zeigen sich neben der breiten Bande für die S=NH- Schwingung bei 3329  $\text{cm}^{-1}$ , die Banden für die symmetrische und die asymmetrische Streckerschwingung der O=S=N-Gruppe bei 1140 und 1091  $\text{cm}^{-1}$ .

Im pharmakologischen Test zeigte nur 30a gegenüber Thermolysin eine schwache Hemmwirkung von 800  $\mu\text{M}$ . Weitergehende Tests an MMP's stehen noch aus.

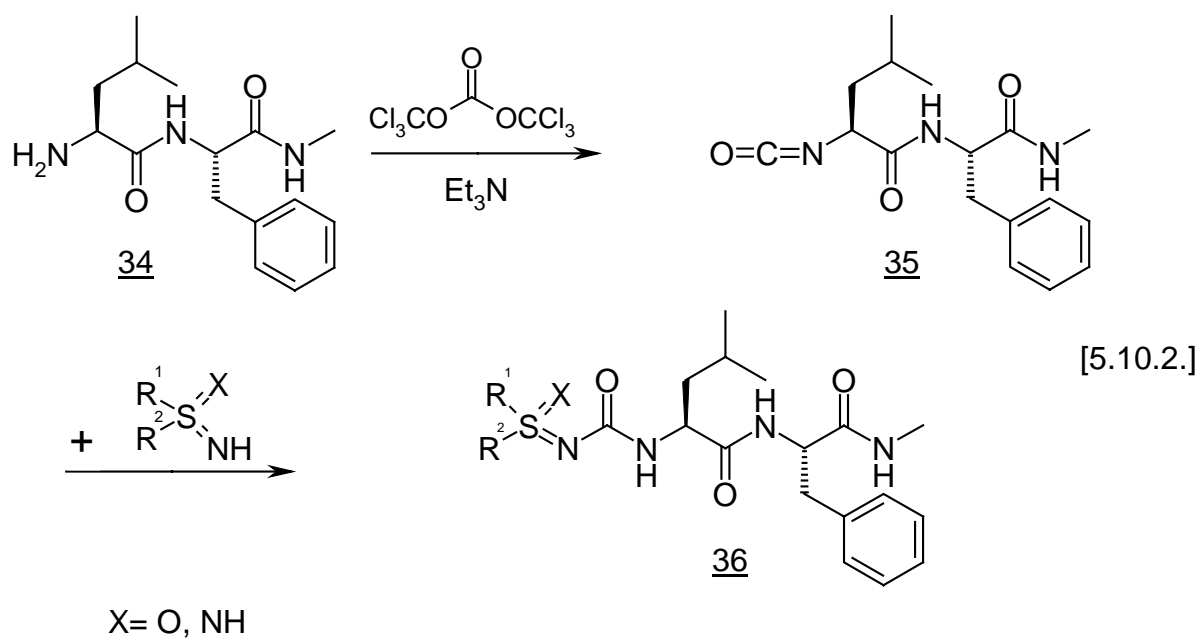
### 5.10. Synthese von Sulfoximin- und Sulfodiiminharstoffdipeptiden

Als weitere mögliche Zink- bindende Gruppen kamen in Analogie zu den vorstehend genannten Schwefel-Stickstoff-Funktionen auch solche in Betracht, bei denen der azaloge Sulfonstickstoff in die Harnstoffstruktur im Sinne der Formel 32 bzw. 33 einbezogen ist [5.10.1].

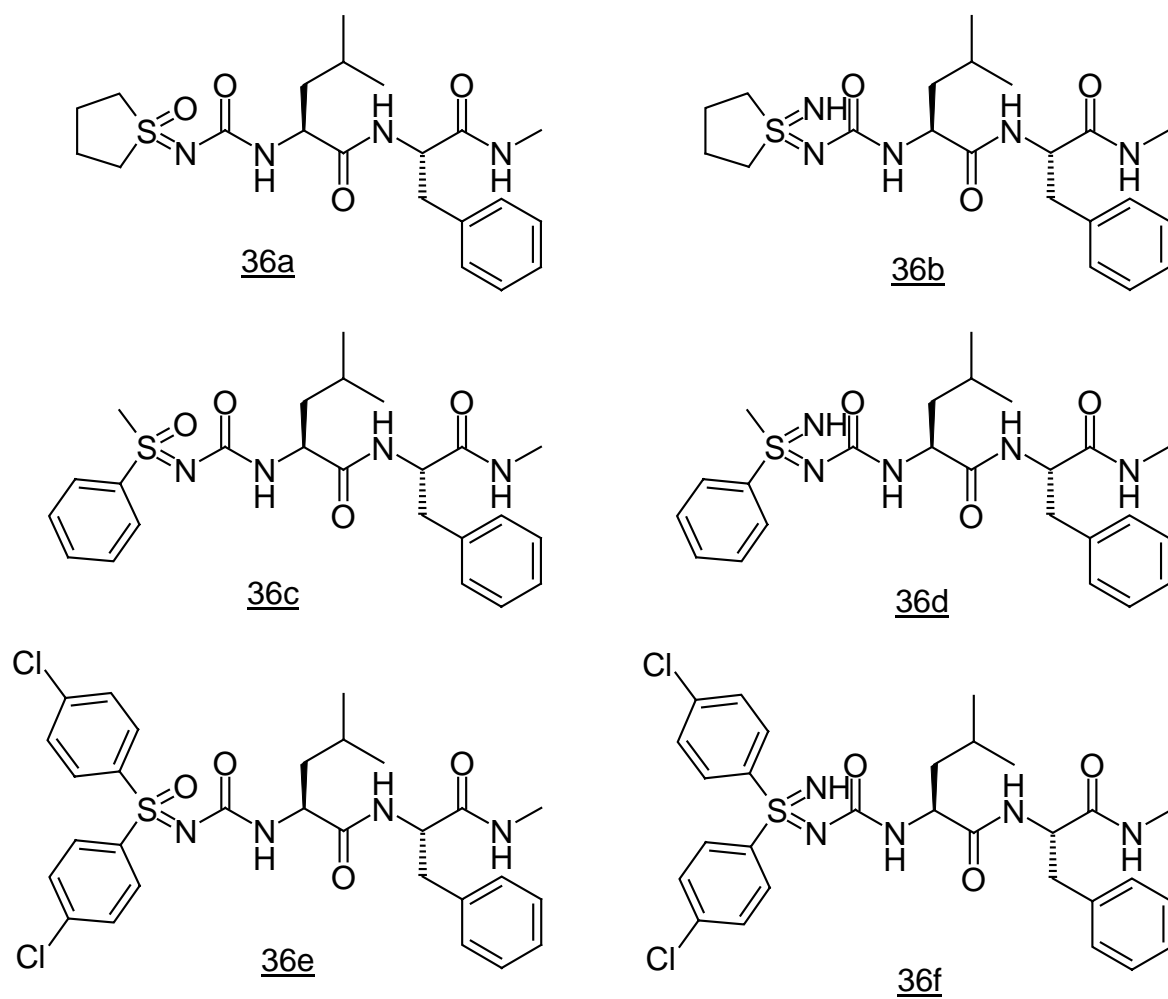


Derartige Strukturen lassen sich durch Addition von Sulfoximiden bzw. Sulfodiimiden an Isocyanate darstellen<sup>75</sup>. Die Isocyanate selbst können über Durchleiten von Phosgen durch eine Lösung der Aminokomponente bei erhöhten Temperaturen erhalten werden. Um das gefährliche und schwer zu handhabende Phosgen zu umgehen, wählte ich stattdessen Bis-(trichlormethyl)-carbonat (Triphosgen), einen käuflichen Feststoff. Aus einem Molekül Triphosgen entstehen in der Reaktion drei Moleküle Phosgen. Der dabei gebildete Chlorwasserstoff wird mit Triethylamin abgefangen.

H<sub>2</sub>N-Leu-Phe-NMe als Aminokomponente 34 wurde daher mit Triethylamin in trockenem THF gelöst und zu einer Lösung von Triphosgen in trockenem THF getropft [5.10.2.]. Der Ansatz wurde zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt, vom Triethylaminhydrochlorid abfiltriert und das gebildete Isocyanat 35 direkt zu einer Lösung des Sulfoximids bzw. Sulfodiimids in trockenem THF getropft. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und säulenchromatographischer Reinigung lagen die Ausbeuten der Dipeptide 36 bei ~10%.



Es wurden die folgenden Strukturen 36a-f hergestellt:

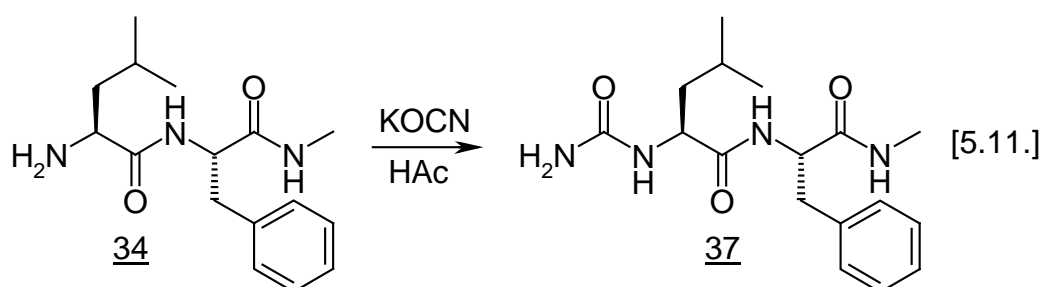


Der Erfolg der Umsetzung am Beispiel von 36a ist im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum an dem Signal für den Carbonylkohlenstoff der Harnstoffgruppe bei 157.3 ppm erkennbar. Neben den Signalen für die Kohlenstoffe des Dipeptids sind weiterhin die Signale der azalogen Sulfonstruktur bei 55.5/55.2 ppm für die zum Schwefel  $\alpha$ -ständigen Kohlenstoffe und bei 24.9/24.7 ppm für die zum Schwefel  $\beta$ -ständigen Kohlenstoffe vorhanden.

Leider zeigten die dargestellten Substanzen weder eine Hemmwirkung gegenüber Thermolysin noch gegenüber den Matrixmetalloproteasen.

### 5.11. Synthese eines Dipeptidharnstoffs

Um festzustellen, ob 28b auch ohne den 4-Methylarylsulfinylrest hemmend auf die Matrixmetalloproteasen wirkt, stellte ich den Dipeptidharnstoff 37 dar. Dazu wurde L-Leu-L-Phe-NMe 34 in Eisessig gelöst, Kaliumcyanat, in Wasser gelöst, hinzuge tropft und der Ansatz 2 Stunden auf  $60^\circ\text{C}$  erhitzt, wobei ein weißer Niederschlag ausfiel [5.11]. Dieser wurde nach Verdünnen mit Wasser filtriert und aus Ethanol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 30%.

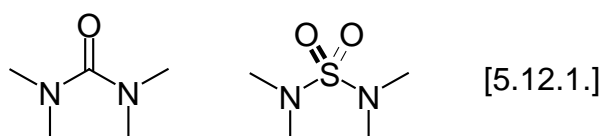


Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum erscheint neben den Signalen für das Dipeptidgerüst das Signal für den Carbonyl-Kohlenstoff der Harnstoffgruppe bei 158.4 ppm. Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum tritt zusätzlich zu den Signalen des Gerüsts ein Singulett bei 5.64 ppm auf, das den Protonen der  $\text{CONH}_2$ -Gruppe zuzuordnen ist.

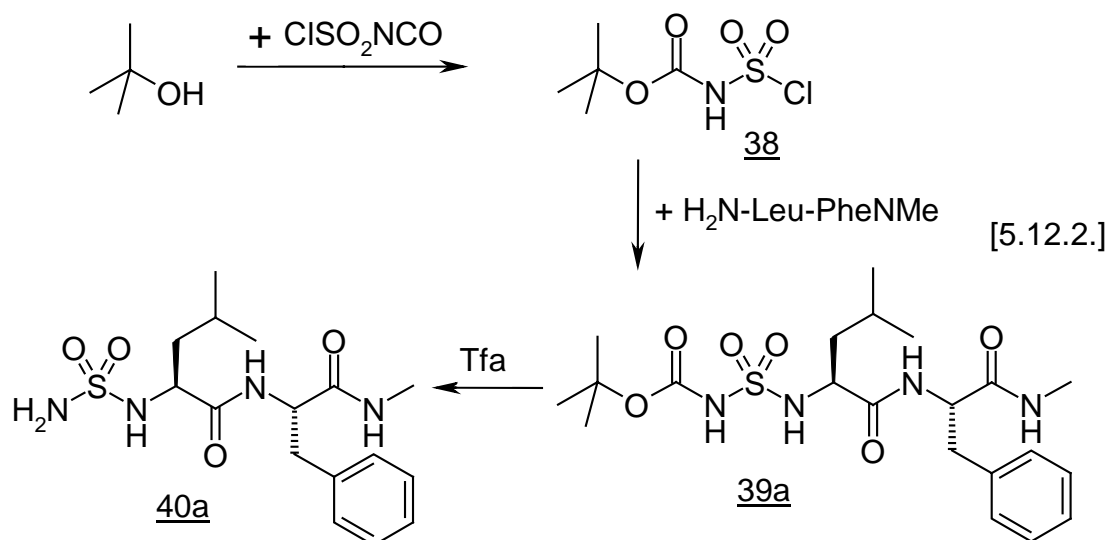
37 zeigte keine Wirkung gegenüber Thermolysin und den Matrixmetalloproteasen. Somit ist für die bindenden Eigenschaften im aktiven Zentrum der MMP's offensichtlich nur der Arylsulfinylrest in Verbindung mit der Harnstoffstruktur (wie im Fall von 28b) geeignet.

## 5.12. Synthese von N-Sulfamoyldipeptiden

Ein weiteres Ziel war es, die Harnstoffgruppe durch die Sulfamidgruppe zu ersetzen. In diesem Strukturelement ist der Carbonylkohlenstoff formal durch den Sulfonylrest ersetzt mit dem Unterschied, dass am Schwefel statt einer planaren eine tetraedrische Anordnung der Substituenten vorliegt [5.12.1.].



Um die Sulfamidgruppe in das Dipeptidgerüst einzuführen, wählte ich den Syntheseweg über t.-Butylchlorsulfonylcarbamat 38 [5.12.2.]<sup>76</sup>. Dieses wurde aus Chlorsulfonylisocyanat und t.-Butanol hergestellt und sofort weiter unter Basenzugabe mit H<sub>2</sub>N-Leu-Phe-NMe 34 kondensiert. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch, die Ausbeute an 39a lag bei 30%.



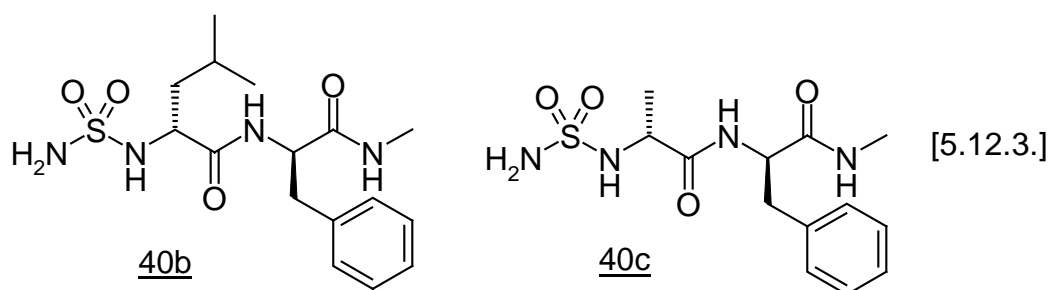
Anschließend wurde die Boc- Schutzgruppe von 39a mit Trifluoressigsäure abgespalten zum gewünschten N-Sulfamoyldipeptid 40a (Ausbeute 90%).

Im <sup>13</sup>C-NMR unterscheidet sich 40a in den Signalen nicht vom Dipeptidmethylamid-Edukt.

Im <sup>1</sup>H-NMR erscheint zusätzlich das Signal für die SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>-Gruppe bei 8.30 ppm.

Im pharmakologischen Test zeigte 40a zwar keine Aktivität gegenüber Thermolysin oder den Matrixmetalloproteasen, aufgrund der Sulfamidgruppe wurde es jedoch gegen humane Carboanhydrase (hCA) I und II getestet, wo es eine schwache Hemmwirkung aufwies (vgl. Kap. 7.). Die  $K_I$ -Werte lagen bei 124  $\mu\text{M}$  für hCA I und 75  $\mu\text{M}$  für hCA II.

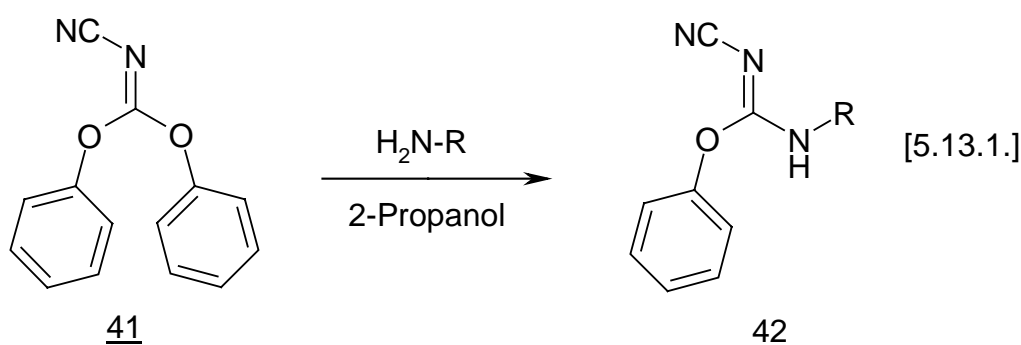
Im Fall von 40a lagen die Aminosäurereste in der L-Konfiguration vor. Da diese unter physiologischen Bedingungen relativ schnell abgespalten werden können, stellte ich die gleiche Verbindung als Enantiomer 40b unter Verwendung der D- Aminosäuren her [5.12.3.]. Ebenso wurde das analoge Dipeptid 40c unter Verwendung von D-Ala-D-Phe-NMe synthetisiert.



Auch hier lagen die  $K_I$ -Werte für hCA I und hCA II nur im mikromolaren Bereich.

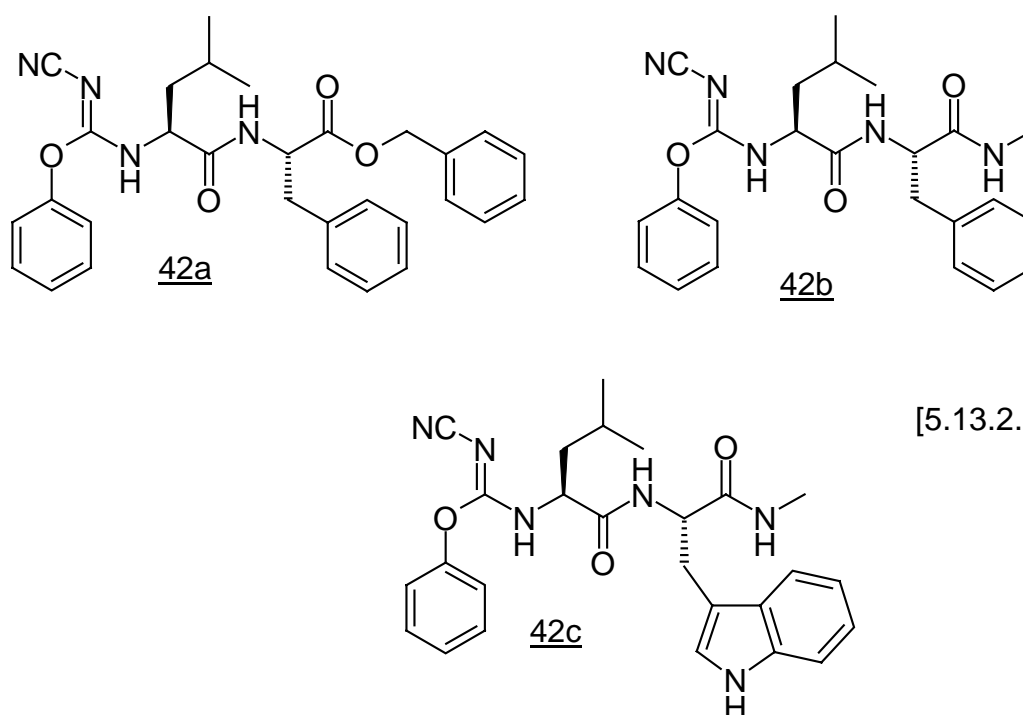
### 5.13. Synthese von N-Cyanisoharnstoff-Dipeptiden

Ein interessanter Baustein zur Synthese stickstoffhaltiger Heterocyclen mit möglichen Zink-komplexierenden Eigenschaften ist der von Webb und Labaw entwickelte und erstmalig beschriebene N-Cyaniminokohlensäurediphenylester 41<sup>77</sup>.



Aus ihm lassen sich über Aminolyse-Reaktion N- Cyanisoharnstoffe vom Typ 42 herstellen [5.13.1.]. Diese können als Zwischenstufen für den Aufbau von Heterocyclen dienen (vgl. Kap. 5.14.).

Als Aminkomponente dienen in meinem Fall wiederum Dipeptidbausteine, deren Kondensation mit 41 wie erwartet zu den Isoharnstoffen 42a-c führte [5.13.2.].

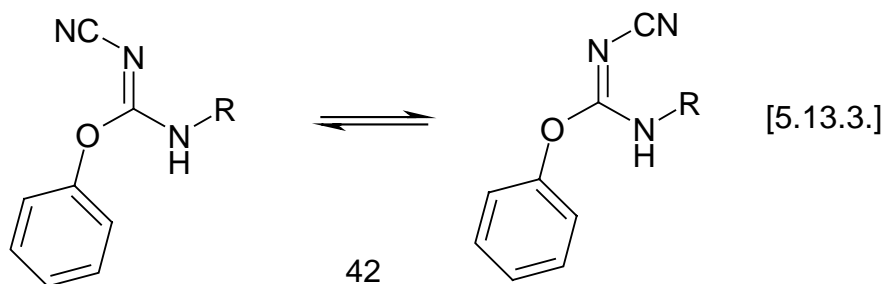


Die Edukte wurden in 2-Propanol umgesetzt, der nach Entfernen des Lösungsmittels ölige Rückstand durch Zugabe von Ether zur Kristallisation gebracht und durch Umkristallisation oder säulenchromatographisch gereinigt (Ausbeuten 70- 90%).

Das IR-Spektrum zeigt eine scharfe Absorptionsbande bei 2192- 2197  $\text{cm}^{-1}$  für die CN-Valenzschwingung der Nitrilgruppe. Ebenso tritt bei 1530- 1560  $\text{cm}^{-1}$  eine mittelstarke Absorptionsbande auf, die der C=N-Doppelbindung zuzuschreiben ist.

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum weist beim Benzylester die erwarteten 24 Signale auf. Bei den Methylamiden liegen die Signale der Kohlenstoffe der Phenoxygruppe, der Cyanimino- sowie der Carbonylfunktion verdoppelt vor. Das gleiche trifft auf den  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kohlenstoff des Leucinrestes zu. Nach Müller <sup>78</sup> entsteht dieses Phänomen durch das Vorhandensein einer gehinderten Dynamik (innerhalb der NMR-Zeitskala), die durch ein E/Z-

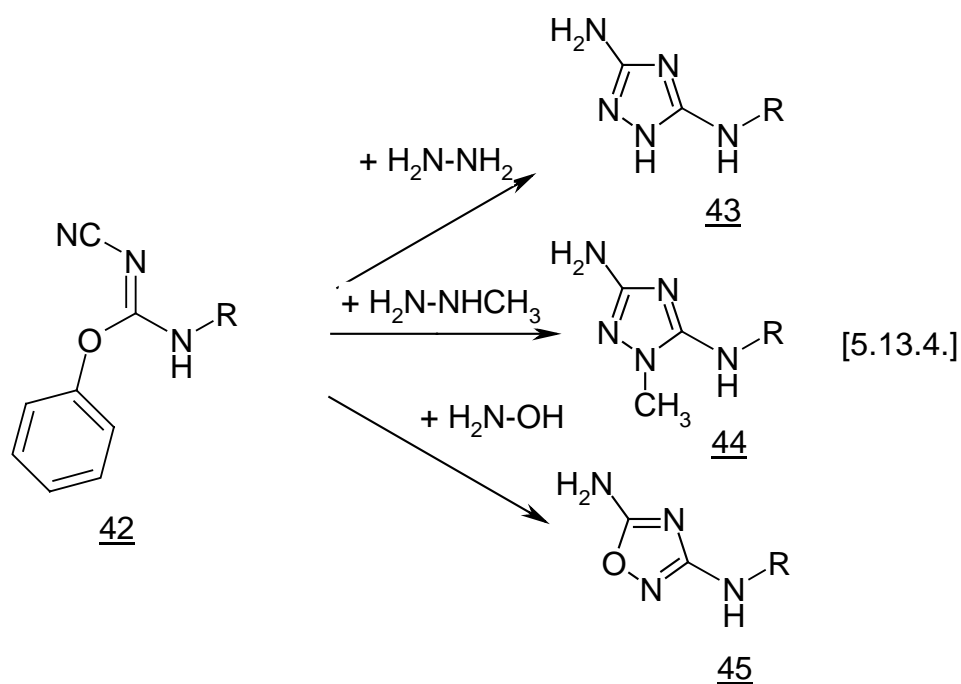
Isomerengleichgewicht hervorgerufen wird [5.13.3.]. Dabei ist die freie Drehbarkeit an der Imidbindung gehindert.



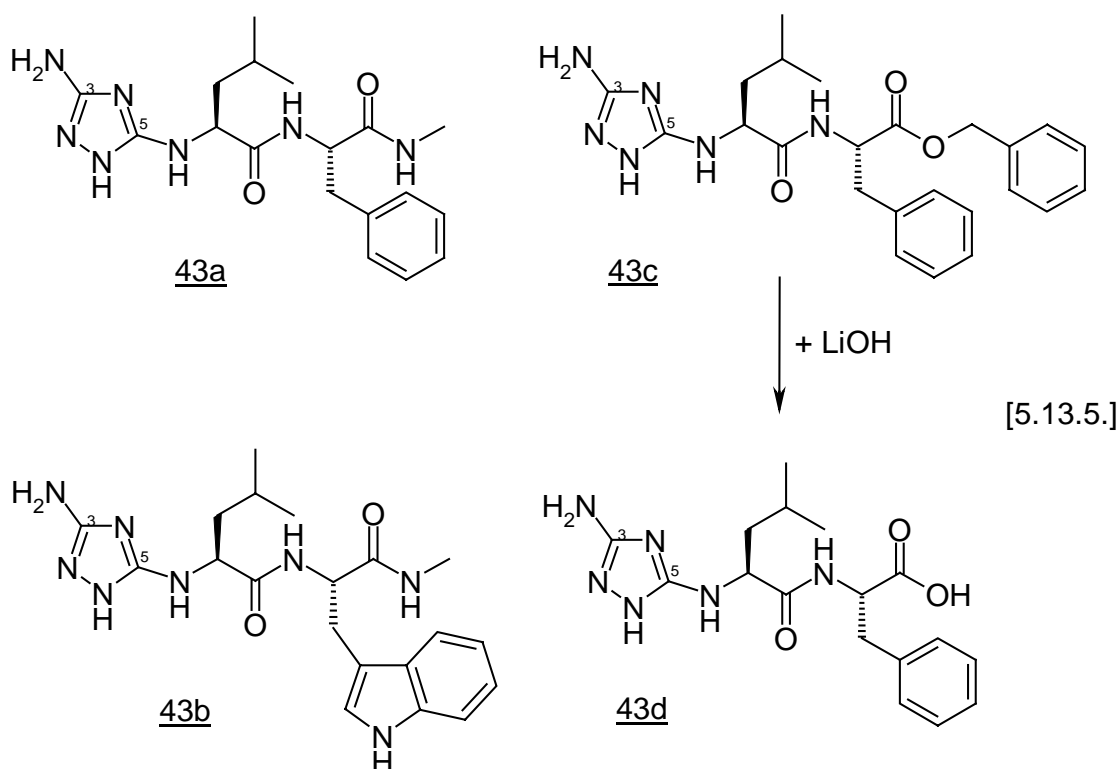
Der C=N-Kohlenstoff kommt zwischen 159- 164 ppm zur Resonanz. Das sp-hybridisierte Kohlenstoffatom der Nitrilfunktion ergibt ein schwaches Signal bei 113- 115 ppm.

#### 5.14. Cyclisierung zu Azol-Dipeptiden

Die N-Cyanisoharnstoff-Dipeptide 42 sollten zum einen selbst auf ihre Hemmwirkung gegenüber Thermolysin und Matrixmetalloproteasen getestet werden, zum anderen wurden sie als Zwischenstufen zum weiteren Aufbau der Heterocyclen 43-45 [5.13.4.] verwendet.



Die Hydrazinolyse von 42 führt zu 3-Amino-1,2,4-triazolen vom Typ 43. Da dieser zweite nucleophile Substitutionsschritt erheblich langsamer verläuft, waren schärfere Reaktionsbedingungen erforderlich. Hierzu wurde der Isoharnstoff 42 in 2-Propanol suspendiert und mit Hydrazinhydrat unter Rückfluß erhitzt. Die Umsetzung wurde durch Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Nach Beenden der Reaktion fiel ein Teil des Produkts aus, der Rest konnte nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotavapor durch Zugabe von Ether zur Kristallisation gebracht werden und wurde durch Umkristallisation gereinigt. Die Ausbeuten der Dipeptid-Derivate 43a-c betragen 40- 90% [5.13.5.].

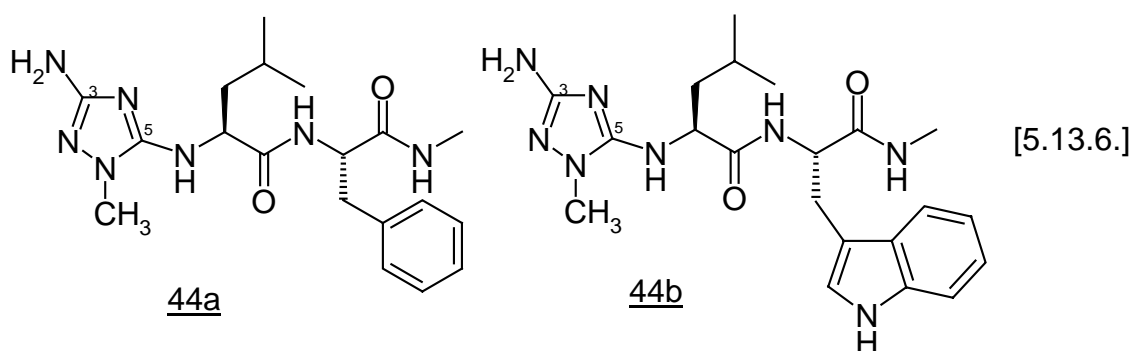


Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt zwischen 5,4- 5,6 ppm ein breites Singulett, dem vom Integral her 2 Protonen zugehörig sind, und das der  $\text{NH}_2$ -Gruppe des Triazols entspricht.

Im  $^{13}\text{C-NMR}$  erscheint das Signal des  $\text{sp}^2$ -Kohlenstoffs in 3-Position des Triazolringes bei 160- 162 ppm, das Signal des Kohlenstoffs in 5-Position bei 154- 158 ppm.

Der Benzylester 43c wurde zusätzlich mit Lithiumhydroxid verseift und in die freie Carbonsäure 43d überführt, um die Löslichkeit in Wasser zu verbessern.

Die Umsetzung mit Methylhydrazin erfolgte analog der mit Hydrazin [5.13.4.]. Hierbei reagieren die Isoharnstoffe 42 im ersten Schritt unter nucleophiler Substitution von Phenol mit dem basischeren N-Methylstickstoff, so dass die anschließende intramolekulare Addition der freien Aminogruppe an die Cyanogruppe zu 3-Amino-1-methyl-1,2,4-triazolen 44 führt. Mit den Isoharnstoff-Dipeptiden 42b bzw. 42c erhielt ich auf diese Weise die beiden Azol-Derivate 44a und 44b [5.13.6.].

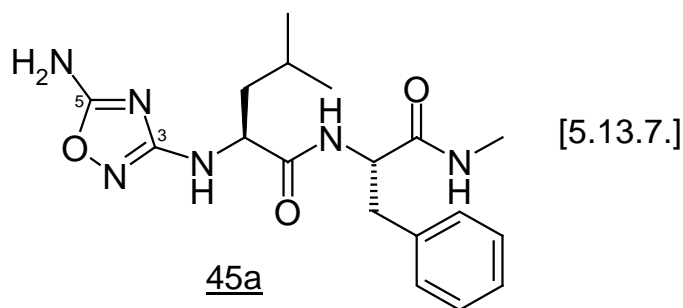


Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt neben dem Signal für die Protonen der  $\text{NH}_2$ -Gruppe am Triazolring bei 4,7- 4,8 ppm noch ein Singulett bei 3,3 ppm mit einem Integral von 3 Protonen, was der N-ständigen Methylgruppe des Triazols entspricht.

Im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum tritt diese Methylgruppe bei 32,5 ppm auf. Das Signal des Kohlenstoffs in 3-Position des Triazolrings erscheint bei 159,7- 159,9 ppm, in 5-Position bei 153,8-154,0 ppm.

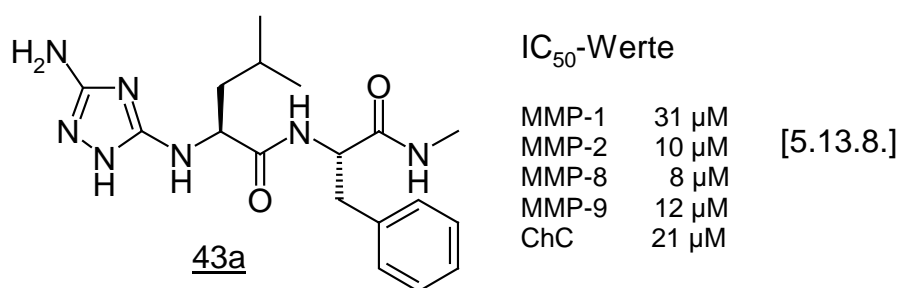
Eine weitere Möglichkeit, N-Cyanisoharnstoffe zu cyclisieren, besteht in der Umsetzung mit Hydroxylamin, wobei sie unter nukleophiler Substitution von Phenol zu 1-Oxa-2,4-diazolen 45 reagieren [5.13.4.].

Dazu wurde der Isoharnstoff 42 nach Siuts <sup>79</sup> in DMF gelöst, Triethylamin zugegeben, mit einem achtfachen Überschuss an Hydroxylaminhydrochlorid versetzt und bei 60°C bis zum Abschluss der Reaktion gerührt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch. Das Dipeptidderivat 45a konnte mit 76% Ausbeute isoliert werden [5.13.7.].



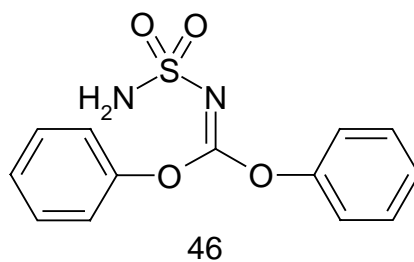
Das Signal der NH<sub>2</sub>-Gruppe des Oxadiazolrings erscheint im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum bei 5,69 ppm. Im <sup>13</sup>C-Spektrum tritt das Signal für den sp<sup>2</sup>-Kohlenstoff in 3-Position des Oxadiazolringes bei 168,2 ppm auf. Das Signal für den Kohlenstoff in 5-Position zeigt sich bei 169,1 ppm.

Die hergestellten N-Azol-Dipeptide 43a-d, 44a-b und 45a wiesen keine Aktivität gegenüber Thermolysin auf. 43a zeigte jedoch eine relativ gute Hemmwirkung gegenüber den Matrixmetalloproteasen, die zu weiteren Untersuchungen Anlass gibt [5.13.8.].



### 5.15. Synthesen mit Diphenyl-N-sulfamoyl-iminocarbonat (DIPHSAIC)

Die erfolgreichen Umsetzungen von Peptidbausteinen mit N-Cyanimidodiphenylcarbonat versuchte ich in analoger Weise auf einen weiteren N-funktionalisierten Iminokohlensäureester zu übertragen. Hierzu bot sich das im Arbeitskreis von Prof. Haake entwickelte Diphenyl-N-sulfamoyl-iminocarbonat 46, kurz DIPHSAIC genannt, an, das zusammen mit Heumann-Pharma GmbH & Co, Nürnberg patentiert worden ist <sup>80</sup>.



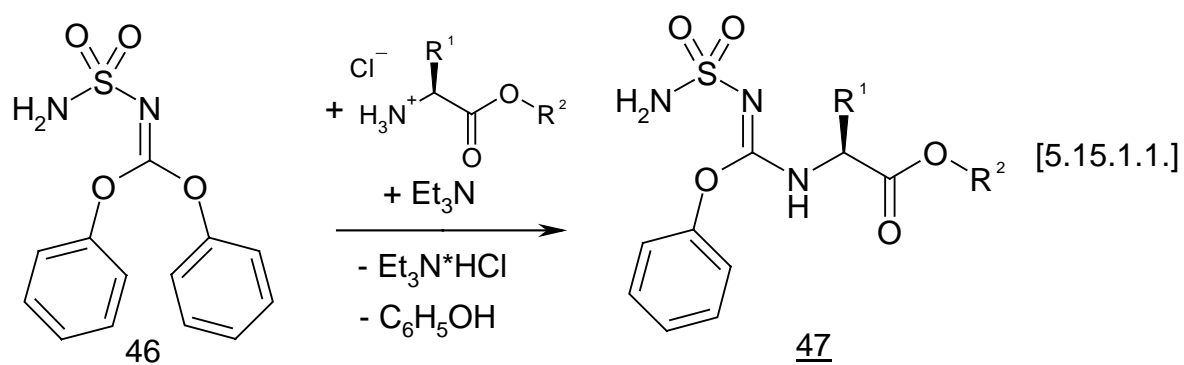
Die Sulfamidstruktur (N-SO<sub>2</sub>-N) lässt sich als bioisosterer Ersatz einer Harnstoffgruppierung auffassen <sup>81</sup>, die im Gegensatz dazu jedoch über Zink- bindende Eigenschaften verfügt <sup>82</sup>. Daher lag es nahe, dieses Strukturelement in der Synthese potentieller Peptidomimetika einzusetzen.

Das Reaktionsverhalten von 46 gegenüber NH<sub>2</sub>-Nucleophilen wurde zunächst an einigen Aminosäuren studiert.

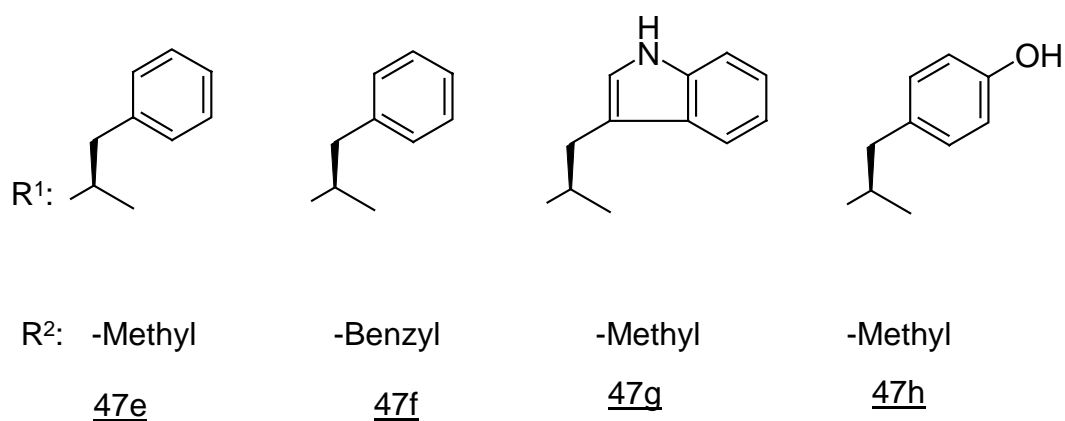
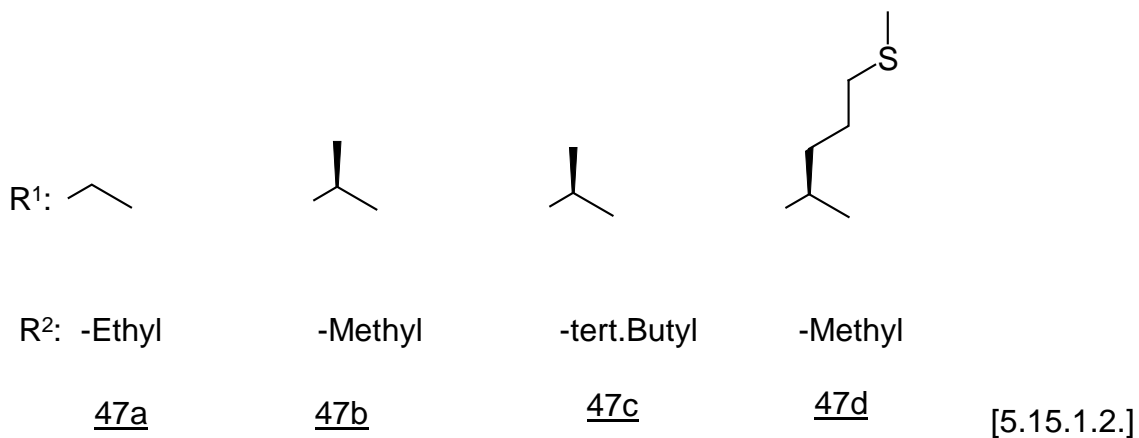
#### 5.15.1. Umsetzungen von DIPHSAIC mit Aminosäureestern

Eine direkte Umsetzung von DIPHSAIC mit freien Aminosäuren ist kaum möglich, da sie sich in unpolaren Lösungsmitteln auf Grund ihres zwitterionischen Charakters nicht lösen. Wasser als Lösungsmittel konnte nicht verwendet werden, da der erste Phenoxyrest des DIPHSAIC relativ rasch hydrolysiert. Daher wählte ich den Umweg über die käuflichen Aminosäureester-hydrochloride. Diese reagierten bei Zusatz von Triethylamin als primäre Amine bereits bei Raumtemperatur mit DIPHSAIC in Chloroform unter nukleophiler Substitution von Phenol zu den N-Sulfamoyliso-harnstoffestern 47 [5.15.1.1.].

Ziel der Synthese war, die gebildeten Isoharnstoffe an der Carboxylfunktion zu entschützen und dann weiter zu kuppeln.



Nach säulenchromatographischer Reinigung betragen die Ausbeuten der kristallinen Isoharnstoffester 47a-h 60- 70 % [5.15.1.2.].

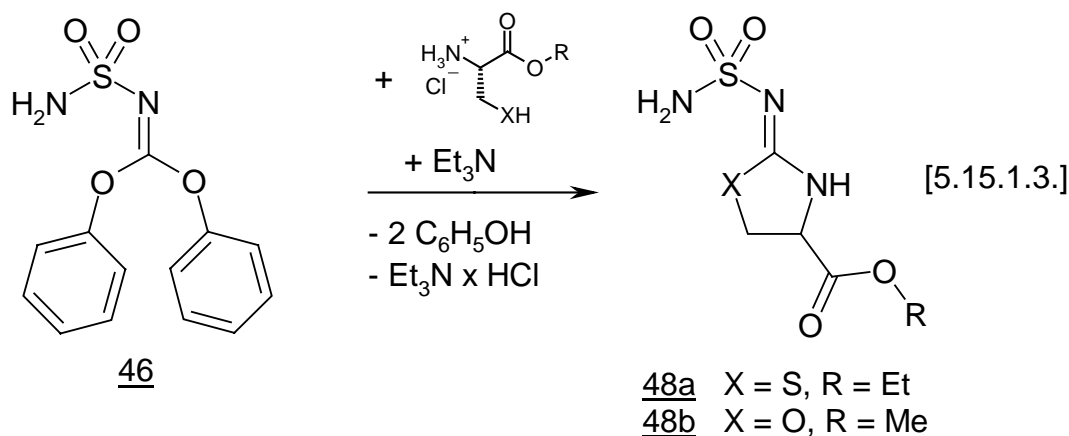


Im IR-Spektrum erscheint die Absorptionsbande für die C=N-Schwingung bei ca. 1600 cm<sup>-1</sup>. Weiterhin fallen die Banden für die symmetrische und asymmetrische Streckschwingung der SO<sub>2</sub>-Gruppe bei ~1300 cm<sup>-1</sup> bzw. ~1150 cm<sup>-1</sup> auf.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum findet sich das Signal für die Aminogruppe der Sulfamidpartialstruktur bei  $\sim 6,7$  ppm für die aromatischen Aminosäureester-Derivate 47e, 47f, 47g und 47h. Für die aliphatischen Aminosäureester-Derivate 47a, 47b, 47c und 47d liegt es bei  $\sim 4,6$  ppm.

Im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum tritt neben den Signalen der eingesetzten Aminosäureester-Bausteine und der Phenoxygruppe das Signal für den Iminokohlenstoff bei 150,7- 150,9 ppm auf.

Bei der Umsetzung von DIPHSAIC 46 mit Serinmethylester und Cysteinethylester als Bis-Nucleophile trat in Chloroform bei Raumtemperatur Cyclisierung unter nucleophiler Substitution beider Phenolreste ein [5.14.2.]. Die Ausbeuten für 48 lagen bei 60 bzw. 80%.



Im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum tritt das Signal für den Iminokohlenstoff im Gegensatz zu den monosubstituierten Verbindungen bei 159,4 ppm für den 48a und bei 168,5 ppm für 48b auf.

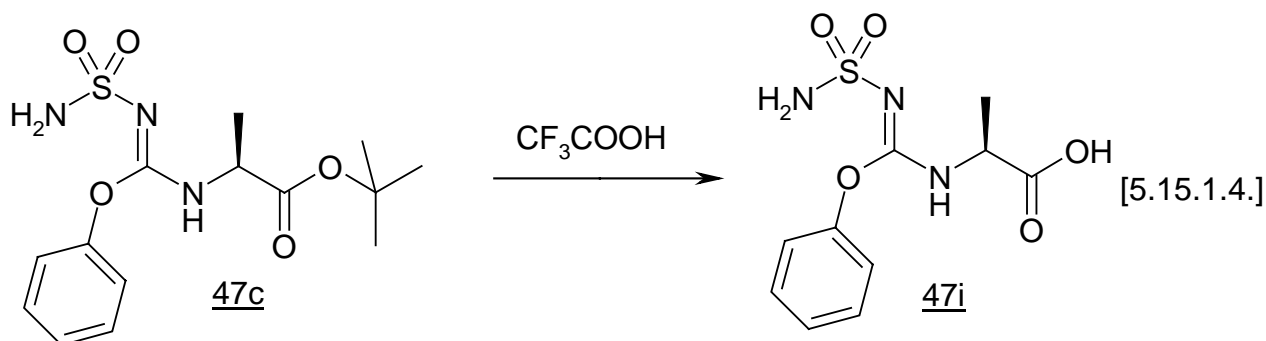
Die Herstellung von 48a gelang auch als Festkörperreaktion in der Kugelmühle. Hierzu vermischt man DIPHSAIC mit Cysteinethylesterhydrochlorid unter Zusatz von Kaliumcarbonat als Hilfsbase jeweils in equimolarer Menge. Nach 30 Minuten bei einer Frequenz von 3000 Schüttelvorgängen pro Minute kommt es zur quantitativen Umsetzung. Allerdings ist eine Kühlung auf  $-40^\circ\text{C}$  erforderlich, da sonst das freiwerdende Phenol schmelzen und den Ansatz verklumpen würde.

Bei dem Vorgang reagieren die beteiligten Kristalle durch den hohen Druck. Durch den Mahlvorgang werden sie stetig abgeschliffen, sodass ständig eine „neue Oberfläche“ zur Verfügung steht, bis die Umsetzung komplett ist. Anschließend ist lediglich eine säulenchromatographische Aufreinigung notwendig. Die Ausbeute an 48a beträgt ca. 85%.

Die Festphase-Umsetzung mit anderen Aminosäureestern verlief allerdings erfolglos. Weder Leucinmethylester, Glycinethylester noch Tryptophanmethylester konnten unter gleichen Bedingungen mit DIPHSAIC zur Reaktion gebracht werden. Auch der direkte Einsatz der freien Aminosäuren führte zu keinem Erfolg.

### Hydrolyse der Aminosäureester 47:

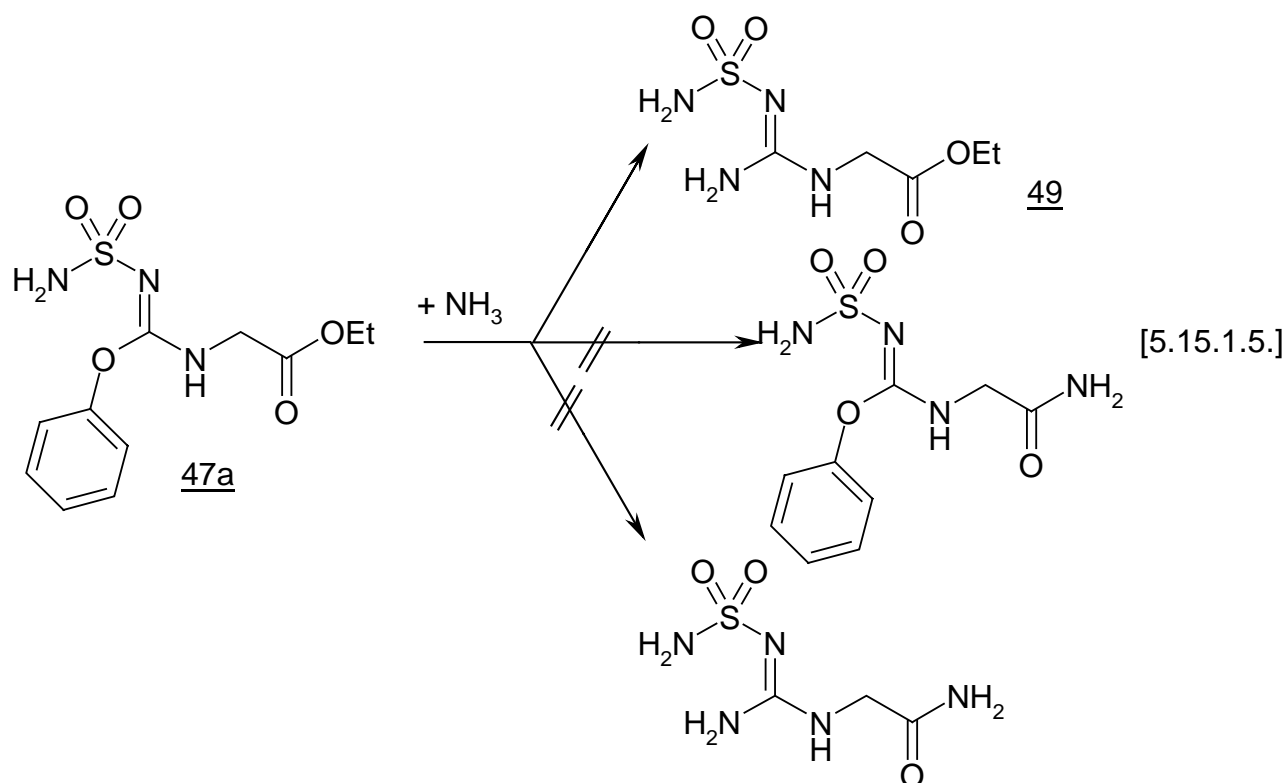
Die alkalische Verseifung der Aminosäureester 47 ( $R^2 =$  Methyl, Ethyl, Benzyl) mit Lithiumhydroxid in THF bei Raumtemperatur führte nicht zu den freien Carbonsäuren. Vermutlich erfolgte eine nucleophile Substitution des Phenoxyrestes durch das Hydroxidion. Dagegen führte die saure Verseifung des t-Butylesters 47c in Trifluoressigsäure zur freien Carbonsäure 47i [5.15.1.4.]. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die Trifluoressigsäure am Rotavapor entfernt und das zurückbleibende rötliche Öl durch Zugabe von Ether zur Kristallisation gebracht. Die Ausbeute an 47i lag bei 50%.



Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum ist der Erfolg der Reaktion durch das Fehlen der Signale für den Tertiärbutylester zu erkennen, die restlichen Signale unterscheiden sich kaum von denen des Edukts. Das gleiche gilt für das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum. Die Unterschiede in den Resonanzen für die  $\text{NH}_2$ -Gruppe des Sulfamoylrestes (6,67 ppm für 47i in  $\text{DMSO-d}_6$  und 4,65 ppm für 47c in  $\text{CDCl}_3$ ) sind wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Lösungsmittel, in denen die Spektren aufgenommen wurden, zurückzuführen. Im IR-Spektrum von 47i fällt die verbreiterte Bande für die OH-Valenzschwingung der Carbonsäure auf.

**Ammonolyse des Aminosäureesters 47a :**

Während die Erstsitution von Phenol aus DIPHSAIC unter sehr milden Bedingungen erfolgt, werden für die Zweitsitution höhere Temperaturen und längere Reaktionszeiten benötigt (Müller, Runkel, Siuts). Bei der Ammonolyse der Isoharnstoffe vom Typ 47 ist außer der Substitution am Iminokohlenstoff jedoch auch der nucleophile Angriff an der Estergruppe zu den entsprechenden Amiden denkbar. Somit war im Fall 47a prinzipiell mit drei Reaktionsprodukten zu rechnen [5.15.1.5.].



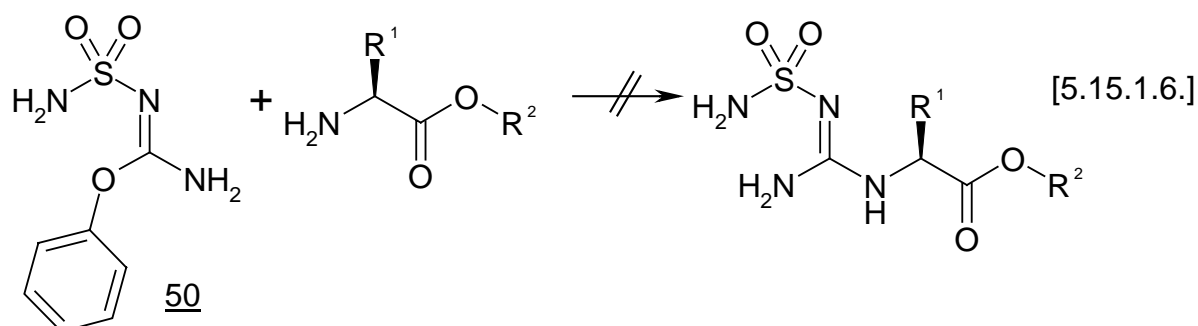
Beim Einleiten von Ammoniak durch eine Lösung von 47a in 2-Propanol bei 50°C wurde der zweite Phenoxyrest durch Ammoniak ersetzt zu 49 (Ausbeute 15%). Die Bildung eines Carbonsäureamids erfolgte auch bei längeren Reaktionszeiten nicht.

Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum sind die Signale für die Protonen des Ethylesters unverändert, dafür fehlen die Signale für den Phenoxyrest. Entsprechendes gilt für das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum tritt dafür ein neues Signal bei 4,00 ppm auf, das der NH<sub>2</sub>-Gruppe am Iminokohlenstoff zuzuschreiben ist. Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum ist das Signal für den

Iminokohlenstoff gegenüber der Ausgangsverbindung von 150,9 ppm auf 156,0 ppm verschoben.

Als Alternativsynthese wurde außerdem geprüft, ob 49 auch über den im Arbeitskreis vorhandenen Baustein 2-Phenyl-3-sulfamoyl-iso-harnstoff 50 nach Substitution der zweiten Phenoxygruppe durch einen Aminosäureester erhältlich ist [5.15.1.6.].

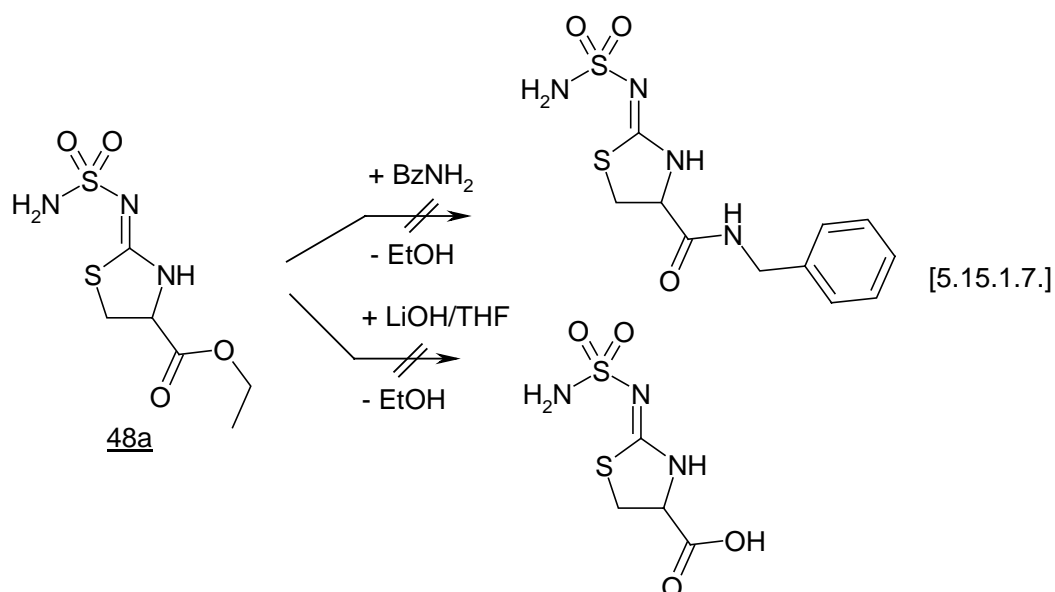
Der Versuch führte jedoch auch bei höheren Temperaturen und längeren Reaktionszeiten nicht zum gewünschten Produkt. Wahrscheinlich ist die Reaktivität des Aminosäureesters für diese Zweitsubstitution zu gering.



### Solvolysversuche des Esters 48a:

Auch Versuche zur Modifizierung der Esterfunktion im Produkt 48a scheiterten [5.15.1.7.].

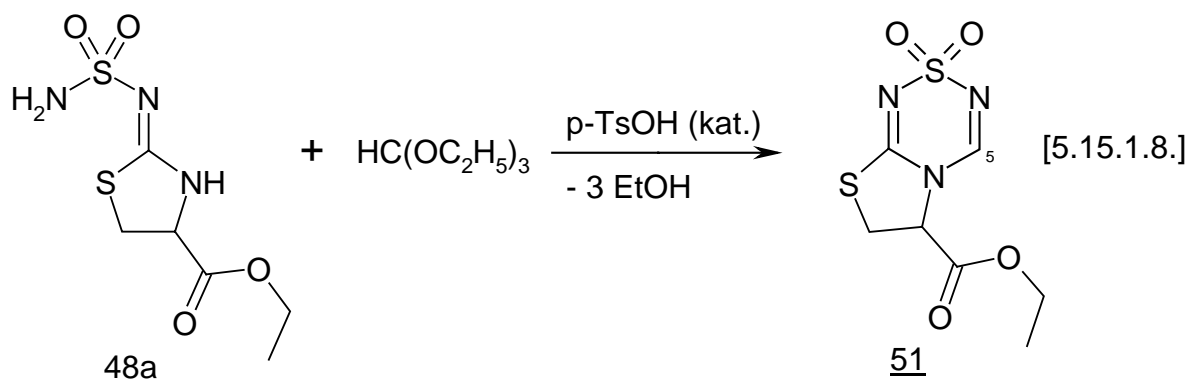
Weder mit Lithiumhydroxid in THF, noch mit Benzylamin (als Lösungsmittel) konnten auch nach mehrtägigem Rühren bei Raumtemperatur Reaktionsprodukte erhalten werden.



**Cyclisierung des Esters 48a mit Orthoameisensäureester:**

Unter Einbindung der Sulfamoylfunktion des Esters 48a an den Thiazolidinring bot sich eine Cyclisierung mit Orthoameisensäureester an [5.15.1.8.]. Cyclisierungsreaktionen von N-Sulfamoyl-isoharnstoffen und -guanidinen zu 1,2,4,6-Thiatriazin-1,1-dioxiden sind bereits von Schümmelfeder<sup>83</sup> und Siuts<sup>79</sup> erfolgreich mittels Orthoestern durchgeführt worden.

In analoger Weise gelang es mir, 48a durch Erhitzen unter Rückfluss in o-Ameisensäuretriethylester und saure Katalyse mit p-Toluolsulfonsäure zu cyclisieren und den heterocyclischen Ester 51 nach Umkristallisieren aus 2-Propanol mit einer Ausbeute von 49% zu isolieren.



Die erfolgte Cyclisierung ist im <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum gut nachzuvollziehen. Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum taucht ein neues Signal bei 149,5 ppm auf, das dem Kohlenstoff in 5-Position des Thiatriazinringes zugeordnet werden kann. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum wird der Ringschluss durch ein Singulett bei 8,27 ppm für das Proton in 5-Stellung des Thiatriazinringes belegt. Die Resonanzsignale der NH- und SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>- Protonen sind wie erwartet verschwunden.

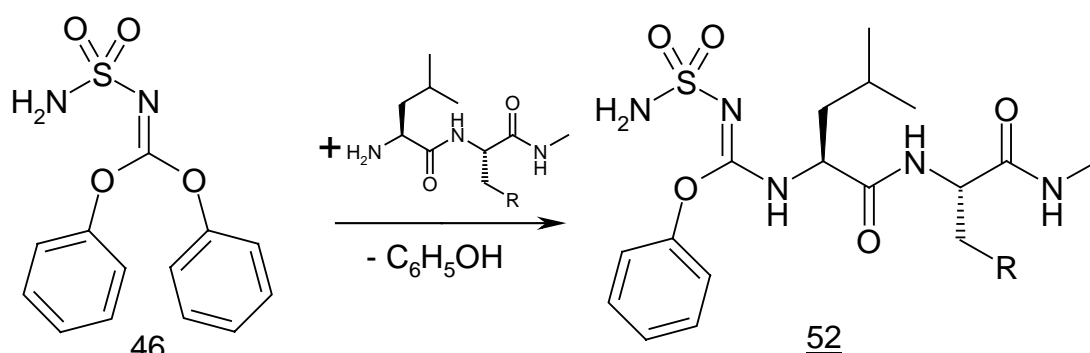
Ringschluss-Versuche mit o-Triethylbenzylester und o-Triethyllessigsäureester unter analogen Bedingungen führten nicht zum Erfolg. Es kam zur Zersetzung der Edukte.

### 5.15.2. Umsetzungen von DIPHSAIC mit Dipeptidmethylenamiden

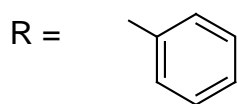
Aufgrund der an Aminosäureestern gesammelten Erfahrungen über das Reaktionsverhalten gegenüber DIPHSAIC versuchte ich abschließend, auch Dipeptidstrukturen mit diesem interessanten Baustein zu verknüpfen. Wegen der Hydrolyseprobleme der Esterfunktion bei den Aminosäureprodukten wählte ich Dipeptide in Form ihrer Methylenamide für die nucleophile Substitution mit DIPHSAIC [5.15.2.1.].

Dazu wurde 46 direkt mit dem Dipeptid als Aminokomponente in Aceton mehrere Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur umgesetzt, bis im Dünnschichtchromatogramm keine Edukte mehr sichtbar waren. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Ansatz säulenchromatographisch aufbereitet. Die Ausbeuten der Dipeptidderivate 52a-c lagen zwischen 40 und 70%.

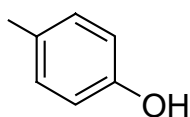
Umgesetzt wurde  $\text{H}_2\text{N-L-Leu-L-Phe-NMe}$ ,  $\text{H}_2\text{N-L-Leu-L-Trp-NMe}$  und  $\text{H}_2\text{N-L-Leu-L-Tyr-NMe}$ .



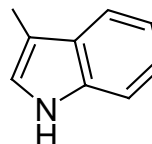
[5.15.2.1.]



52a



52b



52c

Bei allen drei Substanzen erscheint im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum das Signal für den Iminokohlenstoff bei 150,9 ppm, daneben zeigen sich die erwarteten Signale für das Dipeptid-Grundgerüst und für den Phenoxy-Rest.

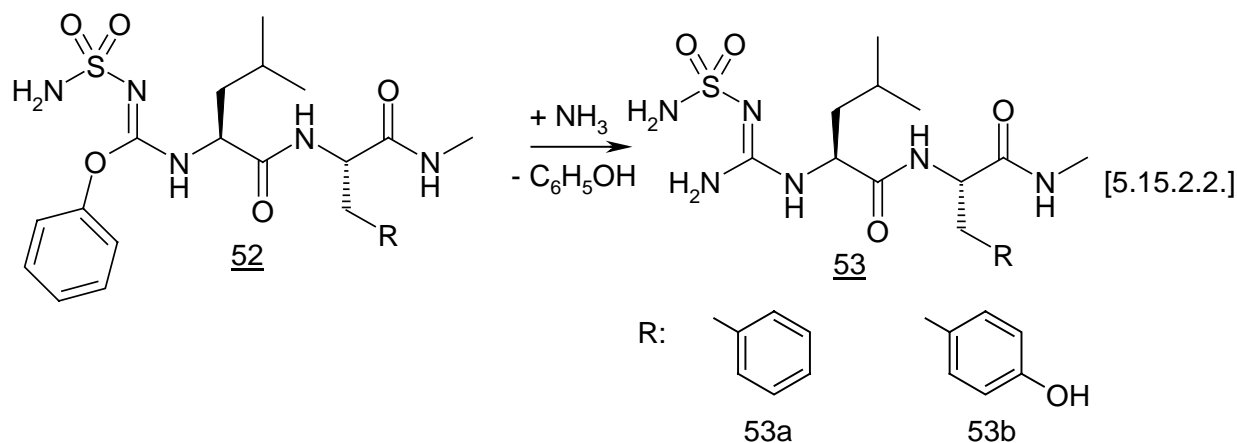
Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum erscheint das Signal für die beiden Protonen der Aminogruppe der Sulfamidpartialstruktur zwischen 6,71 – 6,75 ppm.

Die Absorptionsbande für die C=N-Schwingung im IR-Spektrum wird von den Banden für die C=O-Schwingung überlagert. Die Banden für die symmetrische und asymmetrische Streckschwingung der SO<sub>2</sub>-Gruppe erscheinen bei ~1300 cm<sup>-1</sup> bzw. ~1130 cm<sup>-1</sup>.

Alle drei Substanzen zeigten keine hemmende Wirkung gegenüber Thermolysin. Entsprechende Tests an Matrixmetalloproteasen stehen noch aus.

52a und 52b wurden außerdem einer Ammonolyse durch Einleiten von gasförmigen Ammoniak in Isopropanol bei 50°C unterworfen. Hierbei konnte der zweite Phenoxyrest durch Ammoniak ersetzt werden zu den Produkten 53a-b [5.15.2.2.].

Die Ausbeuten lagen bei 30%.

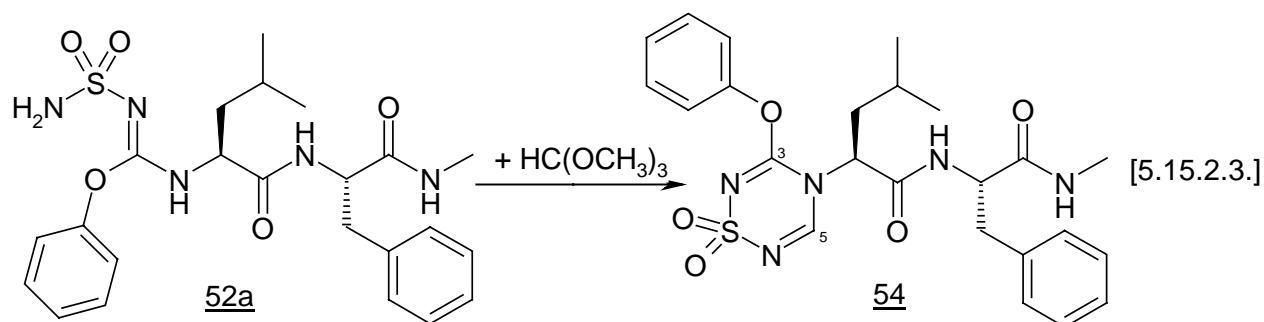


Im <sup>13</sup>C-Spektrum fällt auf, dass die Signale für fast alle Kohlenstoffatome verdoppelt vorliegen. Das Signal für den Guanidin-Kohlenstoff erscheint bei 154.1/153.3 ppm für 53a und bei 154.3/153.4 ppm für 53b. Der Erfolg der Umsetzung ist auch daran erkennbar, dass die Signale für den Phenoxyrest fehlen.

Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum erscheint das Signal der SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>-Gruppe unverändert bei ~6.70 ppm. Das Signal der Guanidin-NH<sub>2</sub>-Protonen ist in beiden Fällen von den Signalen der β-ständigen CH<sub>2</sub>-Gruppe des Aminosäurerestes (Phenylalanin bzw. Tyrosin) überlagert und tritt bei 3.30 ppm auf.

Beide Substanzen zeigten leider ebenfalls keine hemmende Wirkung gegenüber Thermolysin. Gegenüber Matrixmetalloproteasen liegen noch keine Untersuchungen vor.

Analog 51 bot sich auch für 52a eine weitere Cyclisierung mit Orthoameisensäureester zum 1,2,4,6-Thiatriazin-1,1-dioxid-Dipeptid 54 an [5.15.2.3]. Die Ausbeute betrug 36%.



Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum erscheint das Signal für das Proton des Thiatriazinrings als Singulett bei 8.28 ppm. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum treten die Signale für den C3-Kohlenstoff des Thiatriazinringes bei 156.8 ppm und für den C5-Kohlenstoff bei 149.9 ppm auf.

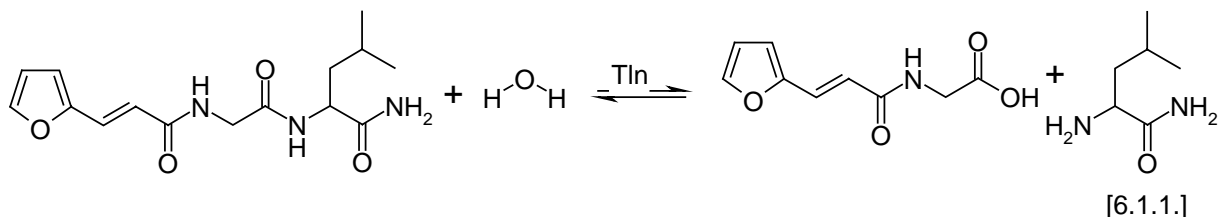
Die Substanz zeigte keine Hemmwirkung gegenüber Thermolysin.

## 6. Biochemische Prüfung von Zinkprotease-Inhibitoren

### 6.1. Thermolysin- Hemmtest

Die Bestimmung der Aktivität vom Thermolysin (TLN) unter dem Einfluss der verschiedenen Inhibitoren erfolgte mit Hilfe eines enzymkinetischen Tests, der auf einer Änderung der Absorption des Substrates bei dessen Hydrolyse beruht. Das hier verwendete Messverfahren ist eine Abwandlung des von Morgan et al.<sup>84</sup> beschriebenen Ansatzes und weicht nur geringfügig von der von Bartlett<sup>85</sup>, Feder<sup>86</sup>, Grobelny<sup>87</sup>, de Kreij<sup>88</sup> und Holmquist<sup>89</sup> veröffentlichten Methode ab.

Wird die Amidbindung des Substrates 3-(2-Furyl-)acryloyl-glycyl-leucinamid (FAGLA) zwischen 3-(2-Furyl-)acryloylglycin und Leucin gespalten, nimmt die Absorption bei 345 nm ab, was eine kontinuierliche Beobachtung der Enzymaktivität ermöglicht<sup>90</sup> [6.1.1.]



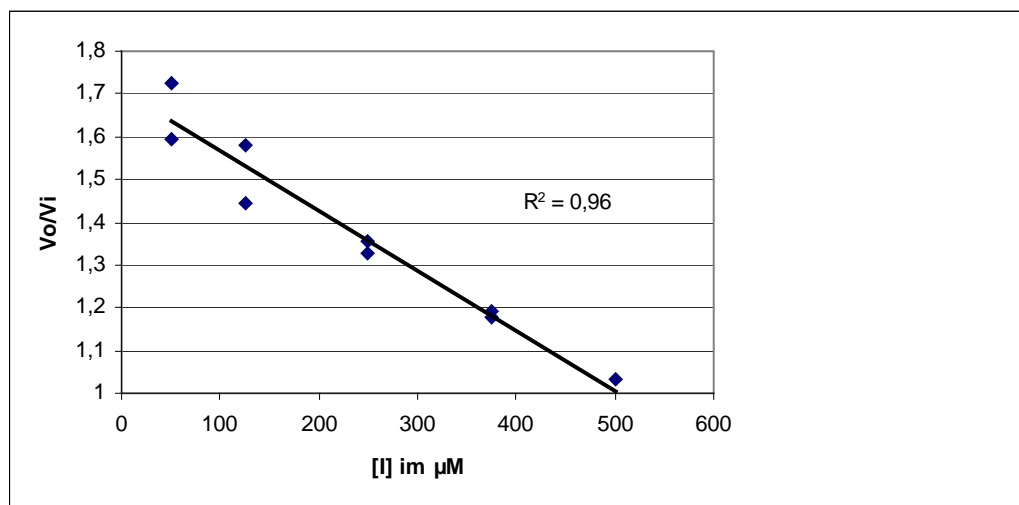
Zur Bestimmung des  $IC_{50}$ - Wertes eines Inhibitors wurde die Enzymaktivität bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bestimmt. Aus den erhaltenen Messergebnissen wurde der  $IC_{50}$ - Wert nach Gleichung 1 ermittelt<sup>87</sup>.

$$\frac{v_0}{v_i} = \frac{[I]}{IC_{50}} + 1 \quad \text{Gleichung 1}$$

$v_0$       Geschwindigkeit des Substratabbaus in Abwesenheit eines Inhibitors

$v_i$       Geschwindigkeit des Substratabbaus in Anwesenheit eines Inhibitors

Durch Auftragen von  $v_0/v_i$  gegen die Inhibitor- Konzentration wurde der  $IC_{50}$ -Wert über die Steigung der Geraden ermittelt [6.1.2.].



[6.1.2.]

[6.1.2.] Bestimmung des  $IC_{50}$ -Werts von 30a gegen Thermolysin

### Messbedingungen:

Als Lösemittel für Thermolysin (13,3 nM) wurde ein 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure-(MOPS)- Puffer der Konzentration 0,1 M verwendet, dem zur Stabilisierung des Enzyms Calciumchlorid (10 mM) und zur Aktivitätserhöhung<sup>91</sup> Natriumbromid (2,5 M) zugegeben sind. Die Puffermischung wurde mit einem Metrohm- pH- Meter auf pH 7 eingestellt.

Das Substrat wurde zunächst in DMF angelöst und anschließend mit der Puffermischung zu einer Endkonzentration von 2,5 % DMF verdünnt.

Aufgrund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit wurden die Inhibitoren zunächst in DMSO angelöst und mit der Puffermischung so verdünnt, dass der DMSO- Anteil möglichst gering, maximal aber bei 5% Endkonzentration gehalten wurde.

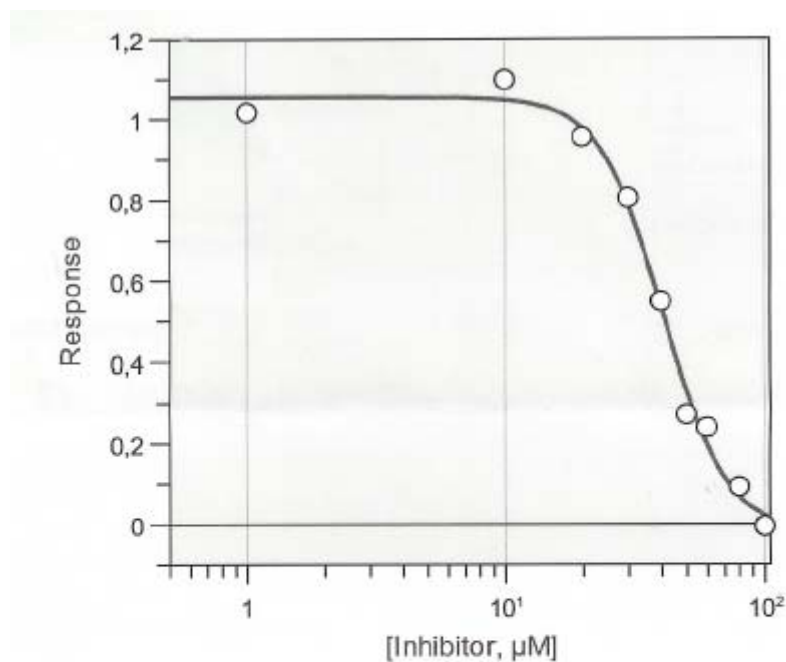
Zur Messung der Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse wurden das Enzym und der Inhibitor in einer 0,5 cm- Küvette gemischt, drei Minuten inkubiert und die Hydrolyse durch Zugabe der Substratlösung gestartet. Die Messung der Absorption erfolgte an einem Analytik-Jena Specord 40- Spektrometer bei  $\lambda = 345$  nm. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 5 Minuten, wobei nach visueller Begutachtung als linearer Bereich zur Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit die ersten drei Minuten berücksichtigt werden.

Zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit ohne Inhibitor wurden Blindproben gemessen, bei denen der DMSO- Anteil dem der Inhibitorproben entsprach.

## 6.2. Matrixmetalloproteasen- Hemmtest

Die Aktivitätsbestimmungen für meine Inhibitoren wurden zum einen im Arbeitskreis von Prof. Tschesche am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bielefeld von Herrn J. Schröder durchgeführt, dem ich an dieser Stelle herzlich für die Zusammenarbeit danken möchte. Bestimmt wurde die Hemmwirkung gegen die katalytische Domäne der neutrophilen Kollagenase (cDMMP-8). Dazu wurde in einem Primärscreening das Enzym mit dem Fluoreszenzsubstrat (7-Methoxycoumarin-4yl)acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu-(3-[2,4-dinitrophenyl]-L-2,3-diaminopropionyl)-Ala-Arg-NH<sub>2</sub> (Fa. Bachem) zur Reaktion gebracht und für drei Minuten der lineare Anstieg bei 393 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 328$  nm) beobachtet. Zu diesem Reaktionsansatz (Gesamtvolumen: 2 ml; Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 10 mM CaCl<sub>2</sub> und 0,02% (w/v) PEG 8000) wurden dann 30  $\mu$ l der entsprechenden Inhibitorlösung (2mg/ml DMSO) zugesetzt und die Änderung des linearen Fluoreszenzanstieges für weitere 5 Minuten beobachtet.

Die Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes erfolgte in weißen U-Boden Microtiterplatten (Microfluor 1 White, Dynex, USA, 96 wells) mit einer Substratendkonzentration von 6  $\mu$ M. Die Enzymkonzentration im Assay betrug etwa 1 nM und der DMSO-Anteil 2% (v/v). Von einer 7.5 mM Stammlösung in 100% DMSO wurde der Inhibitor seriell auf 11 verschiedene Endkonzentrationen im Assay mit Puffer verdünnt (100  $\mu$ M, 90  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 70  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 1  $\mu$ M). Reihe A bis H auf der Microtiterplatte enthielt nur DMSO für die Reaktionsgeschwindigkeit ohne Inhibitor. Nach Vorinkubation von 30 Minuten bei 25°C wurde die Reaktion durch Hinzufügen des Fluoreszenzsubstrates gestartet und der Anstieg der Fluoreszenzintensität bei 405 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 330$  nm) auf einem SpectraFlour Plus (Tecan, Deutschland) für 15 Minuten gemessen. Die Bestimmung erfolgte als Dreifachbestimmung. Die Dosis-Wirkungskurve wurde mit dem Programm GraFit (Erithacus Software Limited) ausgewertet [6.2.].



Parameter	Value	Std. Error
Y Range	1,0748	0,0760
IC 50	40,7861	2,0985
Slope factor	3,5852	0,6210
Background	-0,0198	0,0602

#### [6.2.] Bestimmung des $\text{IC}_{50}$ -Wertes von 28b gegen cD MMP-8

Zum anderen wurden meine Inhibitoren von der Arbeitsgruppe von Prof. Supuran, Università degli Studi di Firenze, Dipartimento di Chimica, Laboratorio di Chimica Bioinorganica, Florenz gegen die humanen Matrixmetalloproteasen MMP-1, MMP-2, MMP-8 und MMP-9, sowie die Kollagenase von *Chlostridium histolyticum* (ChC) getestet. An dieser Stelle möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Die humanen Matrixmetalloproteasen waren von Calbiochem (Inalco, Milan, Italien). Sie wurden im Assay-Puffer durch Zugabe von Rindertrypsin (50  $\mu\text{l}$ , 0,6 mg/ml) zum Proenzym aktiviert und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Trypsin wurde dann durch Aprotinin (50  $\mu\text{l}$ , 1,2 mg/ml) inaktiviert. Die Anfangsgeschwindigkeit der Hydrolyse des Thioestersubstrates AcProLeuGly-S-LeuLeuGlyOEt gekoppelt mit der Reaktion mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) wurde benutzt, um die katalytische Aktivität und die Hemmung der vier Matrixmetalloproteasen nach der photometrischen Methode von Powers und Kam<sup>92</sup>, modifiziert nach Johnson et al.<sup>93</sup>, zu bestimmen. Die Änderung der Extinktion ( $\epsilon = 19,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) bei 405 nm wurde bei Raumtemperatur mit einem Cary 3 Spektrometer gemessen.

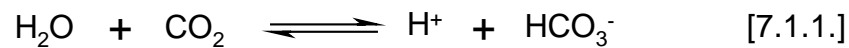
Eine typische 100  $\mu\text{l}$  Messung enthielt 50 mM MES, pH 6,0, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 100  $\mu\text{M}$  Substrat, 1 mM 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) und 5 nM MMP. Für die Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes wurden Lösungen der Inhibitoren in DMSO benutzt, die Endkonzentration an DMSO im Reaktionsansatz betrug 2%.

Die Kollagenase von *Clostridium histolyticum* und ihr Substrat FALGPA (Furanacryloyl-leucyl-glycyl-prolyl-alanin) stammten von Sigma-Aldrich (Milan, Italien), und ihre Konzentrationen wurden durch Absorbtionsmessung bei 280 nm bestimmt, wobei die Extinktionskoeffizienten des Herstellers benutzt wurden. Die Aktivität dieser Zubereitungen lag bei 10 NIH (National Institute of Health) Einheiten/mg Feststoff. Die Stärke der Inhibitoren wurde durch die Hemmung der enzymatischen Aktivität der Kollagenase bei 25°C mit FALGPA als Substrat nach der Methode von van Wart und Steinbrinck<sup>94</sup> bestimmt. Die Hydrolyserate wurde durch die Änderung der Extinktion bei 324 nm von FALGPA bestimmt, mit einem Extinktionskoeffizienten für FALGPA von  $\epsilon = 24,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Puffer: 50 mM Tris, 0,4 mM NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,50). Die Messungen wurden mit einem Cary 3 Spektrometer durchgeführt.

## 7. Hemmstoffe der Carboanhydrasen (CA's)

### 7.1. Carboanhydrasen als Zink-bindende Enzyme

Die Carboanhydrasen (CA) (EC 4.2.1.1.) gehören zu der Klasse der Hydrolasen. Sie kommen in der gesamten Natur vor, beginnend mit den Archeae, Eubakterien, Algen und Pflanzen bis zu den höheren Tieren, einschließlich der Wirbeltiere. Das Zinkion-haltige Enzym hat ein Molekulargewicht von 28-30 kDa und katalysiert die reversible Umwandlung zwischen CO<sub>2</sub> und Hydrogencarbonat:



Die Carboanhydrasen werden von drei verschiedenen, evolutionär nicht verwandten Gen-Familien kodiert:

- die  $\alpha$ -CA's, die in Wirbeltieren, Eubakterien, Algen und im Cytoplasma von Pflanzen vorkommen,
- die  $\beta$ -CA's, die vorwiegend in Eubakterien, Algen und in den Chloroplasten von Ein- und Zweikeimblättrigen Pflanzen zu finden sind, sowie
- die  $\gamma$ -CA's, die vorwiegend in Archeae und einigen Eubakterien vorkommen.

Die vertebralen Carboanhydrasen regulieren durch die Hydratation von CO<sub>2</sub> das Säure-Base-Gleichgewicht im Blut und ermöglichen den für die Atmung wichtigen Abtransport von Kohlendioxid als Hydrogencarbonat aus metabolisierenden Geweben zu den Lungen.

Neben der Hydratation von CO<sub>2</sub> katalysieren die Carboanhydrasen eine Vielzahl von weiteren Reaktionen, wie die Hydratation von Cyanat zu Carbaminsäure, von Cyanamid zu Harnstoff oder die Verseifung von Estern der Carbonsäure, Sulfonsäure oder der Phosphorsäure<sup>95</sup>.

In den höheren Wirbeltieren (einschließlich des Menschen) sind insgesamt 14 verschiedene Isoenzyme der  $\alpha$ -Carboanhydrasen bekannt<sup>95</sup>, davon sind sieben sehr gut untersucht und beschrieben. Sie gleichen sich in der Zahl an Aminosäuren von 260 und bilden jeweils ein

Proteinmonomer. Die unterschiedlichen Isoenzyme sind im Körper in verschiedenen Organen lokalisiert <sup>96</sup> [7.1.2].

Isoenzym	Vorkommen im Körper
CA I	Erythrocyten
CA II	Erythrocyten Augen Osteoklasten und Chondrocyten der Knochen Gliazellen in neutralen Tumoren
CA III	rote Muskelfasern, Fettzellen (Adipocyten)
CA IV	Membran gebunden, an der Plasmaseite von kapillaren Endothelzellen: - der Nierenzellen - der Lungenzellen - der Leberfunktionszellen (Leberparenchymzellen)
CA V	Mitochondrien
CA VI	Speichel
CA VII	Speicheldrüsen

[7.1.2.] Isoenzyme der humanen Carboanhydrase und ihre Verteilung in den verschiedenen Organen

Die Hemmung der  $\alpha$ -CA's durch aromatische oder heterocyclische Sulfonamide wird in der Therapie seit vielen Jahren genutzt. Sie zeigten sich nützlich als Diuretika oder in der Behandlung und Prävention einer Vielzahl von Krankheiten wie dem Glaukom (Grüner Star), der Epilepsie oder der Osteoporose <sup>95</sup>.

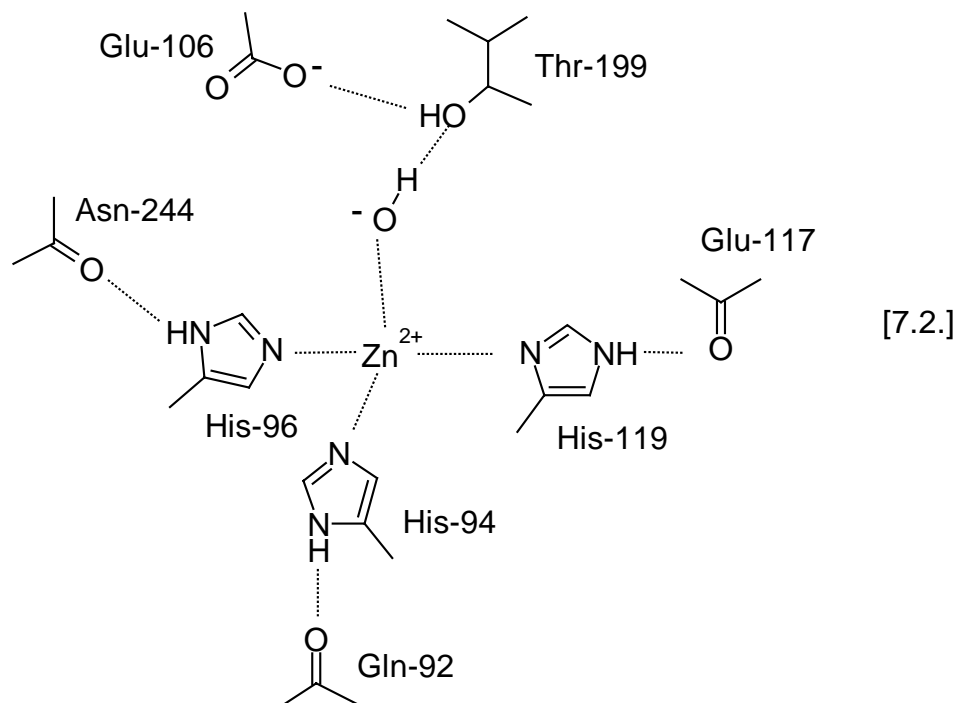
## 7.2. Struktur der Carboanhydrasen am Beispiel der humanen Carboanhydrase II

Das globuläre Protein CA II ist ellipsenförmig und hat die Maße 55 x 44 x 39 Å. Die Primärstruktur besteht aus einer Sequenz von 260 Aminosäuren. Aus der Aufklärung der Tertiärstruktur ist bekannt, dass das Protein aus nur einer Domäne besteht <sup>97</sup>. Das bestimmende Sekundärstrukturelement ist ein 10-strängiges, leicht verdrehtes  $\beta$ -Faltblatt, das

das Protein in zwei Hälften teilt. Bis auf zwei parallele Paare ist das  $\beta$ -Faltblatt antiparallel. Einige wenige kurze  $\alpha$ -Helices befinden sich an der Oberfläche der CA II.

Das aktive Zentrum ist amphiphil. Wenn kein Ligand gebunden ist, ist es von einem Netzwerk Wasserstoffbrücken-gebundener Wassermoleküle durchzogen, über die es mit dem umgebenden Medium in Verbindung steht.

Das für die Katalyse essentielle Zinkion ist am Boden einer 15 Å-tiefen, kegelförmigen Bindetasche verankert. Es wird annähernd tetraedrisch von drei Histidinresten und einem Wassermolekül bzw. Hydroxidion koordiniert wird [7.2.]. Über die primären Histidin-Liganden steht das Zinkion mit vier weiteren Aminosäuren in Kontakt. His-94 (N $\delta$ 1) bildet dabei mit dem Sauerstoffatom des Gln-92-Restes (O $\epsilon$ 1) eine Wasserstoffbrückenbindung, ebenso His-119 (N $\epsilon$ 2) mit der Carboxylseitenkette des Glu-117 (O $\epsilon$ 2). His-96 (N $\delta$ 1) tritt über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Carbonylsauerstoff des Proteinrückgrats von Asn-244 in Wechselwirkung. In dem konisch zulaufenden aktiven Zentrum befindet sich ein weiteres Wassermolekül, das sogenannte „deep water“, welches in der Enzymreaktion von CO<sub>2</sub> verdrängt wird. Dieses findet sich in einer hydrophoben Tasche, die aus den Seitenketten von Val-121, Val-143, Leu-198 und Trp-209 gebildet wird.



Das Zink-gebundene Hydroxidion, welches die aktive Form des Enzyms darstellt, unterhält außerdem Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen mit der Hydroxylgruppe von Thr-199,

welches ebenfalls Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungen mit der Carboxylatgruppe von Glu-106 unterhält.

### 7.3. Mechanismus der Katalyse

Beim katalytischen Reaktionsablauf spielt das Zinkion eine zentrale Rolle. Die besonders hohe Umsetzungsgeschwindigkeit beruht auf der räumlichen Nähe aller beteiligten Edukte. Mit einer Umsatzrate von  $10^6 \text{ s}^{-1}$  gehört CA II zu den schnellsten bisher untersuchten Enzymen<sup>98</sup>. Röntgenkristallographische Methoden lassen eine Untersuchung des nur sehr kurzlebigen Katalysevorgangs nicht zu.

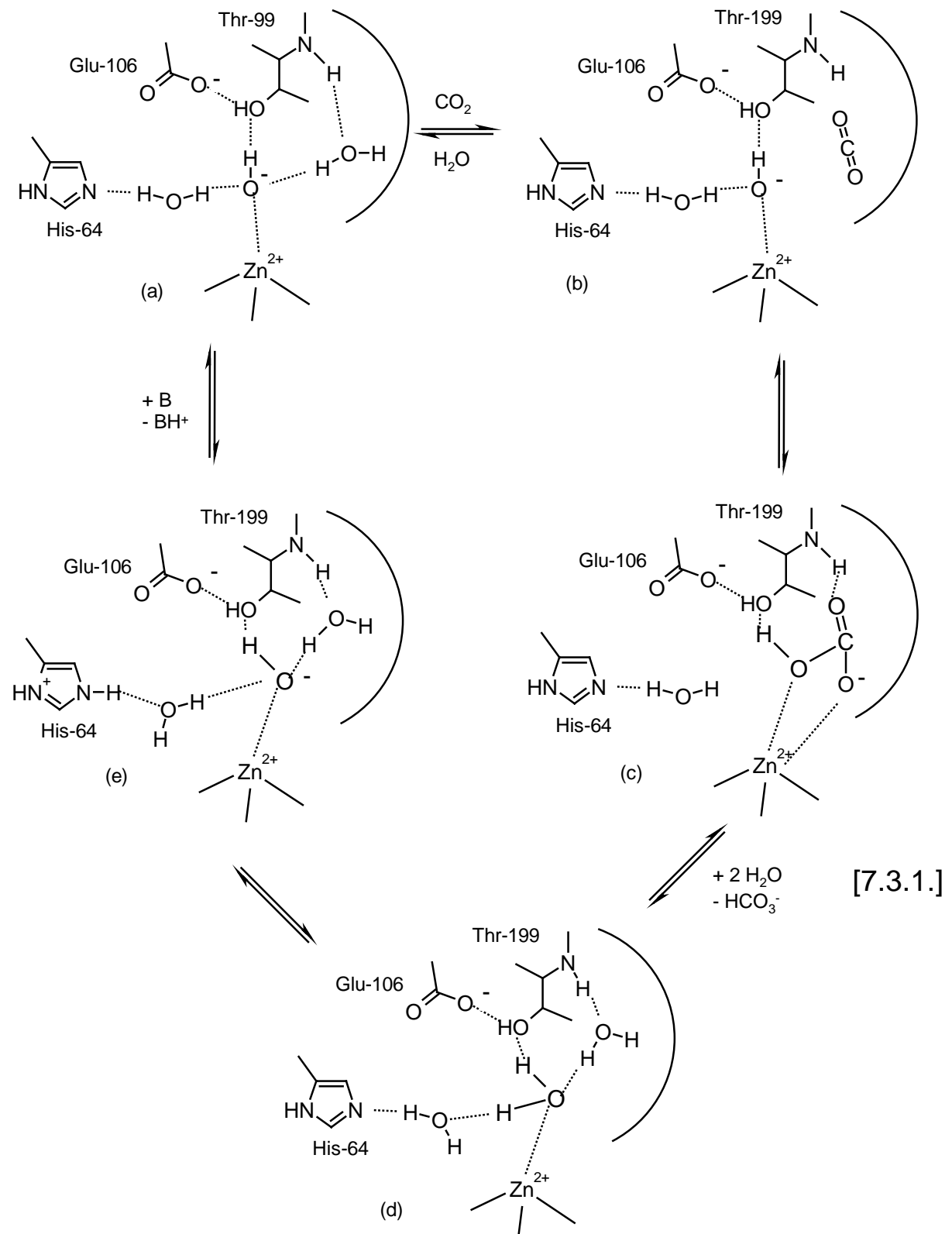
Aus Bindungsstudien mit anionischen Inhibitoren von CA II lassen sich allerdings Rückschlüsse auf den Katalysemechanismus ziehen. So übernimmt das System Thr-199/Glu-106 eine Art „Türsteher-Rolle“. Die Hydroxylgruppe von Thr-199 lässt nach diesen Studien nur solche Anionen an das Zinkion binden, die in der Lage sind, ein Proton für eine Wasserstoffbrücke mit dem Seitenketten-Sauerstoffatom von Thr-199 zu liefern, da Thr-199 durch eine starke Wasserstoffbrückenbindung zu Glu-106 ein exzellenter Wasserstoffbrückenakzeptor ist.

Bei der Katalyse [7.3.1.] erhöhen diese Wechselwirkungen die Nucleophilie des Zinkgebundenen Hydroxidions (a). Das „deep water“ wird durch  $\text{CO}_2$  verdrängt, dieses bindet nur lose in der obengenannten hydrophoben Tasche (b), wobei schwache polare Wechselwirkungen mit  $\text{Zn}^{2+}$  der Orientierung des  $\text{CO}_2$ -Moleküls in der Tasche dienen. Durch das System Thr-199/Glu-106 wird das Zinkgebundene Hydroxidion in eine günstige Orientierung für den nucleophilen Angriff auf das immobilisierte  $\text{CO}_2$  gebracht. Die hohe Umsetzungsgeschwindigkeit des Moleküls wird u.a. damit erklärt, dass das  $\text{CO}_2$ -Molekül erst im Übergangszustand  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  eine Wechselwirkung mit der NH-Gruppe von Thr-199 eingeht und die anschließende Bindung im aktiven Zentrum nur schwach ist (c).

Das Hydrogencarbonation wird dann durch ein Wassermolekül ersetzt, in die Lösung freigesetzt und führt zur sauren Form des Enzyms, in welcher das Zinkion von Wasser koordiniert und die katalytisch inaktiv ist (d).

Um die basische Form des Enzyms zu regenerieren, findet eine Protonentransfer vom aktiven Zentrum in die Umgebung statt. Dieser wird bei CA II durch His-64 im aktiven Zentrum

unterstützt, das als Protonenshuttle fungiert und das aufgenommene Proton (e) an das umgebende Puffersystem entlässt (a).

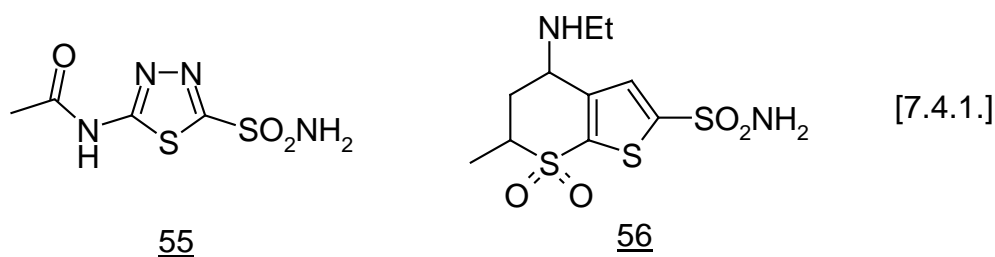


#### 7.4. Inhibitoren der Carboanhydrasen

Neben einigen Anionen wie z.B.  $\text{HS}^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{NCO}^-$ ,  $\text{N}_3^-$ ,  $\text{HSO}_3^-$  oder  $\text{HCOO}^-$ , die schwache Inhibitoren der CA's sind, bildet die Gruppe der Sulfonamide den weitaus größten Anteil unter den Inhibitoren der CA's. Aus röntgenkristallographischen Studien von Enzym-Inhibitor-Komplexen von Sulfonamiden und Sulfamid ( $\text{H}_2\text{NSO}_2\text{NH}_2$ ), welches als ein Prototyp der Sulfonamide ohne organisches Gerüst betrachtet werden kann, mit hCA II ist bekannt, warum die Sulfonamidgruppe so besonders als Zink-bindende Gruppe für die CA's geeignet ist:

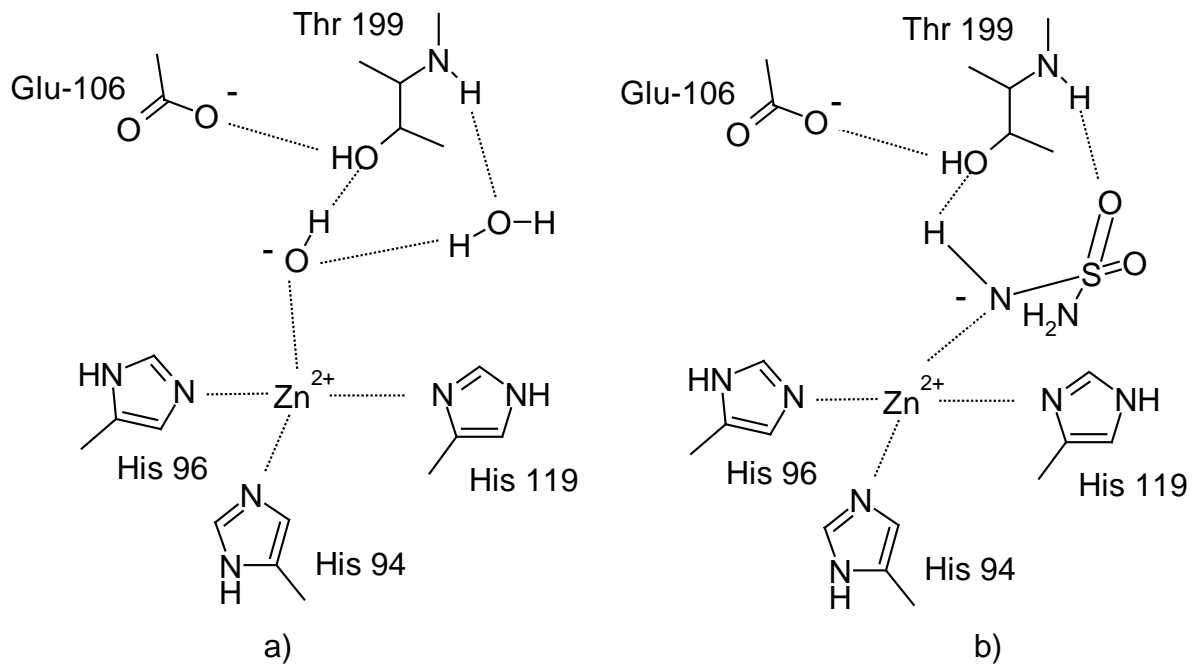
Sowohl im Komplex mit Sulfamid, als auch mit den Sulfonamiden, bindet das Zinkion an die deprotonierte Amid-Gruppe der Sulfonamidfunktion ( $\text{RSO}_2\text{NH}^-$ ) bzw. des Sulfamidaniums ( $\text{NH}_2\text{SO}_2\text{NH}^+$ ) und verdrängt dabei das im nativen Enzym gebundene Hydroxidion [7.4.2.]. Wie im nativen Enzym, entsteht ein verzerrter Tetraeder, wobei die Stickstoffatome der drei Histidinliganden (His-94, His-96, His-199) und der Stickstoff der Sulfonamidgruppe bzw. des Sulfamids an den Ecken dieses Tetraeders sitzen. Das verbliebene Proton der Sulfonamid-/Sulfamid-Gruppe bildet eine Wasserstoffbrücke zu  $\text{O}_\gamma$  von Thr-199 aus. Ein Sauerstoffatom der  $\text{SO}_2$ -Gruppe dient als Wasserstoffbrücken-Akzeptor für die Amid-Gruppe des Proteinrückgrates von Thr-199. Der andere Sauerstoff ersetzt das „deep water“ des Ligandenfreien Enzyms.

Bei den aromatischen bzw. heterocyclischen Sulfonamiden geht das aromatische bzw. heterocyclische Gerüst hydrophobe Wechselwirkungen mit dem hydrophoben Teil der amphiphilen Bindetasche ein. Beispiele für in der Praxis, insbesondere in der Glaukomtherapie verwendete, Sulfonamide sind Acetazolamid 55 oder Dorzolamid 56 [7.4.1.].

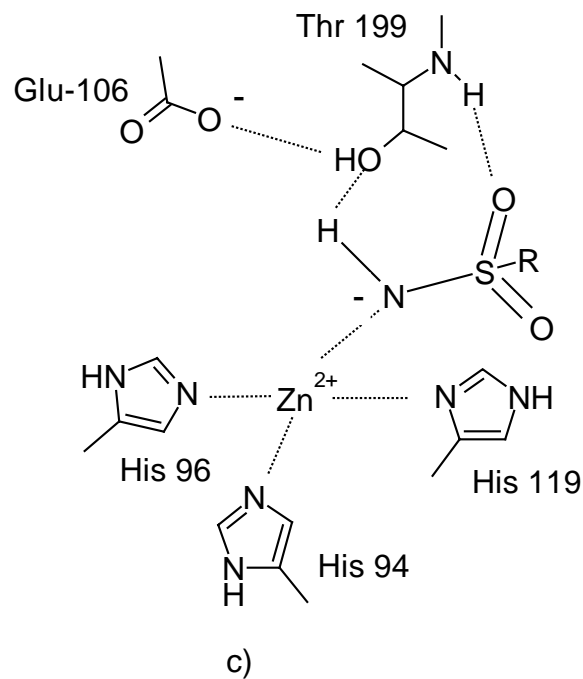


Die zweite, ungeladene Aminogruppe des Sulfamids formt eine Wasserstoffbrücke zu einem Wassermolekül, welches selber in einem Wasserstoffbrücken-Netzwerk mit drei weiteren

Wassermolekülen in der Bindetasche eingebettet ist. Zusätzlich bildet diese Gruppe eine weitere, schwache Wasserstoffbrücke zur Hydroxylgruppe von Thr-200 und zu einem weiteren Wassermolekül aus.



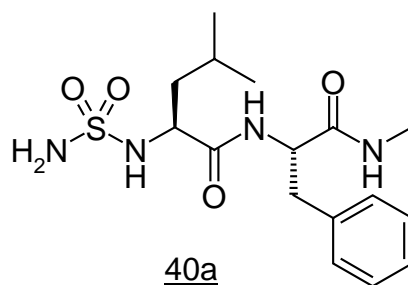
[7.4.2.]



Sulfamid selbst ist ein schwacher Inhibitor ( $K_I = 35\mu\text{M}$  für CA I und  $82\mu\text{M}$  für CA II). Sulfonamide wie Acetazolamid oder Dorzolamid sind erheblich aktiver ( $K_I = 12\text{ nM}$  bzw.  $K_I = 9\text{ nM}$ ).

### 7.5. Synthese und biochemische Prüfung neuer Carboanhydraseinhibitoren mit N-Sulfamoyldipeptid-Struktur

Es lag nahe, das als potentiellen Hemmstoff für Matrixmetalloproteasen synthetisierte N-Sulfamoyldipeptid 40a (siehe Kap. 5.12.) aufgrund der Sulfamidstruktur auch gegen hCAI und hCA II zu testen.

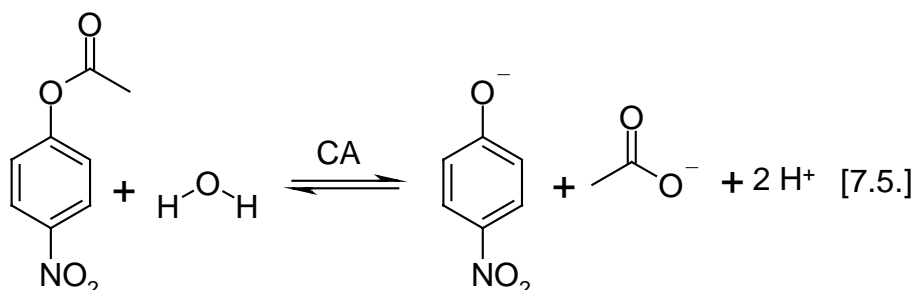


Wie aus der Röntgenkristallstruktur von Sulfamid mit hCA II bekannt ist (vgl. Kap. 7.4.) bietet das Sulfamid anion eine Reihe günstiger Kontakte mit der Bindetasche der Carboanhydrase. Weiterhin ist die unionisierte Amidgruppe auf den Ausgang des aktiven Zentrums gerichtet, wodurch es in einer günstigen Position für Derivatisierungen liegt, welche bereits durchgeführt wurden<sup>99</sup>.

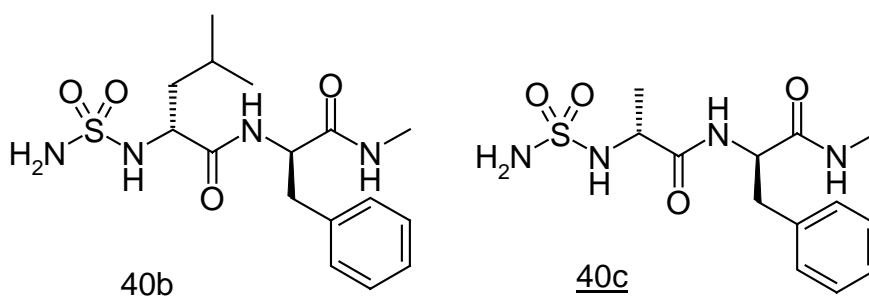
Der in dieser Arbeit verwendete *in vitro* Enzymassay zur Bestimmung von  $K_I$ -Werten beruht auf der Esteraseaktivität von hCA I und hCA II [7.5.]<sup>100</sup> und wurde von der Arbeitsgruppe Supuran bzw. von Alexander Weber in der AG Prof. Klebe durchgeführt, denen ich an dieser Stelle für die freundliche Zusammenarbeit danken möchte.

Der Assay beruht auf der CA-katalysierten Hydrolyse von farblosem p-Nitrophenolacetat [7.5.] als nicht natürlichem Substrat zu gelbem p-Nitrophenolat, welches bei 405 nm mit einem UV-Spektrometer photometrisch vermessen wird. Dieser kompetitive Assay wird durch Zugabe von p-Nitrophenolacetat zu einem präinkubierten Enzym-Inhibitor-Komplex

gestartet. Je nach Affinität des Inhibitors verläuft die Umsetzung von p-Nitrophenolacetat zeitlich verzögert ab.



Leider ergab sich aufgrund eines Tippfehlers bei der biochemischen Prüfung von 40a in der Arbeitsgruppe Supuran gegen hCA I und hCA II zunächst eine Aktivität im nanomolaren Bereich. Daraufhin synthetisierte ich das zu 40a enantiomere N-Sulfamoyldipeptid 40b, in dem die beiden Aminosäuren Leucin und Phenylalaninmethylamid in der D-Konfiguration vorliegen. In gleicher Weise wurde aus D-Alanin und D-Phenylalaninmethylamid das N-Sulfamoyldipeptid 40c hergestellt (vgl. Kap. 5.12.).



Bei der biochemischen Prüfung dieser N-Sulfamoyldipeptide ergaben sich  $K_1$ -Werte nur im mikromolaren Bereich. Dies traf auch bei erneuter Prüfung auf 40a zu (vgl. Kap. 5.12.).

Somit ist durch die Verknüpfung mit dem Dipeptidgerüst keine Verschlechterung der Aktivität im Vergleich zum Sulfamid eingetreten. Eine mögliche Ursache könnte darin bestehen, dass bei 40a, 40b und 40c die Sulfamidgruppe mit einem aliphatischen Rest verknüpft ist. Es wäre daher von Interesse, auch die in Kap. 5.14. beschriebenen Strukturen 48-54 mit einem N-Sulfamoylimid-Rest auf ihre Wirkung an Carboanhydrasen zu überprüfen.

## 8. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung neuer Hemmstoffe der Zinkendoproteasen Thermolysin (TLN) und der Matrixmetalloproteasen (MMP's). Sie katalysieren die Spaltung einer Amidbindung innerhalb eines Proteins. Wichtig für den katalytischen Mechanismus ist dabei das Vorhandensein des Übergangsmetalls Zink als  $Zn^{2+}$  im aktiven Zentrum, welches ein Wassermolekül polarisiert und somit für den nukleophilen Angriff auf die zu spaltende Amidbindung vorbereitet.

TLN ist ein Enzym von *Bacillus proteolyticus* und besitzt selbst keine humanpathogenen Eigenschaften. Die Struktur seiner Bindetasche ähnelt jedoch der der MMP's, was Untersuchungen an ihm rechtfertigt. Daneben ist es gut verfügbar und lässt es sich leicht kristallisieren.

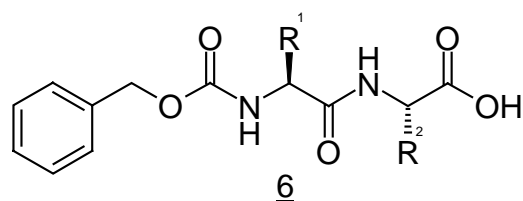
Die MMP's kommen in der extrazellulären Matrix vor, wo sie deren Bestandteile abbauen. Sie spielen somit eine Rolle bei Prozessen, die mit dem Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix einhergehen, wie z.B. der Embryonalentwicklung, der Wundheilung oder anderer Bindegewebe.

Im Körper werden sie normalerweise über Transkription, Ausscheidung als inaktive Enzymvorstufen und durch körpereigene Inhibitoren (TIMP's) streng reguliert. Störungen dieses Gleichgewichts werden mit Krankheiten in Verbindung gebracht, die mit einem erhöhten Abbau der extrazellulären Matrix einhergehen, wie z.B. Arthritis, Tumorwachstum u.a..

Ein großer Teil von Inhibitoren dieser Zinkendoproteasen folgt einem Substrat-basiertem Ansatz. Dabei wird von der Struktur des natürlichen Substrats der Enzyme ausgegangen und die zu spaltende Amidgruppe (Peptidbindung) durch eine Zink-bindende Gruppe ersetzt.

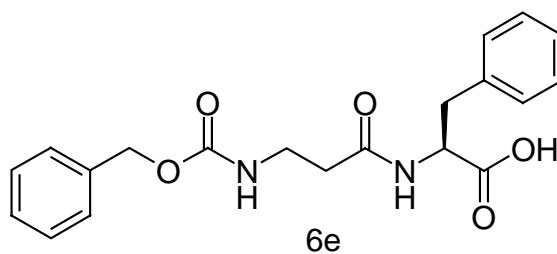
Diesem Ansatz folgend bestand meine Aufgabe darin, ein Dipeptid als Grundgerüst mit solchen funktionellen Gruppen zu verknüpfen, die Zink-bindende Eigenschaften erwarten ließen. Diese sollten vorzugsweise auf bisher nicht untersuchten S-/N-funktionellen Strukturen basieren.

Für die Entwicklung des Dipeptid-Grundgerüsts synthetisierte ich eine Reihe von N-Z-geschützten Dipeptiden des Typs 6.

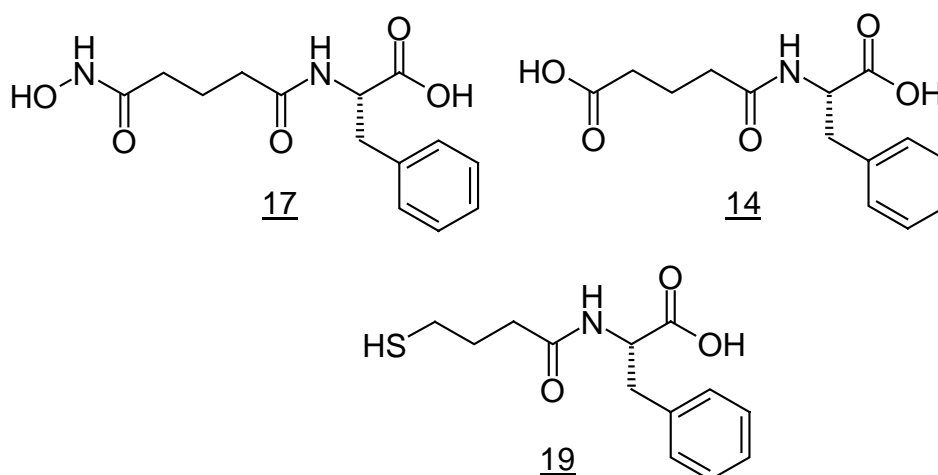


Für R<sup>1</sup> wurden die Aminosäurereste von L-Leucin, 3-Cyclohexylalanin (als sterisch anspruchsvoller Rest) und β-Alanin (als sterisch nicht anspruchsvoller Rest) eingesetzt. Für R<sup>2</sup> wurden die Aminosäurereste von L-Phenylalanin und L-Tryptophan gewählt.

Die biochemische Prüfung von 6e an den MMP's 1,2,8 und 9 lieferte IC<sub>50</sub>-Werte im mikromolaren Bereich.

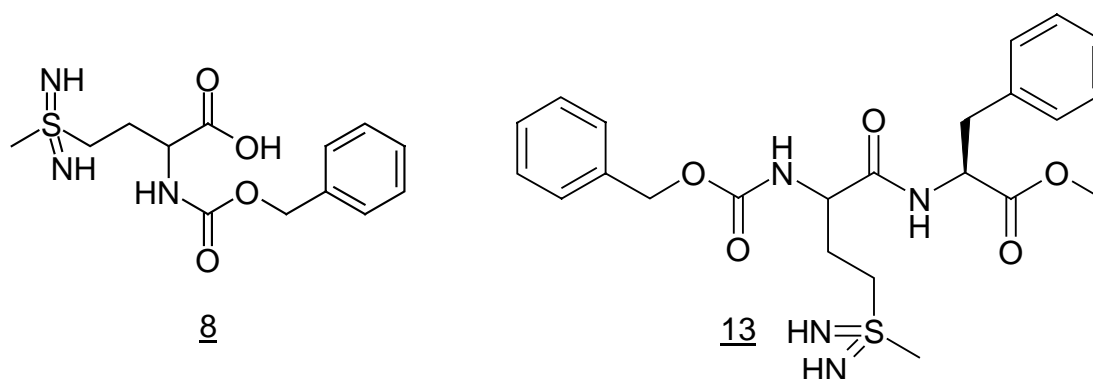


Ausgehend von diesem Ergebnis wurden die Hydroxamsäure 17, die Carbonsäure 14 und das Thiol 19 synthetisiert. Analog zu 6e ist die Zink-bindende Gruppe bei diesen mit L-Phenylalanin über einen beweglichen Linker verknüpft.



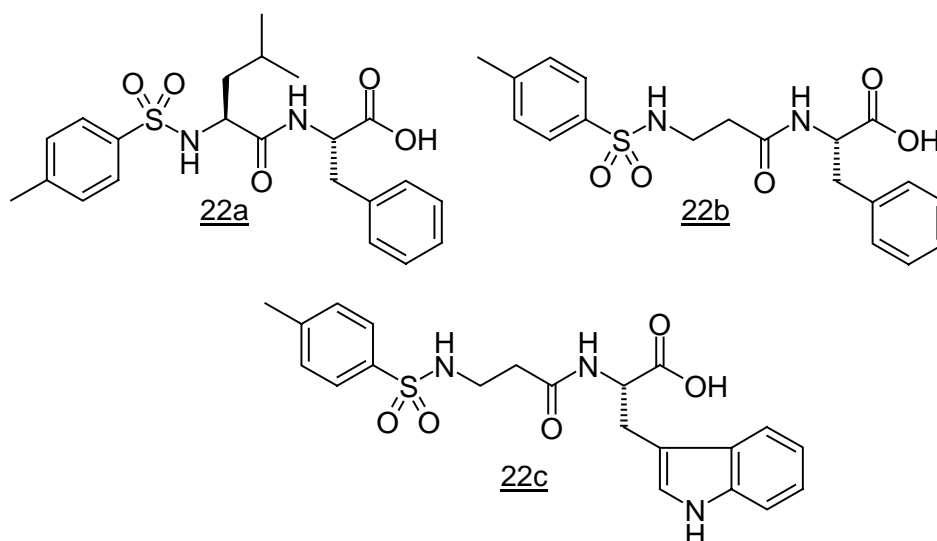
14 zeigte im biochemischen Test gegenüber den MMP's eine 6e vergleichbare Wirkung. 19 und 17 zeigten eine ca. um den Faktor 2 verbesserte Wirkung, diese lag jedoch noch im mikromolaren Bereich.

Um die Sulfodiimidfunktion als Zink-bindende Gruppe einzuführen, versuchte ich zunächst das freie Methioninsulfodiimid als Aminosäurebaustein zu gewinnen. Dabei gelang die Synthese von bisher noch nicht beschriebenem N-Z-Methioninsulfodiimid 8. Die Abspaltung der Schutzgruppe schlug fehl, ebenso die Versuche, über alternative Schutzgruppen zum freien Methioninsulfodiimid zu gelangen. Es gelang jedoch, die Sulfodiimidfunktion direkt in das Z-geschützte Dipeptid N-Z-Met-L-PheOMe einzuführen und 13 zu erhalten.



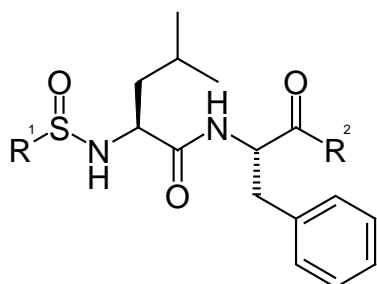
8 und 13 zeigten gegenüber Thermolysin keine inhibitorische Wirkung. Untersuchungen an MMP's stehen aus.

Weiterhin wurde eine Reihe von N-Tosyldipeptiden 22a-c hergestellt, um die Sulfonamidgruppe als mögliche Zink-bindende Gruppe einzuführen.



Die biochemische Prüfung an den MMP's ergab  $IC_{50}$ -Werte im mikromolaren Bereich (vergleichbar mit 6e). Der Vergleich von 22b mit 22c zeigt, dass der Austausch von Phenylalanin gegen Tryptophan zu einer etwas verbesserten Wirkung führt.

Als Variation der Sulfonamidgruppe wurden daraufhin die N-Arensulfonyldipeptide 24a, 24b und 25 hergestellt.



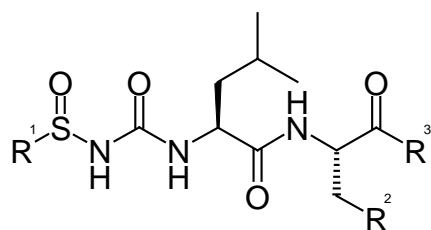
24a:  $R^1 = \text{Phenyl}$ ,  $R^2 = \text{OBz}$

24b:  $R^1 = 4\text{-Methylphenyl}$ ,  $R^2 = \text{OBz}$

25:  $R^1 = 4\text{-Methylphenyl}$ ,  $R^2 = \text{NHMe}$

Diese zeigten jedoch im biochemischen Test gegenüber Thermolysin und den Matrixmetalloproteasen leider keine hemmende Wirkung. Eine mögliche Ursache könnte die geringere NH-Acidität der Sulfinamidfunktion sein ( $pK_s \sim 18\text{-}21$ ).

Als weitere potentielle Zink-bindende Gruppe wurde die Sulfinylharnstoffgruppe mit einem Dipeptidgerüst verknüpft mit dem Ziel, die NH-Acidität zwischen der Sulfinyl- und der Carbonylfunktion zu steigern. Dabei wurden die Strukturen 28a-e synthetisiert.



28a: R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = Phenyl, R<sup>3</sup> = NMe

28b: R<sup>1</sup> = 4-Methylphenyl, R<sup>2</sup> = Phenyl, R<sup>3</sup> = NMe

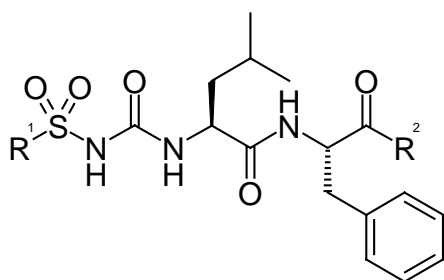
28c: R<sup>1</sup> = Phenyl, R<sup>2</sup> = Indolyl, R<sup>3</sup> = NMe

28d: R<sup>1</sup> = 4-Methylphenyl, R<sup>2</sup> = Indolyl, R<sup>3</sup> = NMe

28e: R<sup>1</sup> = 4-Methylphenyl, R<sup>2</sup> = Phenyl, R<sup>3</sup> = OBz

Der IC<sub>50</sub>-Wert von 28b betrug im Test gegenüber der katalytischen Domäne von MMP-8 40,8 μM.

Davon ausgehend boten sich weitere Variationen der Sulfinylharnstoffgruppe am Schwefel an. So wurden die durch Oxidation am Schwefel sich ableitenden Arensulfonylharnstoffe 29a-c synthetisiert.

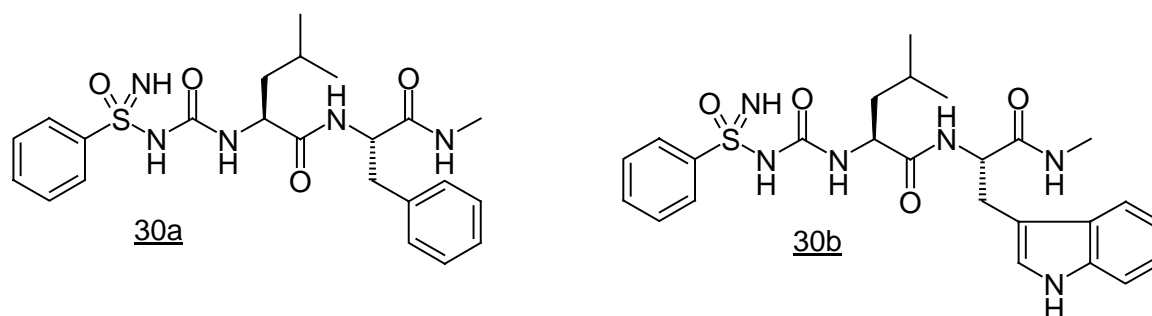


29a: R<sup>1</sup> = Phenyl, R<sup>2</sup> = NMe

29b: R<sup>1</sup> = 4-Methylphenyl, R<sup>2</sup> = NMe

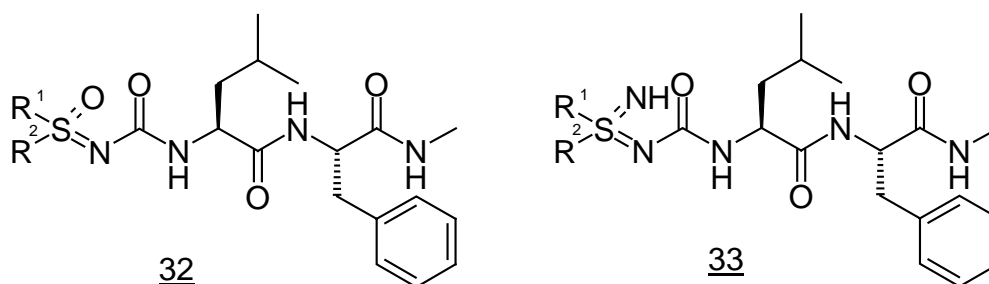
29c: R<sup>1</sup> = 4-Methylphenyl, R<sup>2</sup> = OBz

Leider zeigten die Arensulfonylharnstoffe weder gegenüber Thermolysin noch gegenüber den MMP's eine hemmende Wirkung. Möglicherweise ist dies auf die erheblich stärker aciden Eigenschaften der Sulfonylharnstoffgruppe (pK<sub>S</sub> ~ 5-7) zurückzuführen. Durch den formalen Austausch von Sauerstoff am Schwefel gegen eine NH-Funktion im Sinne der Arensulfonamidimidharnstoffe 30a und 30b sollte die Acidität gesenkt werden (pK<sub>S</sub> ~ 9-11). 30a und 30b wurden durch oxidative Aminierung aus den entsprechenden Sulfinylharnstoffen synthetisiert.



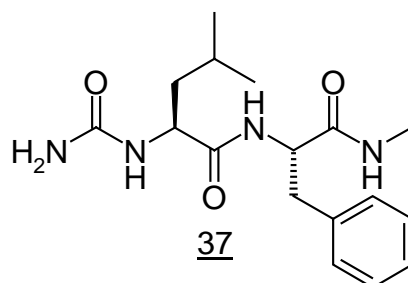
Im pharmakologischen Test zeigte nur **30a** eine schwache Hemmwirkung von 800  $\mu\text{M}$  gegenüber Thermolysin. Weitergehende Tests an MMP's stehen aus.

Als weitere Variation der Sulfinylharnstoffgruppe wurden auch Sulfoximin- und Sulfodiiminharnstoff-Dipeptide vom Typ **32** bzw. **33** hergestellt, bei denen der azalogen Sulfonstickstoff in die Harnstoffstruktur einbezogen ist.



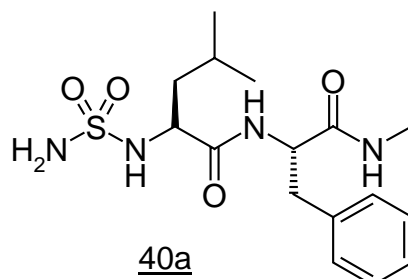
Leider zeigten die dargestellten Substanzen weder eine Hemmwirkung gegenüber Thermolysin noch gegenüber den Matrixmetalloproteasen.

Daraufhin wurde der Dipeptidharnstoff **34** synthetisiert, um festzustellen, ob **28b** auch ohne Arensulfinylrest hemmend auf die Matrixmetalloproteasen wirkt.



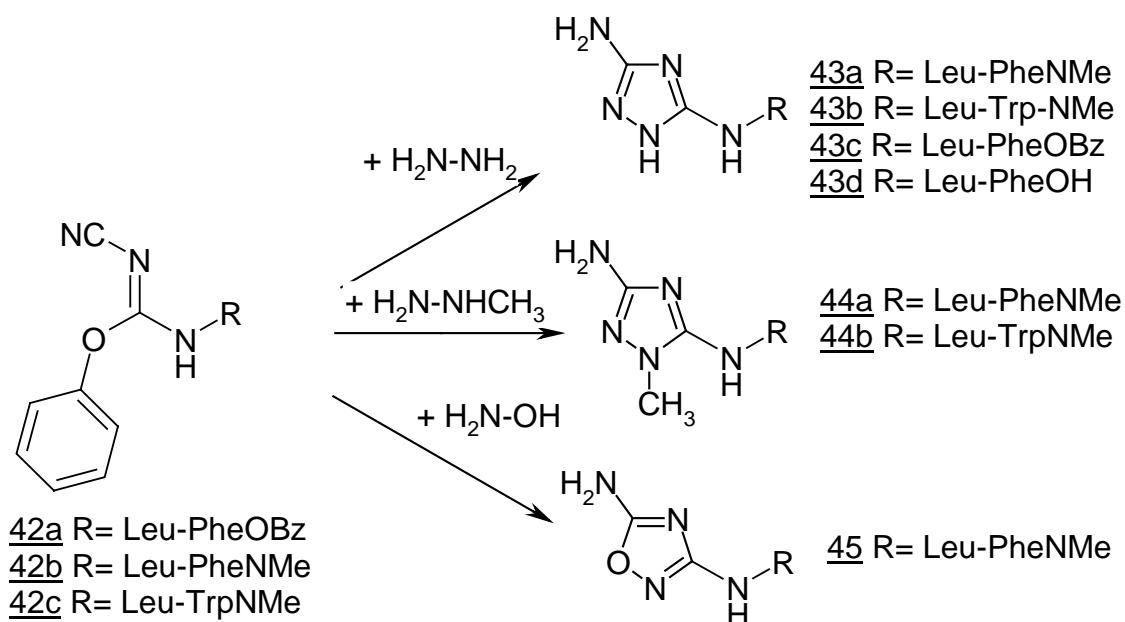
Da **37** keine Wirkung gegenüber Thermolysin und den MMP's aufwies, ist für die bindenden Eigenschaften im aktiven Zentrum der MMP's offensichtlich nur der Arylsulfinylrest in Verbindung mit der Harnstoffstruktur (wie im Fall von **28b**) geeignet.

Als weiteres Ziel wurde die Harnstoffgruppe in 37 durch die Sulfamidgruppe ersetzt, in der anstatt der planaren Anordnung der Substituenten am Carbonylkohlenstoff eine tetraedrische Anordnung der Substituenten am Schwefel vorliegt.

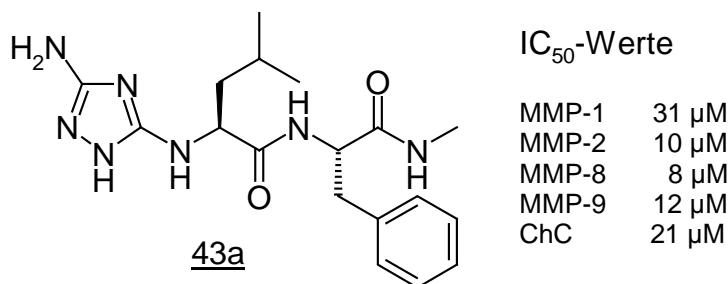


40a zeigte im pharmakologischen Test zwar keine Aktivität gegenüber Thermolysin oder den Matrixmetalloproteasen, wies aber eine schwache Hemmwirkung gegenüber den humanen Carboanhydrasen (hCA) I und II auf ( $K_i = 124 \mu\text{M}$  für hCA I,  $K_i = 75 \mu\text{M}$  für hCA II).

Zur Synthese stickstoffhaltiger Heterocyclen mit möglichen Zink- komplexierenden Eigenschaften wurden verschiedene Dipeptidbausteine mit N-Cyaniminokohlensäure-di-phenylester zu den Isoharnstoffen vom Typ 42 kondensiert. Diese wurden weiter zu den N-Azol-Dipeptiden 43-45 umgesetzt.

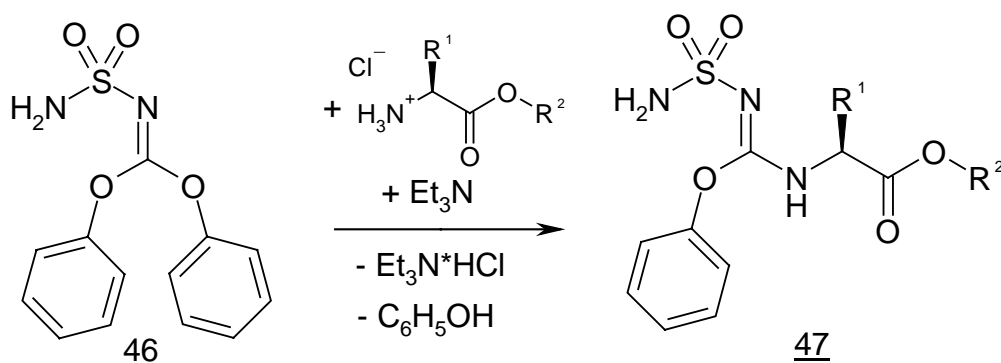


43a zeigte bei den biochemischen Tests eine relativ gute Hemmwirkung gegenüber den MMP's, die zu weiteren Untersuchungen Anlass geben sollte.

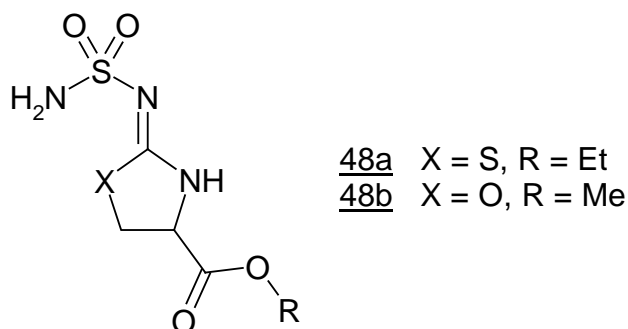


Die erfolgreichen Umsetzungen von Peptidbausteinen mit N-Cyaniminodiphenylcarbonat wurden in analoger Weise auf den N-funktionalisierten Iminokohlensäureester Diphenyl-N-sulfamoyl-imidocarbonat **46** (DIPHSAIC) übertragen.

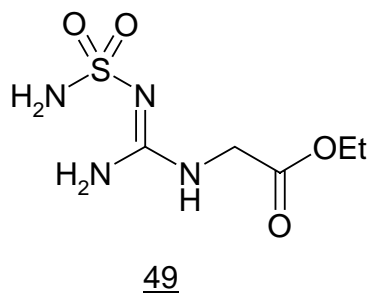
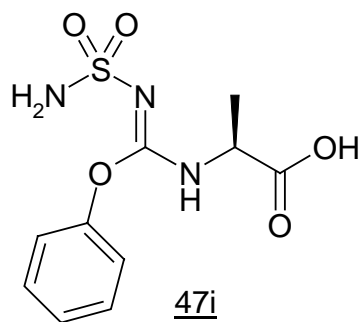
Zunächst wurde das Reaktionsverhalten von DIPHSAIC gegenüber N-Nucleophilen an einigen Aminosäuren studiert. Dazu wurde **46** mit verschiedenen Aminosäureestern zu den Isoharnstoffen vom Typ **47** kondensiert.



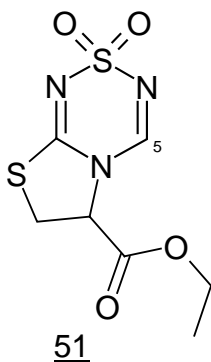
Bei der Umsetzung von **46** mit Serinmethylester und Cysteinethylester als Bis-Nucleophile trat Cyclisierung unter Substitution beider Phenoxyreste zu **48a-b** auf.



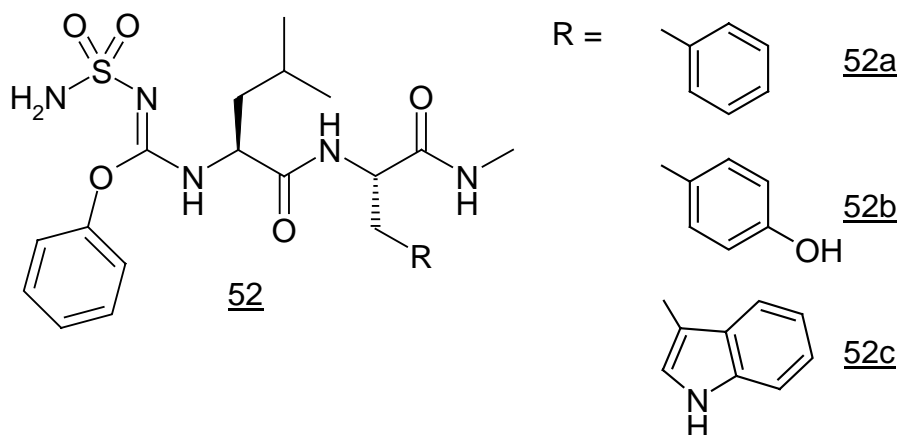
Die Verseifung der Esterfunktion der Isoharnstoffe gelang nur für den t-Butylester unter sauren Bedingungen mit Trifluoressigsäure zur freien Carbonsäure **47i**. Bei der Ammonolyse eines Isoharnstoffs gelang die Substitution des Phenoxyrests durch Ammoniak unter schärferen Reaktionsbedingungen zu **49**, die Esterfunktion blieb unberührt.



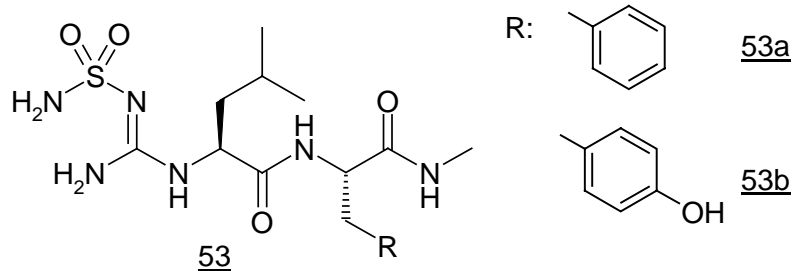
Weiterhin konnte 48a mit Orthoameisensäureester zum 1,2,4,6-Thiatriazin-1,1-dioxid 51 cyclisiert werden.



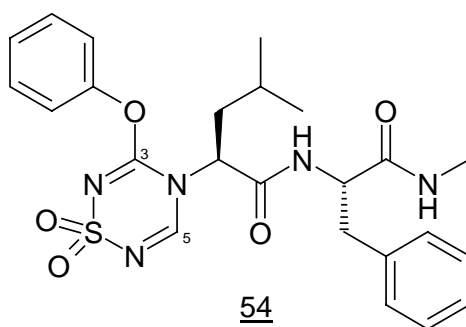
Die an den Umsetzungen von DIPHSAIC mit Aminosäureestern gewonnenen Erfahrungen wurden auf die Verknüpfung mit Dipeptidstrukturen übertragen. So konnten analog der Darstellung von 47 die Isoharnstoffe 52a-c gewonnen werden.



Durch Ammonolyse von 52a und 52b wurden 53a und 53b erhalten.



**52a** wurde analog **51** mit Orthameisensäureester zu 1,2,4,6-Thiatrazin-1,1-dioxid-Dipeptid **54** cyclisiert.



Die hergestellten Substanzen ließen gegenüber Thermolysin keine Wirkung erkennen. Gegenüber Matrixmetalloproteasen liegen noch keine Untersuchungen vor.

In der vorliegenden Arbeit gelang die Synthese neuartiger Inhibitoren der Zinkendoproteasen TLN und MMP's sowie Carboanhydrasen (hCA I und hCA II) mit Wirkungen im mikromolaren Bereich. Trotz teilweise noch fehlender Testergebnisse geben bereits einige Strukturen Anlass zu vertieften Untersuchungen.

# **Experimenteller Teil**

### Allgemeine Angaben

Es wurden handelsübliche **Lösungsmittel** verwendet, die, soweit erforderlich, nach allgemein üblichen Laboratoriumsmethoden gereinigt und getrocknet wurden.

**Reaktionen unter Inertgas** (Stickstoff, Argon) wurden in ausgeheizten und unter Inertgas abgekühlten Apparaturen durchgeführt.

**Dünnschichtchromatographische Reaktionskontrollen** wurden mit DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub> der Firma Merck sowie Macherey und Nagel vorgenommen.

Zur säulenchromatographischen Aufreinigung (meist Flash-Chromatographie<sup>101</sup>) wurde Kieselgel 60 der Korngrößen 0,063-0,200 mm (Firma Merck) bzw. 0,050-0,100 mm (Macherey & Nagel) als stationäre Phase verwendet. Es kamen Glassäulen mit 2 bis 6cm Durchmesser und einer Füllhöhe bis zu 20 cm zum Einsatz.

Die **Ausbeuteangaben** beziehen sich auf die ausgefällten, umkristallisierten oder säulenchromatographisch isolierten Produkte.

Die **Schmelzpunkte** wurden nach der Kapillarmethode mit einem Bestimmungsgerät nach Lindström ermittelt und sind unkorrigiert wiedergegeben.

**Elementaranalysen** wurden mit einem CH-Analyser nach Dr. Salzer der Firma Labormatic/Wösthoff und einem CHN-Autoanalyser 185 der Firma Hewlett-Packard (nur für N-Analysen) ausgeführt. Die Schwefelbestimmung erfolgte nach der Schöniger-Methode. Die Angabe aller ermittelten Werte erfolgt in Prozentzahlen (%).

Massenspektrometrische Bestimmungen (MS) und hochaufgelöste Massenspektrometrie (HRMS) wurden mit einem doppelfokussierenden Sektorfeld-Massenspektrometer vom Typ VG 7070 H der Firma Vacuum Generators oder einem doppelfokussierenden Sektorfeld-Massenspektrometer mit EBE-Geometrie vom Typ VG-AutoSpec der Firma Micromass vorgenommen. Die Datenaquisition erfolgte mit dem Datensystem „Vektor 1“ der Firma Teknivent Corp.. Angegeben sind Molekülion (M<sup>+</sup>), Proben temperatur (PT) und einige

charakteristische Bruchstücke ( $m/z = \text{Masse/Ladungsverhältnis}$ ) sowie deren relative Intensität in Prozent, bezogen auf den Basispeak. Die Ionisation erfolgte durch Elektronenstoß (EI, 70eV) oder Elektrospray-Ionisation (ESI).

**Infrarotspektroskopie (IR)** erfolgte mit dem FT-IR-Spektrometer 510 P der Firma Nicolet. Die Verbindungen wurden als IR-Preßling oder als Film zwischen NaCl-Platten vermessen. Die Bandenlagen sind in  $\text{cm}^{-1}$  angegeben und durch die Zusätze s (strong), m, (medium) und w (weak) gekennzeichnet.

Zur Aufnahme der  **$^1\text{H-NMR}$ -** und  **$^{13}\text{C-NMR-Spektren}$**  wurden folgende Geräte verwendet:

Jeol JNM-GX 400  $^1\text{H}$ : 399.79 MHz („400“),  $^{13}\text{C}$ : 100.54 MHz („100.5“)

Jeol Lambda 500 delta  $^1\text{H}$ : 500.00 MHz („500“),  $^{13}\text{C}$ : 125.65 MHz („125.7“)

Die Angaben der chemischen Verschiebung beziehen sich auf Tetramethylsilan (TMS = 0.00 ppm) oder die deuterierten Lösungsmittel als internen Standard und erfolgen mit Hilfe der  $\delta$ -Skala in ppm.

Die angegebenen Werte der Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben, stellen Beträge dar und sind mit einem Fehler behaftet (z.B. +/- 0.2 Hz bei 400 MHz).

Für die Kopplungsmuster werden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett, brs = Breites Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, t = Triplett, dt = Doppeltriplett, q = Quartett, qin = Quintett, m = Multipllett.

Werte, bei denen die Zuordnung nicht gesichert ist, sind mit einem \* gekennzeichnet.

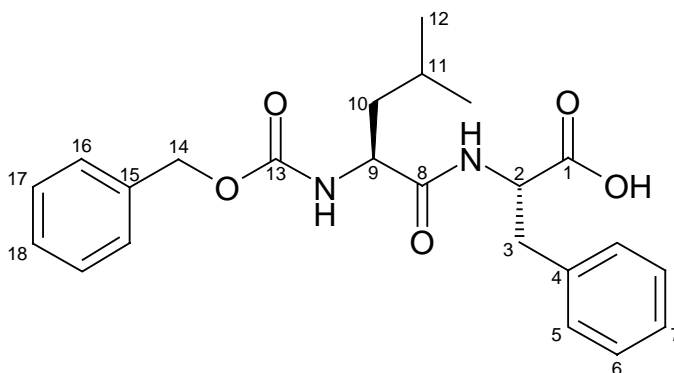
Bei den  $\alpha$ -Aminosäureresten wird das chirale Kohlenstoffatom bei der Zuordnung als C\* dargestellt.

Die Spektrenbearbeitung erfolgte mit dem NMR-Data-Processing Programm Win.Nuts (2D-Version 5.097) der Firma Acron NMR Inc. Freemont, CA, USA, auf einem PC.

Die Abschätzung der chemischen Verschiebung erfolgte mit gebräuchlichen Inkrementsystemen.

**Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Verseifung von Carbonsäuremethylestern (AAV1):**

Der Carbonsäureester wird in einer ausreichenden Menge Methanol gelöst und nach Zugabe von einem Äquivalent 1 N Lithiumhydroxidlösung so lange bei Raumtemperatur gerührt, bis die Reaktion beendet ist (DC). Anschließend wird Wasser hinzugefügt und das Methanol am Rotavapor entfernt. Die verbleibende alkalische Lösung wird mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird verworfen. Anschließend wird die wässrige Phase mit 1 N Salzsäure auf pH 2 eingestellt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotavapor wird der Rückstand aus einem geeignetem Lösungsmittel umkristallisiert.

**N-Benzoyloxycarbonyl-L-leucyl-L-phenylalanin (6a)**

**Ansatz:** 341 mg Z-Leu-Phe-OMe (0.8 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Ethanol

**Ausbeute:** 225 mg (68% d. Th.)

**Fp.:** 98° - 100°C (Ethanol)

**EA:** C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [412.49]

ber.: C: 66.97 %      H: 6.84 %      N: 6.79 %

gef.: C: 66.66 %      H: 6.78 %      N: 6.75 %

**MS** (EI, 70 eV, PT = 150°C):

m/z (%) = 412 (M<sup>+</sup>, 2), 394 (16), 220 (10), 176 (18), 120 (9), 108 (12), 104 (16), 92 (21),  
91 (100), 87 (45), 65 (19), 44 (37)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.0°C, 500MHz):

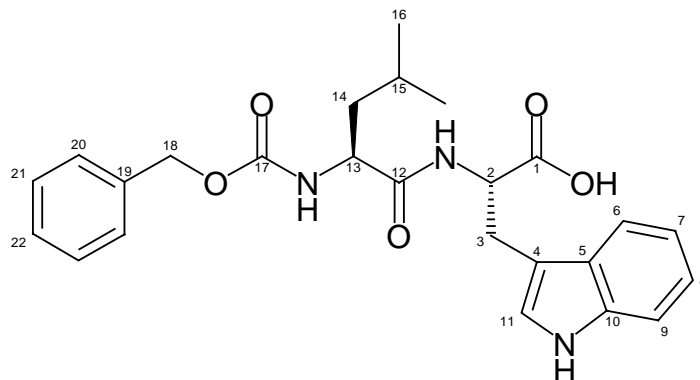
δ<sub>H</sub> (ppm) = 7.99 (d, 1H, NH, J= 7.8 Hz), 7.37 – 7.16 (m, 10H, Aromat-H), 5.01 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 4.45 – 4.41 (m, 1H, PheC\*H), 4.04 – 4.02 (m, 1H, LeuC\*H), 3.04 (dd, 1H, PheC\*HCHH', A-Teil eines ABX- Systems, J<sub>AX</sub>= 5.0 Hz, J<sub>AB</sub>= 13.7 Hz), 2.91 (dd, 1H, PheC\*HCHH', B-Teil eines ABX- Systems, J<sub>BX</sub>= 8.7 Hz, J<sub>AB</sub>= 13.7 Hz), 1.57 – 1.53 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.40 – 1.34 (m, 2H, LeuC\*HCH<sub>2</sub>), 0.83 (qa, 6H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, J= 6.6 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.0°C, 500MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 172.6/172.0 (C1/C8\*), 155.7 (C13), 137.3 (C4), 137.0 (C15), 129.0 (C5), 128.2 (C17), 128.0 (C6), 127.6/127.5 (C16/C18\*), 126.3 (C7), 65.3 (C14), 53.1/53.0 (C2/C9\*), 40.7 (C10), 36.6 (C4), 24.0 (C11), 22.8 (C12), 21.4 (C12')

**IR** (KBr):

ν (cm<sup>-1</sup>) = 3325m, 3298m, 2958w, 1715m, 1665s, 1537m, 1455w, 1239w, 1120w,  
1046w, 746w, 699w, 530w, 494w, 480w

**N-Benzoyloxycarbonyl-L-leucyl-L-tryptophan (6b)**

**Ansatz:** 466 mg Z-Leu-TrpOMe (1 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Ethanol

**Ausbeute:** 318 mg (70.4 % d. Th.)

**Fp.:** 166°C

**EA:** C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> [451.52]

ber.: C: 66.50 %    H: 6.47 %    N: 9.31 %

gef.: C: 66.09 %    H: 6.35 %    N: 9.12 %

**MS** (EI, 70eV):

m/z (%) = 451 (M<sup>+</sup>, 3), 187 (20), 130 (58), 108 (54), 107 (50), 91 (70), 79 (54), 78 (33),  
77 (52), 65 (28), 51 (45), 50 (32), 44 (100)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.1°C, 400MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 10.80 (s, 1H, NH), 7.96 (d, 1H, NH), 7.52 – 7.51 (d, 1H, Indol-C6-H), 7.33 – 7.31 (m, 6H, Indol-C9-H und Phenyl-H), 7.07 – 7.03 (m, 2H, Indol-C8-H und Indol-C7-H), 6.98 – 6.96 (m, 1H, Indol-C11-H), 5.02 – 5.01 (m, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 4.49 – 4.45 (m, 1H, TrpC\*-H), 4.11 – 4.02 (m, 1H, LeuC\*-H), 3.28 – 3.03 (m, 2H, TrpC\*HCH<sub>2</sub>), 1.56 – 1.52 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.42 – 1.38 (m, 2H, LeuC\*HCH<sub>2</sub>), 0.86 – 0.82 (m, 6H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

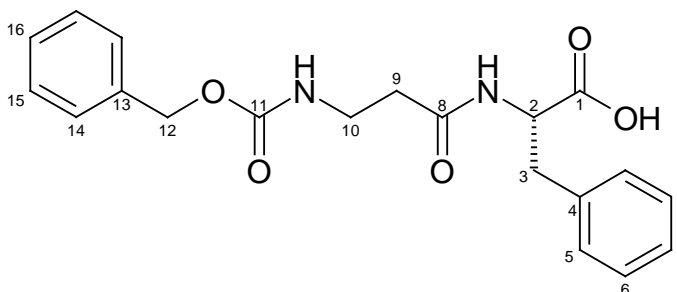
<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.1°C, 400MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 173.0/171.9 (C1/C12\*), 156.1 (C17), 137.0 (C19), 136.0 (C10), 128.2 (C21), 127.6/127.5/127.2 (C22/C20/C5\*), 123.5 (C11), 120.8 (C7), 118.2 (C6), 118.1 (C8), 111.2 (C9), 109.5 (C4), 65.3 (C18), 52.8/52.7 (C2/C13\*), 40.6 (C14), 26.9 (C3), 24.0 (C15), 22.9 (C16), 21.3 (C16')

IR (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3376s, 3034w, 2944m, 1710s, 1659s, 1533s, 1455m, 1437m, 1338w, 1230s, 1179m, 1101w, 1038w, 888w, 843w, 807w, 741m, 693w, 582w, 528w

**N-Benzylloxycarbonyl- $\beta$ -alanyl-L-phenylalanin (6e)**



**Ansatz:** 192 mg Z- $\beta$ -Ala-PheOMe (0.5 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Ethylacetat

**Ausbeute:** 176 mg (95% d. Th.)

**Fp.:** 158°C (Ethylacetat)

**EA:** C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [370.41]

ber.: C: 64.85 %    H: 5.99 %    N: 7.56 %

gef.: C: 64.55 %    H: 5.92 %    N: 7.42 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 250°C):

m/z (%) = 370 (M<sup>+</sup>, 1), 149 (20), 108 (59), 107 (56), 104 (29), 91 (100), 79 (61), 78 (32),  
77 (57), 65 (32), 51 (45), 44 (63)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.0°C, 500.1 MHz):

δ<sub>H</sub> (ppm) = 8.17 (d, 1H, NH, J= 8.2 Hz), 7.37 – 7.16 (m, 10H, Phenyl-H), 7.05 (d, 1H, NH, J= 5.7 Hz), 4.99 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 4.44 -4.39 (m, 1H, PheC\*H), 3.14 – 3.10 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 3.03 (dd, 1H, PheC\*HCH', A-Teil eines ABX- Systems, J<sub>AX</sub>= 5.0 Hz, J<sub>AB</sub>= 14.0 Hz), 2.84 (dd, PheC\*HCH', B-Teil eines ABX-Systems, J<sub>BX</sub>= 9.4 Hz, J<sub>AB</sub>= 13.7 Hz), 2.30 – 2.21 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO)

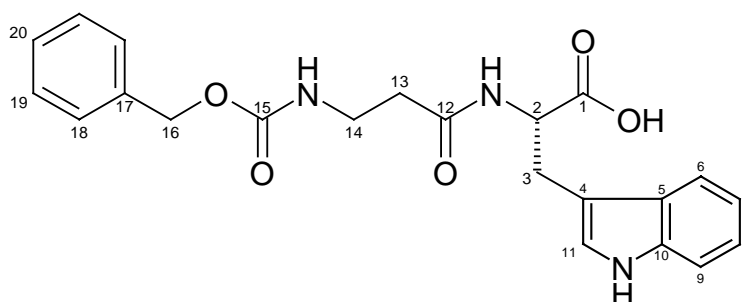
**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 35.0°C, 500MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 172.9/170.1 (C1/C8\*), 155.8 (C11), 137.6 (C4), 137.1 (C13), 128.9 (C5), 128.2 (C15), 128.0 (C6), 127.6/127.5 (C14/C16\*), 126.3 (C7), 65.1 (C12), 53.3 (C2), 36.9 (C9), 36.7 (C3), 35.3 (C10)

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>)= 3395m, 3296m, 3081w, 3030w, 2937w, 1711s, 1612m, 1564m, 1526m, 1455w, 1265m, 1247m, 1138w, 1066w, 1017w, 751w, 700m, 545w

**N-Benzoyloxycarbonyl- $\beta$ -alanyl-L-tryptophan (6f)**



**Ansatz:** 254 mg Z- $\beta$ -Ala-TrpOMe (0.6 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Ethylacetat

**Ausbeute:** 157 mg (64% d. Th.)

**Fp.:** 194°C (Ethylacetat)

**EA:** C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> [409.45]

ber.: C: 64.54 %    H: 5.66 %    N: 10.26 %

gef.: C: 64.39 %    H: 5.92 %    N: 10.33 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 250°C):

m/z (%) = 409 (M<sup>+</sup>, 4), 391 (12), 365 (3), 187 (19), 130 (62), 108 (56), 91 (81), 79 (59), 78 (32), 77 (51), 65 (34), 44 (100)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 400MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 8.11 (s, 1H, NH), 7.49 – 7.44 (m, 1H, Indol-C6-H), 7.33 – 7.26 (m, 6H, Indol-C9-H und Phenyl-H), 7.14 – 7.12 (m, 1H, Indol-C8-H), 7.08 – 7.04 (m, 1H, Indol-C7-H), 6.92 (s, 1H, Indol-C11-H), 6.63 (s, 1H, NH), 5.18 (d, 1H, NH,  $J = 5.2$  Hz), 5.06 – 4.94 (m, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 4.89 – 4.85 (m, 1H, TrpC\*-H), 3.30 – 3.23 (m, 2H, TrpC\*H-CH<sub>2</sub>), 3.14 – 3.10 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.30 – 2.21 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 400MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 173.0/171.9 (C1/C12\*), 156.1 (C15), 137.0 (C17), 136.0 (C10), 128.2 (C19), 127.6 (C20), 127.5 (C18), 127.2 (C5), 123.5 (C11), 120.8 (C7), 118.2 (C6), 118.1 (C8), 111.2 (C9), 109.5 (C4), 65.3 (C16), 52.8 (C2), 36.9 (C13), 35.3 (C14), 26.9 (C3)

IR (KBr):

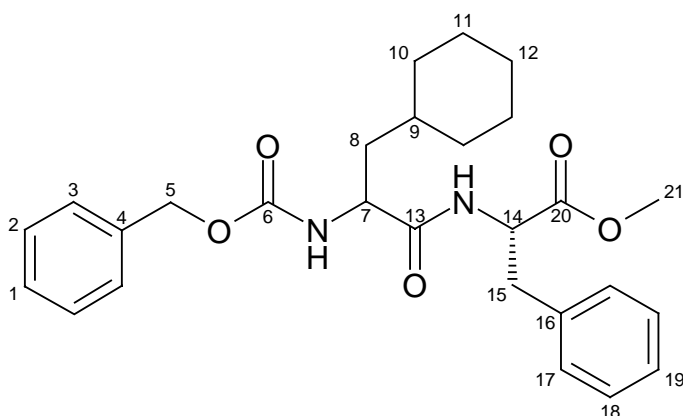
$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3395m, 3296m, 2930w, 1711s, 1611m, 1564m, 1526m, 1455w, 1265m, 1247m, 1138w, 1066w, 1017w, 880w, 751w, 700m, 545w, 530w,

**Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Säure-Aktivierung von Carbonsäuren als gemischtes Anhydrid mit Chlorameisensäureisobutylester (AAV2):**

Die freie Säure wird unter Argon in einer ausreichenden Menge getrocknetem DMF gelöst bzw. suspendiert und nach Zugabe von 2-2.75 Äquivalenten N-Methylmorpholin (0.25 ml/mmol) auf -15°C abgekühlt. Anschließend wird ein Äquivalent Chlorameisensäureisobutylester (0.13 ml/mmol Säure) zugegeben. Nach fünf Minuten wird zu dieser Mischung eine Lösung eines Äquivalentes der Aminkomponente, in einer ausreichenden Menge getrocknetem DMF gelöst, gegeben. Die Reaktionslösung wird mehrere Stunden gerührt, wobei sie langsam Raumtemperatur erreicht. Anschließend wird der Ansatz in eine gerührte gesättigte Kochsalzlösung (400-800 ml) gegossen. Die wässrige Lösung wird mit Ethylacetat dreimal extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden mit 2 N Zitronensäure, gesättigter

Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Der nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer verbleibende Rückstand wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt.

**N-Benzoyloxycarbonyl-3-cyclohexylalanyl-L-phenylalaninmethylester (6c/1)**



**Ansatz:** 611mg N-Z-3-Cyclohexylalanin (2 mmol)  
460mg L-Phenylalaninhydrochlorid (2 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Hexan/Ethylacetat (3+2)

**Ausbeute:** 450 mg (48% d. Th.)

**Fp.:** 79°C (Hexan/Ethylacetat)

**EA:**  $C_{27}H_{34}N_2O_5$  [466.58]

ber.: C: 69.51 %    H: 7.35 %    N: 6.00 %  
gef.: C: 69.44 %    H: 7.26 %    N : 6.06 %

**MS** (EI, 70 eV, PT = 150°C) :

m/z (%) = 466 (M<sup>+</sup>, 4), 407 (5), 315 (89), 150 (11), 108 (21), 104 (12), 92 (26), 91 (100),  
77 (15), 65 (19), 59 (36), 44 (20)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 19.6°C, 400MHz):

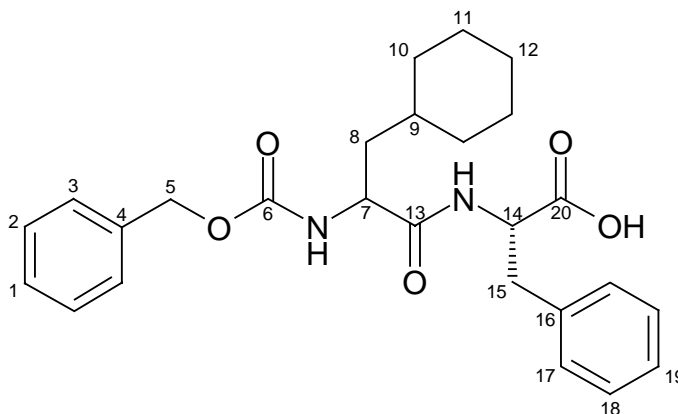
δ<sub>H</sub> (ppm) = 8.01 (d, 1H, NH, J= 7.8 Hz), 7.38 – 7.16 (m, 11H, Aromat-H und NH), 5.02 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 4.46 – 4.42 (m, 1H, PheC\*H), 3.72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>) 3.70 – 3.66 (m, 1H, C7-H), 3.05 (dd, 1H, PheC\*HCHH', A-Teil eines ABX-Systems, J<sub>AX</sub>= 5.0 Hz, J<sub>AB</sub>= 13.7 Hz), 2.92 (dd, 1H, PheC\*HCHH', B-Teil eines ABX- Systems, J<sub>BX</sub>= 8.7 Hz, J<sub>AB</sub>, 13.7 Hz), 1.61 – 0.66 (m, 13H, Cyclohexyl-CH<sub>2</sub> und Cyclohexyl-H)

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 19.6°C, 400MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 172.6/172.0 (C13/C20\*), 155.7 (C6), 137.3 (C16), 137.0 (C4), 129.0 (C17), 128.2/128.0 (C2/C18\*), 127.6/127.5 (C1/C3\*), 126.3 (C19), 65.3 (C5), 53.2/53.1 (C14/C21\*), 51.4 (C7), 40.0 (C9), 36.6 (C15), 34.0 (C6), 33.6/32.4 (C10/C10'), 26.4/26.1 (C11/C11'), 26.0 (C12)

**IR** (KBr):

ν (cm<sup>-1</sup>) = 3314s, 2953m, 1744s, 1686s, 1661s, 1537s, 1455w, 1285s, 1223m, 1180w, 1039m, 751w, 698m

**N-Benzoyloxycarbonyl-3-cyclohexylalanyl-L-phenylalanin (6c)**

**Ansatz:** Gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift 1 mit  
373 mg 6c/1 (0.8 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Ethylacetat

**Ausbeute:** 235 mg (65% d. Th.)

**Fp.:** 117°C (Ethylacetat)

**EA:** C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [452.56]

ber.: C: 69.01 %    H: 7.13 %    N: 6.19 %  
gef.: C: 68.85 %    H: 7.18 %    N: 6.35 %

**MS** (EI, 70 eV, PT = 150°C) :

m/z (%) = 452 (M<sup>+</sup>, 3), 434 (15), 408 (9), 260 (14), 148 (8), 108 (15), 104 (13), 92 (22),  
91 (100), 77 (11), 65 (18), 44 (35)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.0°C, 400MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.99 (d, 1H, NH,  $J = 7.8$  Hz), 7.37 – 7.16 (m, 11H, Aromat-H und NH), 5.01 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 4.45 – 4.41 (m, 1H, PheC\*H), 3.72 – 3.66 (m, 1H, C7-H), 3.04 (dd, 1H, PheC\*HCHH', A-Teil eines ABX- Systems,  $J_{\text{AX}} = 5.0$  Hz,  $J_{\text{AB}} = 13.7$  Hz), 2.91 (dd, 1H, PheC\*HCHH', B-Teil eines ABX- Systems,  $J_{\text{BX}} = 8.7$  Hz,  $J_{\text{AB}} = 13.7$  Hz), 1.60 – 0.65 (m, 13H, Cyclohexyl-CH<sub>2</sub> und Cyclohexyl-H)

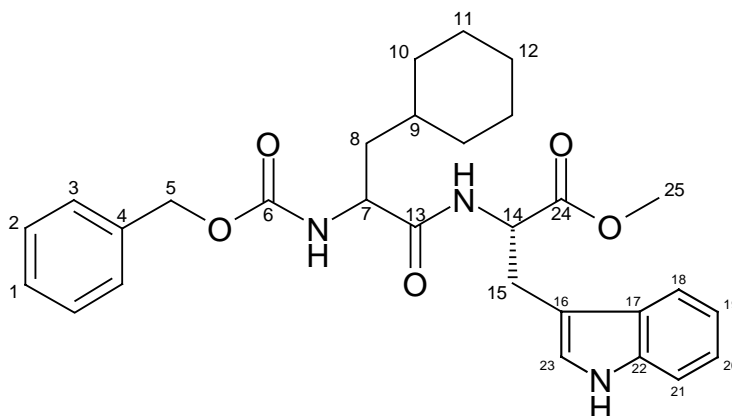
<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.0°C, 400MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 172.6/172.0 (C13/C20\*), 155.7 (C6), 137.3 (C16), 137.0 (C4), 129.0 (C17), 128.2/128.0 (C2/C18\*), 127.6/127.5 (C1/C3\*), 126.3 (C19), 65.3 (C5), 53.1 (C14), 51.4 (C7), 40.0 (C9), 36.6 (C15), 34.0 (C6), 33.6/32.4 (C10/C10'), 26.4/26.1 (C11/C11'), 26.0 (C12)

IR (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3325m, 3298m, 2958w, 1715m, 1665s, 1537m, 1455w, 1239w, 1120w, 1046w, 746w, 699w, 530w, 494w, 480w

**N-Benzoyloxycarbonyl-3-cyclohexylalanyl-L-tryptophanmethylester (6d/1)**



**Ansatz:** Gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift 2 mit  
611 mg N-Z-3-Cyclohexylalanin (2 mmol)  
510 mg L-Tryptophanmethylesterhydrochlorid (2 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Hexan/Ethylacetat (3+2)

**Ausbeute:** 340 mg (34% d. Th.)

**Fp.:** 110°C (Hexan/Ethylacetat)

**EA:** C<sub>29</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> [505.62]

ber.: C: 68.89 %    H: 6.98 %    N: 8.31 %

gef.: C: 68.76 %    H: 7.02 %    N: 8.39 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 250°C):

m/z (%) = 505 (M<sup>+</sup>, 5), 446 (3), 354 (57), 201 (41), 158 (7), 130 (100), 108 (49), 91 (68),  
79 (53), 77 (50), 65 (20), 59 (12)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 20.0°C, 400MHz):

δ<sub>H</sub> (ppm) = 8.10 (s, 1H, NH), 7.50 – 7.45 (m, 1H, Indol-C18-H), 7.34 – 7.27 (m, 6H, Indol-C21-H und Phenyl-H), 7.15 – 7.13 (m, 1H, Indol-C20-H), 7.09 – 7.05 (m, 1H, Indol-C19-H), 6.93 (s, 1H, Indol-C23-H), 6.64 (s, 1H, NH), 5.19 (d, 1H, NH, J = 5.2 Hz), 5.06 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 4.90 – 4.86 (m, 1H, TrpC\*H), 3.72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.70 – 3.67 (m, 1H, C7-H), 3.31 – 3.24 (m, 2H, TrpC\*HCH<sub>2</sub>), 1.69 – 0.61 (m, 13H, Cyclohexyl-CH<sub>2</sub> und Cyclohexyl-H)

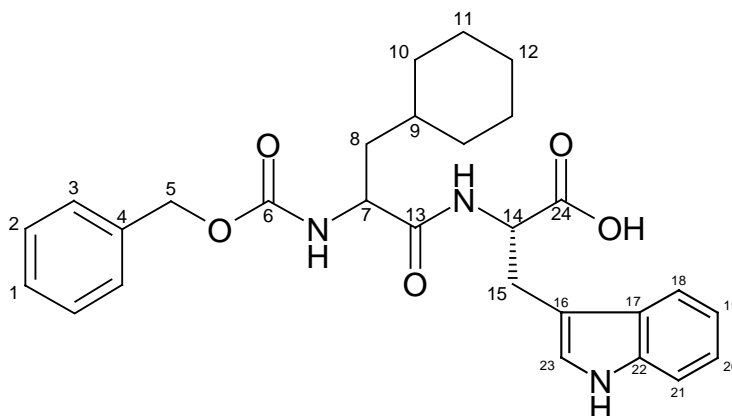
**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 20.0°C, 400 MHz):

$\delta_C$  (ppm) = 173.0/171.9 (C13/C24\*), 156.1 (C6), 137.0 (C4), 136.0 (C22), 128.2 (C2), 127.6 (C1), 127.5 (C3), 127.2 (C17), 123.5 (C23), 120.8 (C19), 118.2 (C18), 118.1 (C20), 111.2 (C21), 109.5 (C16), 65.3 (C5), 53.2 (C25), 52.8 (C14), 51.4 (C7), 40.1 (C9), 34.0 (C8), 33.6/32.7 (C10/C10'), 26.9 (C15), 26.5/26.2 (C11/C11'), 25.9 (C12)

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>)= 3316s, 2957m, 1725m, 1688s, 1656s, 1542s, 1475w, 1398w, 1239m, 1172w, 1037w, 700w, 485w, 460w, 436w

**N-Benzoyloxycarbonyl-3-cyclohexylalanyl-L-tryptophan (6d)**



**Ansatz:** Gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift 1 mit 300 mg 6d/1 (0.6 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Ethanol

**Ausbeute:** 212 mg (72% d. Th.)

**Fp.:** 154°C (Ethanol)

**EA:**  $C_{28}H_{33}N_3O_5$  [491.59]

ber.: C: 68.41 %      H: 6.77 %      N: 8.55 %

gef.: C: 68.29 %      H: 6.68 %      N: 8.62 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 250°C):

m/z (%) = 491 ( $M^+$ , 2), 473 (5), 447 (6), 187 (25), 130 (61), 108 (53), 91 (70), 79 (51), 78 (32), 77 (49), 65 (28), 44 (100)

**$^1H$ -NMR** (DMSO- $d_6$ , 50.0°C, 400MHz):

$\delta_H$  (ppm) = 8.11 (s, 1H, **NH**), 7.49 – 7.44 (m, 1H, Indol-C18-**H**), 7.33 – 7.26 (m, 6H, Indol-C21-**H** und Phenyl-**H**), 7.14 – 7.12 (m, 1H, Indol-C20-**H**), 7.08 – 7.04 (m, 1H, Indol-C19-**H**), 6.92 (s, 1H, Indol-C23-**H**), 6.63 (s, 1H, **NH**), 5.18 (d, 1H, **NH**, J= 5.2 Hz), 5.06 – 4.94 (m, 2H, Benzyl-**CH**<sub>2</sub>), 4.89 – 4.85 (m, 1H, TrpC\***H**), 3.73 – 3.66 (m, 1H, C13-**H**), 3.30 – 3.23 (m, 2H, TrpC\***HCH**<sub>2</sub>), 1.68 – 0.60 (m, 13H, Cyclohexyl-**CH**<sub>2</sub> und Cyclohexyl-**H**)

**$^{13}C$ -NMR** (DMSO- $d_6$ , 50.0°C, 400 MHz):

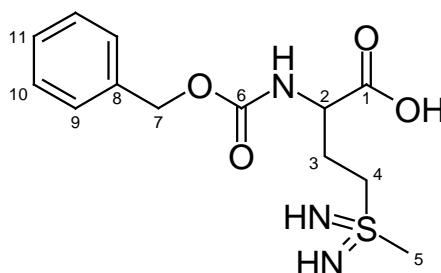
$\delta_C$  (ppm) = 173.0/171.9 (C13/C24\*), 156.1 (C6), 137.0 (C4), 136.0 (C22), 128.2 (C2), 127.6 (C1), 127.5 (C3), 127.2 (C17), 123.5 (C23), 120.8 (C19), 118.2 (C18), 118.1 (C20), 111.2 (C21), 109.5 (C16), 65.3 (C5), 52.8 (C14), 51.4 (C7), 40.1 (C9), 34.0 (C8), 33.6/32.7 (C10/C10'), 26.9 (C15), 26.5/26.2 (C11/C11'), 25.9 (C12)

**IR** (KBr):

$\nu$  ( $cm^{-1}$ ) = 3376s, 3034w, 2944m, 1710s, 1659s, 1533s, 1455m, 1437m, 1338w, 1230s, 1179m, 1101w, 1038w, 888w, 843w, 807w, 741m, 693w, 582w, 528w

**Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Sulfodiimide (AAV3):**

In einen Dreihalskolben mit Kältethermometer, Rührer und Tropftrichter mit KOH-Trockenrohr löst man unter Schutzgas 1 Equivalent des Thioethers in trockenem Acetonitril. Die Lösung wird auf  $-50^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und flüssiger, trockener Ammoniak (15 Equivalente) hinzugegeben. Dazu lässt man eine Lösung von t-Butylhypochlorit (5 Equivalente) in trockenem Acetonitril so zutropfen, dass die Temperatur im Inneren des Kolbens nicht über  $-40^{\circ}\text{C}$  steigt. Nach Beendigung des Zutropfens wird der Ansatz noch etwa 48 Stunden gerührt, vom ausgefallenem Ammoniumchlorid abgesaugt und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch.

**N-Benzoyloxycarbonyl-D,L-methionin-S,S-diimid (8)**

**Ansatz:** 28.3 g Z-Methionin (0.1 mol)

55 g t-Butylhypochlorit (0.5 mol)

25 ml Ammoniak

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60

Elutionsmittel: Dichlormethan/ Methanol (9+1)

**Rf- Wert:** 0.290 (Dichlormethan/ Methanol (9+1))

**Ausbeute:** 3.2 g (10 % d. Th.)

**Fp.:** 173°C (Dichlormethan/ Methanol (9+1))

**EA:** C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S [313.38]

ber.: C: 49.83 %      H: 6.11 %      N: 13.41 %

gef.: C: 50.63 %      H: 6.37 %      N: 13.16 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 250°C):

m/z (%) = 313 (M<sup>+</sup>, 6), 269 (100), 234 (59), 126 (59), 118 (71), 108 (51), 107 (43), 100 (44), 99 (50), 93 (51), 91 (66), 80 (50), 79 (58)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 34.9°C, 400MHz):

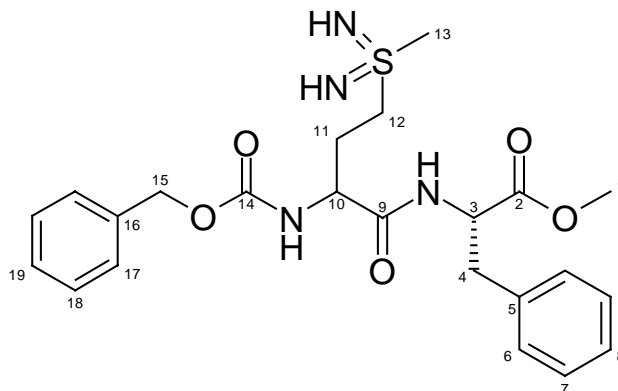
δ<sub>H</sub> (ppm) = 7.42 (d, 1H, NH, J= 8.1 Hz), 7.37 – 7.28 (m, 5H, Aromat-H), 7.08 (brs, 1H, NH), 5.03 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 4.09 – 4.04 (dtr, 1H, MetC\*H, A-Teil eines AMX<sub>2</sub>-Systems, J<sub>AM</sub>= 4.9 Hz, J<sub>AX</sub>= 8.4 Hz), 3.65 (brs, 1H, NH), 3.11 – 2.97 (m, 2H, H<sub>3</sub>CSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.87 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 2.13 – 1.92 (m, 2H, H<sub>3</sub>CSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 34.7°C, 400MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 172.7 (C1), 155.8 (C6), 136.8 (C8), 128.6 (C10), 128.2 (C11), 127.6 (C9), 65.5 (C7), 53.1 (C2), 52.9 (C4), 42.3 (C3), 25.9 (C5)

**IR** (KBr):

ν (cm<sup>-1</sup>) = 3397m, 3226s, 3026m, 2967m, 2926m, 1730s, 1693s, 1654s, 1605w, 1540s, 1457w, 1448m, 1396w, 1326w, 1287w, 1255s, 1197s, 1145w, 1046w, 1001m, 921w, 802w, 735w, 696w, 575w, 481w, 454w

**N-Benzoyloxycarbonyl-D,L-methionyl-L-phenylalaninmethylester-S,S-diimid (13)**

**Ansatz:** 889 mg Z-Met-L-Phe-OMe (2 mmol)

2.1 g t-Butylhypochlorit (20 mmol)

5 ml Ammoniak

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60

Elutionsmittel: Dichlormethan/Methanol (95+5)

**Ausbeute:** 603 mg (64 % d. Th.)

**Fp.:** 36°C (Dichlormethan/ Methanol)

**Rf- Wert:** 0.120 (Dichlormethan/Methanol (95+5))

**EA:** C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S [474.58]

ber.: C: 58.21 % H: 6.37 % N: 11.81 % S: 6.76 %

gef.: C: 57.95 % H: 6.34 % N: 11.33 % S: 6.93 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 300°C):

m/z (%) = 474 (M<sup>+</sup>, 1), 178 (7), 162 (8), 108 (12), 107 (10), 100 (9), 91 (100), 79 (21), 77 (17), 65 (11), 56 (13), 43 (17)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 21.0°C, 400MHz):

δ<sub>H</sub> (ppm) = 7.37 – 7.22 (m, 10H, Aromat-H), 6.45 (d, 1H, NH, J= 7.5 Hz), 6.01 – 6.98 (m, 1H, NH), 5.09 – 5.07 (m, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 4.92 – 4.70 (m, 2H, PheC\*H und MetC\*H), 3.73 (s, 3H, OCHH<sub>3</sub>), 3.28 – 2.72(m, 2H, PheC\*HC<sub>2</sub>), 3.04 (s, 1H, S=NH), 2.95 (s, 1H, S=NH), 2.55 – 2.24 (m, 2H, SCHH<sub>2</sub>), 2.16 (s, 3H, SCHH<sub>3</sub>), 2.03 - 1.85 (m, 2H, SCH2CH<sub>2</sub>)

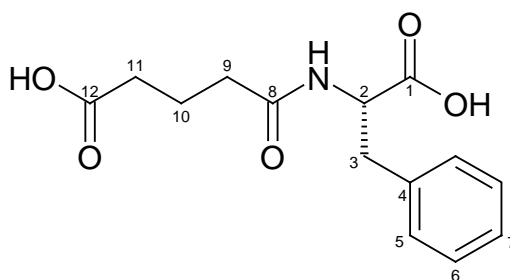
<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 23.3°C, 400MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 172.6/171.9 (C2/C9\*), 170.3 (C14), 136.3/136.0 (C5/C16\*), 129.2/129.1 (C6), 128.6 (2 Signale, C7), 128.5 (C18), 128.1 (C19), 128.0 (C8), 127.2/127.1 (C17), 66.9/66.8 (C15), 53.9/53.6 (C3), 53.0 (C1), 52.4/52.3 (C10), 46.7/46.4 (C12), 37.5/37.2 (C4), 30.9 (C11), 27.5/26.8 (C13)

IR (KBr):

ν (cm<sup>-1</sup>) = 3294s, 3031s, 2925m, 1738s, 1671s, 1540s, 1454s, 1252s, 1084s, 978w, 934w, 745w, 699m, 577w, 513w, 499w, 478w, 459w, 440w, 411w, 401w

**N-Glutaryl-L-phenylalanin (14)**



**Ansatz:** 460 mg L-Phenylalaninmethylesterhydrochlorid (2 mmol) und 228 mg Glutarsäureanhydrid (2 mmol) und werden mit einem Equivalent N-Methylmorpholin in Dioxan unter Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wird mit Wasser verdünnt, mit Salzsäure angesäuert und mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt und mit 1.1 Equivalenten Lithiumhydroxid in Methanol/Wasser versetzt. Der Reaktionsverlauf wird mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach beendeter Umsetzung wird der Ansatz mit Salzsäure neutralisiert, das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt und der wässrige Rückstand mit Salzsäure auf pH 2 gebracht. Die wässrige Phase wird mit Ethylacetat ausgeschüttelt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Der nach Entfernen des Lösungsmittels verbleibende Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert.

**Ausbeute:** 266 mg (47% d. Th.)

**Fp.:** 106°C

**EA:**  $C_{14}H_{17}NO_5$  [279.30]

ber.: C: 60.21 %    H: 6.14 %    N: 5.02 %

gef.: C: 59.82 %    H: 6.23 %    N: 5.27 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 230°C):

m/z (%) = 279 ( $M^+$ , 4), 162 (13), 149 (11), 148 (100), 147 (15), 132 (7), 129 (5), 120 (19), 115 (22), 104 (6), 91 (38), 87 (10), 74 (14)

**$^1H$ -NMR** (Methanol- $d_4$ , 22.1°C, 400MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.33 – 7.22 (m, 5H, Phenyl-H), 4.72 (dd, 1H, PheC\*H, X-Teil eines ABX-Systems,  $J_{\text{AX}}= 4.9$  Hz,  $J_{\text{BX}}= 9.7$  Hz), 3.26 (dd, 1H, PheC\*HCHH', A-Teil eines ABX-Systems,  $J_{\text{AX}}= 4.9$  Hz,  $J_{\text{AB}}= 13.9$  Hz), 2.97 (dd, 1H, PheC\*HCHH', B-Teil eines ABX-Systems,  $J_{\text{BX}}= 9.5$  Hz,  $J_{\text{AB}}= 13.9$  Hz), 2.27 – 2.21 (m, 4H, COCH2CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO und COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 1.86 – 1.78 (m, 2H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO)

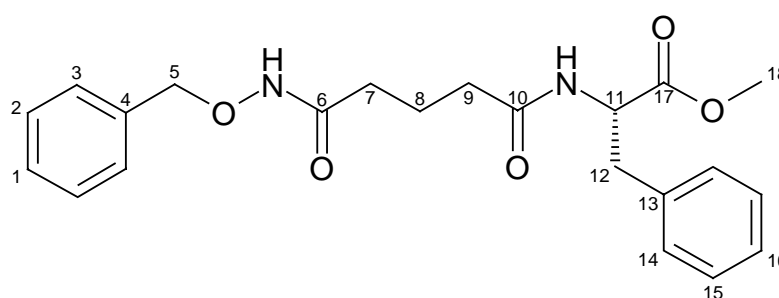
<sup>13</sup>C-NMR (Methanol-d<sub>4</sub>, 24.3°C, 400MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 176.8/175.2/174.7 (C1/C8/C12\*), 138.5 (C4), 130.2 (C5), 129.4 (C6), 127.8 (C7), 54.9 (C2), 38.4 (C3), 35.8 (C9), 33.9 (C11), 22.1 (C10)

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3331brs, 3141w, 3057w, 1720s, 1646s, 1537s, 1426m, 1241s, 1055w, 938w, 759w, 700w, 596w, 570w, 513w, 488w, 449w, 427w

**4-(Benzyloxycarbonyl)-butyryl-L-phenylalaninmethylester (16a)**



**Ansatz:** Gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift 2 mit  
1467 mg N-Glutaryl-L-Phenylalaninmethylester (5 mmol)  
798 mg O-Benzylhydroxylaminhydrochlorid (5 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Hexan/Ethylacetat (2+3)

**Rf-Wert:** 0.260 (Hexan/Ethylacetat (2+3))

**Ausbeute:** 585 mg (29% d. Th.)

**Fp.:** 64 - 66°C (Hexan/Ethylacetat)

**EA:** C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [398.46]

ber.: C: 66.32 %    H: 6.58 %    N: 7.03 %

gef.: C: 66.22 %    H: 6.49 %    N: 6.98 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 150°C) :

m/z (%) = 398 (M<sup>+</sup>, 5), 276 (9), 216 (9), 162 (14), 131 (6), 120 (17), 114 (13), 92 (9), 91 (100), 77 (10), 65 (6), 55(7)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 20.8°C, 400MHz):

δ<sub>H</sub> (ppm) = 8.89 (s, 1H, NH), 7.36 – 7.07 (m, 10H, Aromat-H), 6.00 (s, 1H, NH), 4.87 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 4.80 – 4.78 (m, 1H, PheC\*H), 3.70 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.14 – 3.09 (m, 1H, PheC\*HCH'), 2.97 – 2.94 (m, 1H, PheC\*HCH'), 2.15 – 1.86 (m, 6H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO)

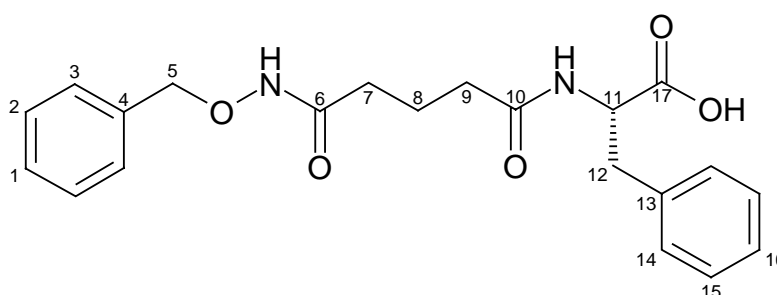
**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 23.9°C, 400MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 172.8/172.1/170.6 (C6/C10/C17\*), 135.8/135.7 (C4/C13\*), 129.1/129.0 (C2/C14\*), 128.6/128.5 (C1/C15\*), 127.2 (2 Signale, C3/C16\*), 78.0 (C5), 53.0 (C18), 52.4 (C11), 37.6 (C12), 34.4 (C7), 31.4 (C9), 21.4 (C8)

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3283w, 3168w, 3035w, 2958w, 2872w, 1747s, 1664s, 1653s, 1640s, 1560s, 1522w, 1508w, 1500w, 1466w, 1457w, 1437w, 1426w, 1368w, 1329w, 1279w, 1241w, 1219m, 1198w, 1181w, 1140w, 1120w, 1073w, 1045w, 1026w, 988w, 969w, 915w, 765w, 699m, 668w, 639w, 583w, 493w

**4-(Benzylloxycarbonyl)-butyryl-L-phenylalanin (16b)**



**Ansatz:** Gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift 1 mit  
585 mg 16a (1.5 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Methanol

**Ausbeute:** 538 mg (90% d. Th.)

**Fp.:** 119°C (Methanol)

**EA:** C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [384.43]

ber.: C: 65.51 %	H: 5.51 %	N: 7.29 %
gef.: C: 65.60 %	H: 5.13 %	N: 7.25 %

**MS** (EI, 70 eV, PT = 240°C) :

m/z (%) = 384 (M<sup>+</sup>, 1), 148 (74), 147 (14), 131 (32), 120 (38), 119 (15), 114 (72), 108 (38), 107 (28), 106 (19), 105 (15), 91 (100), 79 (21)

**$^1\text{H-NMR}$**  (Methanol- $\text{d}_4$ , 21.8°C, 400MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.41 – 7.18 (m, 10H, Aromat-**H**), 4.82 (s, 2H, Benzyl-**CH<sub>2</sub>**), 4.67 – 4.64 (m, 1H, PheC\***H**), 3.23 – 3.18 (m, 1H, PheC\***HCHH**'), 2.95 – 2.89 (m, 1H, PheC\***HCHH**'), 2.15 – 2.12 (m, 2H, CO**CH<sub>2</sub>**CH<sub>2</sub>), 1.97 – 1.93 (m, 2H, CO**CH<sub>2</sub>**CH<sub>2</sub>), 1.79 – 1.72 (m, 2H, COCH<sub>2</sub>**CH<sub>2</sub>**CH<sub>2</sub>CO)

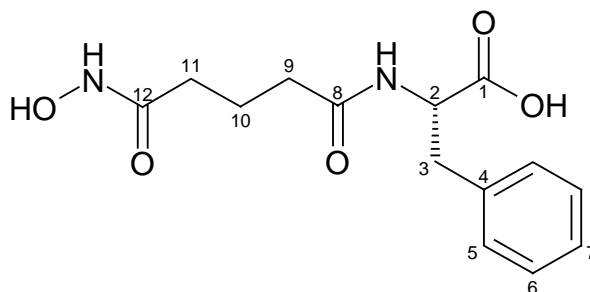
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (Methanol- $\text{d}_4$ , 21.8°C, 400MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 172.8/172.2/170.4 (C6/C10/C17\*), 135.9/135.6 (C4/C13\*), 129.1 (2 Signale, C2/C14\*), 128.7/128.6 (C1/C15\*), 127.2 (2 Signale, C3/C16\*), 78.0 (C5), 52.4 (C11), 37.6 (C12), 34.4 (C7), 31.5 (C9), 21.4 (C8)

**IR** (KBr):

$\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3412brs, 3059m, 2934m, 2364w, 1713s, 1654s, 1577w, 1561w, 1542w, 1498w, 1422m, 1364s, 1268s, 1224s, 1119w, 1091w, 1029w, 900w, 738s, 702s, 531m

**4-Hydroxycarbamoyl-butyril-L-phenylalanin (17)**



**Ansatz:** 384 mg **16b** (1 mmol) werden in Methanol gelöst, mit 500 mg Palladium auf Aktivkohle versetzt und unter Zugabe von Wasserstoff gerührt. Der Reaktionsverlauf wird mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach

Beendigung der Reaktion wird der Ansatz über Kieselgur filtriert und mit Methanol nachgewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Ansatz im Vakuum getrocknet.

**Ausbeute:** 164 mg (56 % d. Th.)

**Fp.:** 281°C (Methanol)

**EA:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [294.31]

ber.: C: 57.14 % H: 6.16 % N: 9.52 %

gef.: C: 57.28 % H: 6.03 % N: 9.25 %

**MS** (EI, 70 eV, PT = 240°C) :

m/z (%) = 294 (M<sup>+</sup>, 1), 148 (74), 147 (14), 131 (32), 120 (38), 119 (15), 114 (72), 108 (38), 107 (28), 106 (19), 105 (15), 91 (100), 79 (21)

**<sup>1</sup>H-NMR** (Methanol-d<sub>4</sub>, 21.8°C, 400MHz):

δ<sub>H</sub> (ppm) = 7.36 – 7.26 (m, 5H, Phenyl-H), 4.67 – 4.64 (m, 1H, PheC\*H), 3.23 – 3.18 (m, 1H, PheC\*HCH), 2.95 – 2.89 (m, 1H, PheC\*HCH), 2.15 – 2.12 (m, 2H, COH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 1.97 – 1.93 (m, 2H, COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>H<sub>2</sub>CO), 1.79 – 1.72 (m, 2H, COCH<sub>2</sub>H<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO)

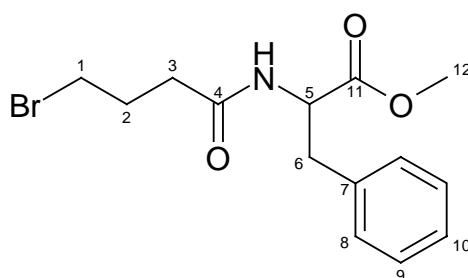
**<sup>13</sup>C-NMR** (Methanol-d<sub>4</sub>, 21.8°C, 400MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 177.6/172.4/172.1 (C1/C8/C12\*), 135.7 (C4), 129.2 (C5), 128.6 (C6), 127.2 (C7), 53.1 (C2), 37.9 (C3), 35.0 (C9), 32.7 (C11), 20.4 (C10)

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3443w, 3251s, 2953s, 1735m, 1657s, 1580s, 1497m, 1444m, 1400s, 1341w, 1316w, 1258w, 1226w, 1156w, 1113w, 1080w, 1052w, 1030w, 991w, 911w, 883w, 862w, 823w, 792w, 746s, 699s, 585w, 536w, 495w

**4-Brombutyryl-L-phenylalaninmethylester (18)**



**Ansatz:** 1.149 g L-Phenylalaninmethylesterhydrochlorid (5 mmol) werden mit 1.2 ml N-Methylmorpholin (5.5 mmol) in trockenem Acetonitril gelöst und im Eisbad gekühlt. Zu dieser Lösung werden 0.58 ml 4-Brombuttersäurechlorid (5 mmol) in trockenem Acetonitril zugetropft und der Ansatz über Nacht gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit 2N Zitronensäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Kochsalz-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Der nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer verbleibende Rückstand wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt.

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Ethylacetat

**Rf- Wert:** 0.100 (Ethylacetat)

**Ausbeute:** 1542 mg (94% d. Th.)

**Fp.:** Öl

**EA:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>3</sub> [328.31]

ber.: C: 51.23 % H: 5.53 % N: 4.27 %

gef.: C: 51.20 % H: 5.56 % N: 4.06 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 150°C)

m/z (%) = 330 (4), 328 (M<sup>+</sup>, 4), 234 (9), 220 (13), 165 (7), 162 (15), 108 (4), 91 (100), 77 (65), 65 (55), 59 (47), 45 (51)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 19.8°C, 400 MHz):

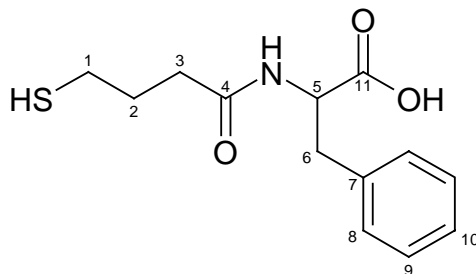
δ<sub>H</sub> (ppm) = 7.30 – 7.08 (m, 5H, Phenyl-H), 6.18 (d, 1H, NH, J = 7.7 Hz), 4.90 – 4.85 (m, 1H, PheC\*H), 3.72 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.64 – 3.60 (m, 2H, BrCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 3.14 (dd, 1H, PheC\*HCHH', A-Teil eines ABX-Systems, J<sub>AX</sub> = 5.9 Hz, J<sub>AB</sub> = 13.9 Hz), 3.07 (dd, 1H, PheC\*HCHH', B-Teil eines ABX-Systems, J<sub>BX</sub> = 6.2 Hz, J<sub>AB</sub> = 13.9 Hz), 2.35 – 2.31 (m, 2H, BrCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 1.85 – 1.79 (m, 2H, BrCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO)

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 22°C, 400 MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 173.0/172.1 (C4/C11\*), 135.8 (C7), 129.2 (C8), 128.6 (C9), 127.1 (C10), 53.1 (C12), 52.4 (C5), 37.8 (C6), 33.5 (C3), 27.8 (C1), 22.2 (C2)

**IR** (KBr):

ν (cm<sup>-1</sup>) = 2987s, 1742s, 1653w, 1594w, 1499m, 1482m, 1456w, 1448w, 1419w, 1382w, 1356w, 1337w, 1320w, 1281w, 1220w, 1195s, 1130w, 1096w, 1081w, 1036w, 991w, 955w, 929w, 901w, 853w, 814w, 782w, 757w, 733w, 702m, 637w, 600w, 500w, 481w, 417w

**4-Mercaptobutyryl-L-phenylalanin (19)**

**Ansatz:** Eine Lösung von 856 mg 18 (2.6 mmol) und 310 mg Thioharnstoff (2.9 mmol) in Ethanol wird unter Rühren vier Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotavapor wird das verbleibende Öl in Wasser gelöst und mit vier Äquivalenten NaOH versetzt. Der Ansatz wird zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt und nach dem Abkühlen mit Salzsäure angesäuert. Der Ansatz wird dreimal mit Ether ausgeschüttelt und die organische Phase mit 2N Zitronensäure gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand aus Methanol umkristallisiert.

**Ausbeute:** 292 mg (55 % d. Th.)

**Fp.:** 122°C (Methanol)

**EA:** C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>S [267.35]

ber.: C: 58.40 %	H: 6.41 %	N: 5.24 %	S: 11.99 %
gef.: C: 58.62%	H: 6.70%	N: 5.11%	S: 11.87%

**MS** (EI, 70eV, PT = 390°C):

m/z (%) = 267 (M<sup>+</sup>, 6), 184 (32), 162 (42), 155 (26), 131 (12), 120 (21), 92 (17), 91 (100), 88 (13), 87 (40), 70 (13), 65 (18)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.20 – 7.09 (m, 5H Phenyl-**H**), 4.39 – 4.35 (m, 1H, PheC\***H**), 3.15 (brs, 1H **S****H**), 2.98 (dd, 1H, PheC\***HCH****H'**, A-Teil eines ABX-Systems,  $J_{\text{AX}} = 4.8$  Hz,  $J_{\text{AB}} = 14.0$  Hz), 2.77 (dd, 1H, PheC\***HCH****H'**, B-Teil eines ABX-Systems,  $J_{\text{AB}} = 14.0$  Hz,  $J_{\text{BX}} = 9.9$  Hz), 2.70 – 2.57 (m, 2H, H**SCH****H**<sub>2</sub>), 2.09 – 2.03 (m, 2H, H**SCH**<sub>2</sub>**CH****H**<sub>2</sub>**CH**<sub>2</sub>), 1.67 – 1.53 (m, 2H, H**SCH**<sub>2</sub>**CH****H**<sub>2</sub>**CH**<sub>2</sub>)

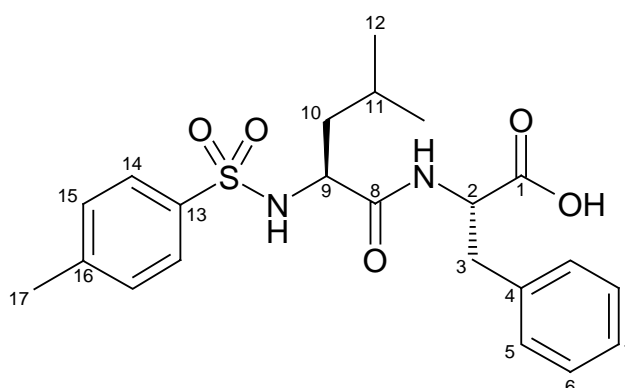
**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 174.3/172.8 (C4/C11\*), 137.6 (C7), 128.8 (C8), 127.9 (C9), 126.1 (C10), 53.1 (C5), 42.5 (C3), 37.0 (C2), 36.7 (C6), 23.0 (C1)

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3428w, 3293br, 2924w, 1717s, 1625s, 1409m, 1232s, 746w, 701w, 667w, 603w, 509w, 484w, 470w

**N-(4-Methylbenzolsulfonyl)-L-leucyl-L-phenylalanin (22a)**



**Ansatz:** Gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift 1 aus  
333 mg Tosyl-Leu-PheOMe (0.75 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Ethanol

**Ausbeute:** 263 mg (79 % d. Th.)

**Fp.:** 152°C (Ethanol)

**EA:**  $C_{22}H_{28}N_2O_5S \cdot \frac{1}{2} H_2O$  [441.55]  
ber.: C: 59.84 %    H: 6.39 %    N: 6.34 %    S: 7.26 %  
gef.: C: 59.74 %    H: 6.40 %    N: 6.22 %    S: 7.10 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 150°C) :

m/z (%) = 432 (M<sup>+</sup>, 1), 240 (83), 184 (13), 155 (37), 120 (10), 119 (7), 92 (23), 91 (100),  
86 (18), 77 (9), 65 (22), 43 (19)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 49.9°C, 500MHz):

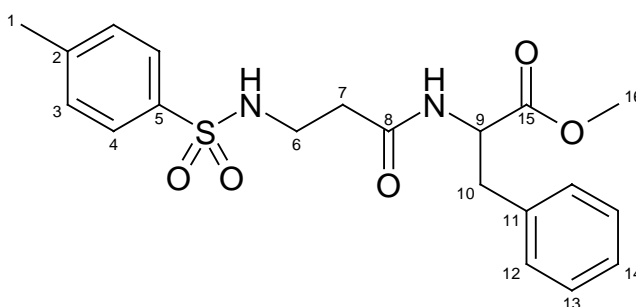
δ<sub>H</sub> (ppm) = 7.98 (d, 1H, NH, J= 7.3 Hz), 7.67 (d, 1H, NH, J= 8.6 Hz), 7.59 – 7.57 (m, 2H, Tosyl-C14-H), 7.28 – 7.21 (m, 5H, Phenyl-H), 7.15 – 7.14 (m, 2H, Tosyl-C15-H), 4.22 – 4.17 (m, 1H, PheC\*H), 3.75 – 3.69 (m, 1H, LeuC\*H), 2.94 – 2.89 (m, 1H, PheC\*HCHH'), 2.77 (dd, 1H, PheC\*HCHH', B-Teil eines ABX-Systems, J<sub>BX</sub>= 7.5 Hz, J<sub>AB</sub>= 13.7 Hz), 2.32 (s, 3H, Tosyl-CH<sub>3</sub>), 1.58 – 1.47 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.28 – 1.25 (m, 2H, LeuCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.78 (d, 3H, LeuCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J= 6.6 Hz), 0.69 (d, 3H, LeuCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J= 6.4 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 172.1/170.7 (C1/C8\*), 142.1 (C13), 138.1 (C16), 137.0 (C4), 128.9 (2 Signale, C5/C15\*), 127.9 (C6), 126.3/126.2 (C14/C7\*), 54.6 (C2), 53.1 (C9), 41.5 (C10), 36.7 (C3), 23.5 (C11), 22.5 (C12), 21.2 (C12'), 20.7 (C17)

**IR (KBr):**

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3335br, 3266br, 3126w, 2953w, 2931w, 1760s, 1665s, 1536s, 1496m, 1429m, 1330s, 1167s, 1094w, 924w 815w, 757m, 700w, 667w, 576w, 554m

**N-(4-Methylbenzolsulfonyl)- $\beta$ -alanyl-L-phenylalaninmethylester (22b/1)**

**Ansatz:** Gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift 2 mit  
378 mg N-Tosyl- $\beta$ -alanin (1.5 mmol)  
345 mg L-Phenylalaninhydrochlorid

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Hexan/Ethylacetat (2+3)

**Rf-Wert:** 0.560 (Hexan/Ethylacetat (2+3))

**Ausbeute:** 415 mg (68% d. Th.)

**Fp.:** 75°C (Hexan/Ethylacetat)

**EA:** C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S [404.49]

ber.: C: 59.39%	H: 5.98%	N: 6.93%	S: 7.93%
gef.: C: 59.62%	H: 5.91%	N: 7.11%	S: 7.87%

**MS** (EI, 70eV, PT = 390°C):

m/z (%) = 404 (M<sup>+</sup>, 6), 184 (32), 162 (42), 155 (26), 131 (12), 120 (21), 92 (17), 91 (100), 88 (13), 87 (40), 70 (13), 65 (18)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 23.6°C, 399.8 MHz):

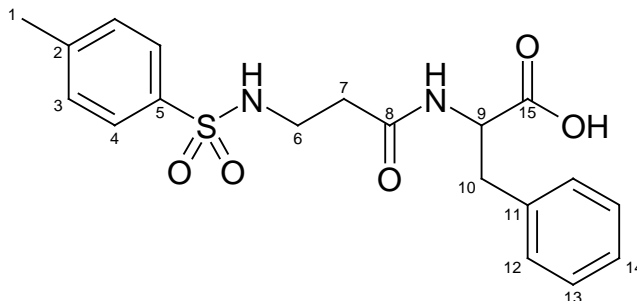
δ<sub>H</sub> (ppm) = 7.73 – 7.70 (m, 2H, Tosyl-C4-H), 7.30 – 7.21 (m, 5H, Phenyl-H), 7.08 – 7.06 (m, 2H, Tosyl-C3-H), 6.05 (d, 1H, NH, J = 7.9 Hz), 5.46 – 5.43 (m, 1H, NH), 4.83 – 4.78 (m, 1H, PheC\*H), 3.72 (s, 3H, OC<sub>3</sub>), 3.17 – 3.10 (m, 3H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO und PheC\*HCHH'), 3.02 (dd, 1H, PheC\*HCHH', B-Teil eines ABX-Systems, J<sub>AB</sub> = 13.9 Hz, J<sub>BX</sub> = 6.4 Hz), 2.40 (s, 3H, Tosyl-CH<sub>3</sub>), 2.38 – 2.03 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO)

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 23.6°C, 400MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 172.0/170.7 (C8/C15\*), 143.4 (C5), 137.0 (C2), 135.6 (C11), 129.7 (C3), 129.1 (C12), 128.7 (C13), 127.2 (C14), 127.0 (C4), 53.2 (C16), 52.5 (C9), 39.3 (C7), 37.7 (C10), 35.4 (C6), 21.5 (C1)

**IR** (KBr):

ν (cm<sup>-1</sup>) = 3334s, 3270s, 3065w, 3032w, 2980w, 2953w, 2921w, 2859w, 1750s, 1685s, 1662s, 1636w, 1629w, 1597w, 1560w, 1543s, 1508w, 1500w, 1457m, 1437m, 1417w, 1386w, 1354m, 1326s, 1305m, 1266m, 1214s, 1200m, 1156s, 1114w, 1088s, 1059w, 1032w, 1022w, 1002w, 944m, 860w, 814m, 760w, 697m, 674s, 634w, 578m, 568w, 554m, 535w, 491w

**N-(4-Methylbenzolsulfonyl)-β-alanyl-L-phenylalanin (22b)**

**Ansatz:** Gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift 1 aus  
346 mg 22b/1 (0.8 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Ethanol

**Ausbeute:** 236 mg (76 % d. Th.)

**Fp.:** 120°C (Ethanol)

**EA:** C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S [390.46]

ber.: C: 58.45 %    H: 5.68 %    N: 7.17 %

gef.: C: 58.12 %    H: 5.85 %    N: 7.10 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 390°C):

m/z (%) = 390 (M<sup>+</sup>, 6), 344 (18), 235 (17), 226 (21), 184 (100), 155 (68), 148 (58), 147 (15), 120 (43), 92 (15), 91 (74), 87 (62), 65 (15)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

δ<sub>H</sub> (ppm) = 8.11 (d, 1H, **NH**, J = 8.0 Hz), 7.65 – 7.64 (2H, m, Tosyl-C4-**H**), 7.38 – 7.15 (m, 8H, Aromat-**H** und **NH**), 4.41 - 4.37 (m, 1H, PheC\***H**), 3.04 – 3.00 (m, 1H,

PheC\*HCH $\underline{H}$ H'), 2.84 – 2.79 (m, 3H, PheC\*HCH $\underline{H}$ H' und NHCH $\underline{H}_2$ CH $\underline{H}_2$ CO), 2.37 (s, 3H, Tosyl-C $\underline{H}_3$ ), 2.24 – 2.21 (m, 2H, NHCH $\underline{H}_2$ C $\underline{H}_2$ CO)

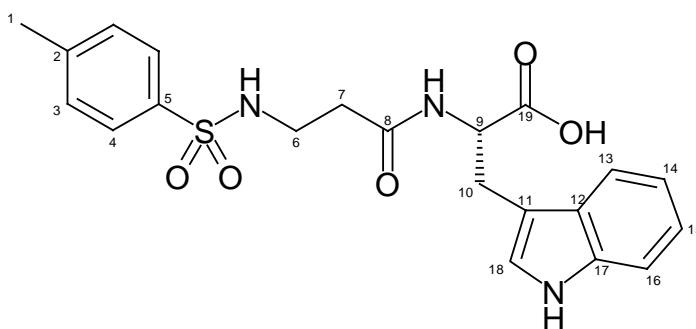
$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 50.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 172.5/169.4 (C8/C15\*), 142.4 (C5), 137.4/137.3 (C2/C11\*), 129.4 (C3), 128.8 (C12), 127.9 (C13), 126.3 (C14), 126.1 (C4), 53.1 (C9), 38.9 (C7), 36.6 (C10), 35.1 (C6), 20.7 (C1)

**IR** (KBr):

$\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )= 3312s, 3275s, 3069w, 2918w, 1719s, 1665s, 1598w, 1542s, 1497w, 1455w, 1441w, 1413m, 1394w, 1354w, 1329s, 1303w, 1264m, 1213m, 1184w, 1157s, 1120w, 1081m, 938w, 856w, 816m, 702s, 581w, 567w, 549m

**N-(4-Methylbenzolsulfonyl)- $\beta$ -alanyl-L-tryptophan (22c)**



**Ansatz:** Gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift 1 aus  
443 mg Tosyl- $\beta$ -Ala-TrpOMe (1 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Ethanol

**Ausbeute:** 262 mg (61% d. Th.)

**Fp.:** 168°C (Ethanol)

**EA:** C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S [429.50]

ber.: C: 58.73 % H: 5.40 % N: 9.78 %

gef.: C: 59.18 % H: 5.74 % N: 9.28 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 360°C):

m/z (%) = 429 (M<sup>+</sup>, 6), 411 (5), 187 (22), 184 (6), 171 (6), 155 (17), 131 (12), 130 (100), 117 (5), 91 (26), 88 (10), 65 (5)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

δ<sub>H</sub> (ppm) = 10.73 (s, 1H, NH), 8.08 (d, 1H, NH, J= 7.8 Hz), 7.66 – 7.65 (m, 2H, Tosyl-C4-H), 7.51 – 7.49 (m, 1H, Indol-C13-H), 7.38 – 7.36 (m, 2H, Tosyl-C3-H), 7.33 – 7.31 (m, 1H, Indol-C16-H), 7.10 (s, 1H, Indol-C15-H), 7.06 – 7.03 (m, 1H, Indol-C14-H), 6.97 – 6.94 (m, 1H, Indol-C18-H), 4.47 – 4.43 (m, 1H, TrpC\*H), 3.16 – 3.12 (m, 1H, TrpC\*HCH'), 3.01 – 2.97 (m, 1H, TrpC\*HCH'), 2.89 – 2.85 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH), 2.37 (s, 3H, Tosyl-CH<sub>3</sub>), 2.30 – 2.23 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.1°C, 500.1 MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 172.9/169.5 (C8/19\*), 142.3 (C5), 137.4 (C2), 135.9 (C17), 129.4 (C3), 127.1 (C12), 126.3 (C4), 123.2 (C18), 120.6 (C14), 118.1 (C13), 117.9 (C15), 111.1 (C16), 109.8 (C11), 52.8 (C9), 38.9 (C7), 35.1 (C6), 26.9 (C10), 20.7 (C1)

**IR** (KBr):

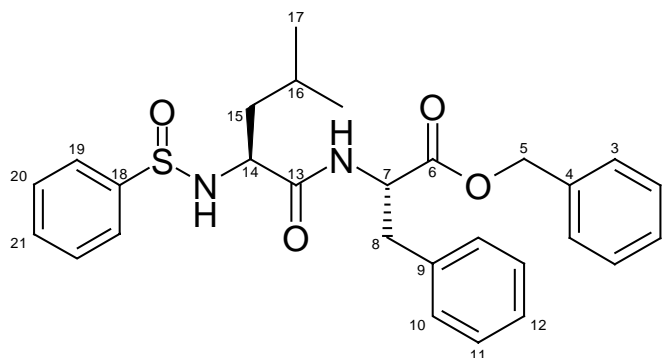
ν (cm<sup>-1</sup>) = 3401s, 3260m, 3100w, 2935w, 1726s, 1670s, 1654w, 1648w, 1636w, 1618w, 1561w, 1540w, 1535w, 1522s, 1518s, 1508w, 1504w, 1497w, 1492w, 1458w,

1450w, 1437w, 1420s, 1344w, 1332m, 1318m, 1303w, 1248w, 1218m, 1196m, 1151s, 1084m, 939w, 851w, 818w, 753s, 686w, 669w, 660w, 639w, 549m, 504w, 431w

### Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von Arensulfinyldipeptiden (AAV4):

Ein Equivalent der Arensulfinensäure und ein Equivalent der Aminokomponente werden in trockenem Dioxan gelöst und im Eisbad gekühlt. Zu dieser Lösung wird ein Equivalent Dicyclohexylcarbodiimid in trockenem Dioxan zugetropft. Der Ansatz wird über Nacht gerührt, vom Lösungsmittel befreit und mit trockenem Ethylacetat versetzt. Vom aufgefallenem Niederschlag wird abgesaugt, vom Lösungsmittel befreit und aus Ethylacetat umkristallisiert.

### N-Benzosulfinyl-L-leucyl-L-phenylalaninbenzylester (24a)



**Ansatz:** 143 mg Benzosulfinsäure (1 mmol)  
483 mg Tfa\*H<sub>2</sub>N-Leu-Phe-Obz (1 mmol)  
206 mg Dicyclohexylcarbodiimid (1mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Ethylacetat

**Ausbeute:** 191 mg (39% d. Th.)

**Fp.:** 172°C (Ethylacetat)

**EA:** C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S [492.64]

ber.: C: 68.27 %    H: 6.55 %    N: 5.69 %    S: 6.51 %

gef.: C: 68.36 %    H: 6.46 %    N: 5.47 %    S: 6.33 %

**MS (ESI) :**

m/z (%) = 1007 ([2M+Na]<sup>+</sup>, 23), 985 ([2M+H]<sup>+</sup>, 100), 493 ([M+H]<sup>+</sup>, 56)

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):**

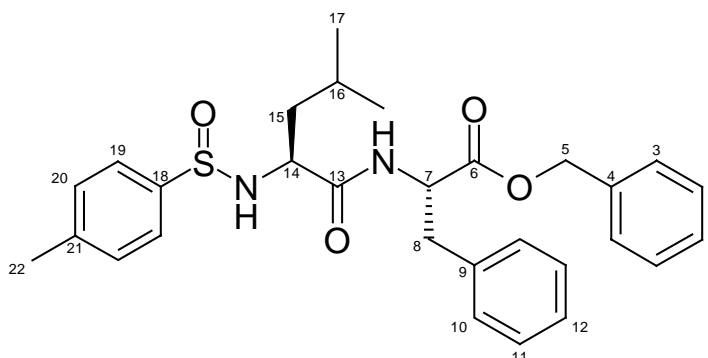
δ<sub>H</sub> (ppm) = 8.87 (d, 1H, NH, J= 7.3 Hz), 8.02 (s, 1H, NH), 7.62 – 7.60 (m, 2H, Aromat-C19-H), 7.36 – 7.21 (m, 13H, Aromat-H), 5.07 (s, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 4.65 – 4.61 (m, 1H, PheC\*H), 3.76 – 3.73 (m, 1H, LeuC\*H), 3.11 – 3.07 (m, 1H, PheC\*HCH'), 3.03 – 2.98 (m, 1H, PheC\*HCH'), 1.63 – 1.59 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.50 – 1.47 (m, 2H, LeuC\*HCH<sub>2</sub>), 0.83 (2d, 6H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), J= 6.6 Hz und J= 6.4 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 23.7°C, 400MHz):**

δ<sub>C</sub> (ppm) = 172.3/171.2 (C6/C13\*), 143.6 (C18), 135.9 (C4), 135.1 (C9), 131.3 (C21), 129.6 (C10), 128.9 (C11), 128.6 (C12), 128.5 (2 Signale, C2/C20\*), 128.4 (C1), 127.0 (C3), 125.8 (C19), 67.2 (C5), 54.1 (C7), 53.2 (C14), 42.3 (C15), 37.8 (C8), 24.2 (C16), 22.7 (C17), 21.4 (C17')

**IR (KBr):**

ν (cm<sup>-1</sup>) = 3459m, 3253m, 2923m, 1732m, 1682s, 1653m, 1625w, 1536s, 1457m, 1354w, 1207s, 1128m, 1037m, 1019m, 745w, 730w, 691m, 675w, 662w, 612m, 565m, 499w, 464w, 443m, 430m, 413w

**N-(4-Methylbenzolsulfinyl)-L-leucyl-L-phenylalaninbenzylester (24b)**

**Ansatz:** 234 mg Toluolsulfinsäure (1.5 mmol)  
724 mg Tfa\*H<sub>2</sub>N-Leu-Phe-OBz (1.5 mmol)  
310 mg Dicyclohexylcarbodiimid (1.5 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Hexan/Ethylacetat (9+1)

**Ausbeute:** 234 mg (43% d. Th.)

**Rf- Wert:** 0.488 (Hexan/ Ethylacetat (9+1))

**Fp.:** 186 - 188°C

**EA:** C<sub>29</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S [506.67]

ber.: C: 68.75 %	H: 6.76 %	N: 5.53 %	S: 6.33 %
gef.: C: 68.89 %	H: 6.69 %	N: 5.45 %	S: 6.69 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 1013 ([2M+H]<sup>+</sup>, 44), 507 ([M+H]<sup>+</sup>, 100)

**$^1\text{H-NMR}$**  (Methanol- $\text{d}_4$ , 22.8°C, 400MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.76 – 7.74 (m, 2H, Aromat-C19-**H**), 7.40 – 7.23 (m, 12H, Aromat-**H**), 5.15 (s, 2H, Benzyl-**CH**<sub>2</sub>), 4.81 – 4.77 (m, 1H, PheC\***H**), 3.90 – 3.86 (m, 1H, LeuC\***H**), 3.22 (dd, 1H PheC\***HCH****H**`, A-Teil eines ABX-Systems,  $J_{\text{AX}} = 6.2$  Hz,  $J_{\text{AB}} = 13.9$  Hz), 3.07 (dd, 1H PheC\***HCH****H**`, B-Teil eines ABX-Systems,  $J_{\text{BX}} = 8.6$  Hz,  $J_{\text{AB}} = 13.9$  Hz), 2.40 (s, 3H, Aromat-**CH**<sub>3</sub>), 1.72 – 1.62 (m, 3H, Leu**CH**<sub>2</sub>**CH**(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und Leu**CH**<sub>2</sub>**CH**(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.96/0.95 (2d, 6H, Leu**CH**(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,  $J = 6.2$  Hz)

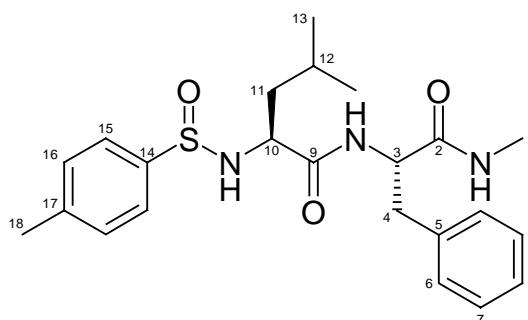
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (Methanol- $\text{d}_4$ , 26.6°C, 400MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 172.4/171.1 (C6/C13\*), 143.9 (C18), 141.9 (C21), 138.2 (C4), 137.2 (C9), 130.5 (C10), 130.1 (C11), 129.9 (2 Signale)/129.8/129.7\* (C12, C2 und C20\*), 128.3 (C3), 127.3 (C19), 68.5 (C5), 56.0 (C7), 53.1 (C14), 42.0 (C15), 38.4 (C8), 25.5 (C16), 23.5 (C17), 22.2 (C17'), 21.6 (C22)

**IR** (KBr):

$\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3248m, 2962m, 1735s, 1681s, 1654w, 1636w, 1618w, 1561w, 1535s, 1508w, 1497w, 1457w, 1389w, 1353w, 1208s, 1127m, 1037m, 1013m, 812w, 747w, 698m, 686m, 572w

**N-(4-Methylbenzolsulfinyl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (25)**



**Ansatz:** 291 mg H<sub>2</sub>N-Leu-Phe-NMe (1 mmol)  
156 mg Toluolsulfinsäure (1 mmol)  
206 mg Dicyclohexylcarbodiimid (1 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Chloroform/ Methanol (19+1)

**Rf- Wert:** 0.500 (Chloroform/ Methanol (19+1))

**Ausbeute:** 104 mg (24 % d. Th.)

**Fp.:** 142°C (Chloroform/ Methanol (19+1))

**EA:** C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S [429.59]

ber.: C: 64.31 %    H: 7.27 %    N: 9.78 %

gef.: C: 64.57 %    H: 7.27 %    N: 9.74 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 859 ([2M+H]<sup>+</sup>, 58), 430 ([M+H]<sup>+</sup>, 100)

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):**

δ<sub>H</sub> (ppm) = 7.81 (d, 1H, NH, J= 4.6 Hz), 7.62 (d, 1H, NH, J= 8.2 Hz), 7.48 – 7.47 (m, 2H, Aromat-C15-H), 7.30 – 7.28 (m, 2H, Aromat-C16-H), 7.24 – 7.12 (m, 5H, Phenyl-H), 6.66 (d, 1H, NH, J= 8.9 Hz), 4.35 – 4.30 (m, 1H, PheC\*-H), 3.58 – 3.53 (m, 1H, LeuC\*-H), 3.02 (dd, 1H, PheC\*HCHH', A-Teil eines ABX-Systems, J<sub>AX</sub>= 5.3 Hz, J<sub>AB</sub>= 14.0 Hz), 2.69 (dd, 1H, PheC\*HCHH', B-Teil eines ABX-Systems, J<sub>BX</sub>= 8.9 Hz, J<sub>AB</sub>= 14.0 Hz), 2.62 (d, 3H, NHCH<sub>3</sub>, J= 4.6 Hz), 2.34 (s, 3H, Aromat-CH<sub>3</sub>), 1.55 – 1.51 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.34 –

1.17 (m, 2H, LeuCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.81 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J= 6.6 Hz),  
0.78 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J= 6.4 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.1°C, 500MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 171.6/170.6 (C2/C9\*), 141.4 (C14), 140.5 (C17), 137.3 (C5), 129.1 (C6),  
128.9 (C16), 127.7 (C7), 125.9 (C8), 125.3 (C15), 55.4 (C3), 53.2 (C10), 42.5  
(C11), 37.6 (C4), 25.3 (C1), 23.6 (C12), 22.4 (C13), 21.4 (C13'), 20.6 (C18)

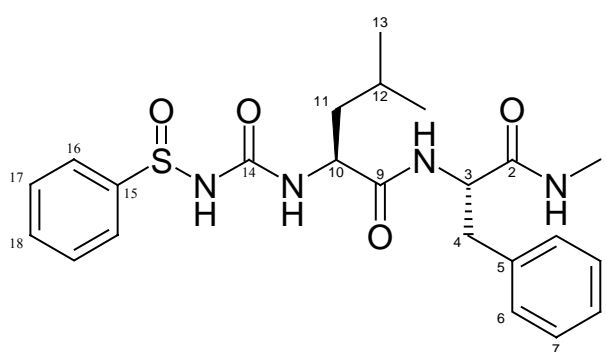
**IR** (KBr):

ν (cm<sup>-1</sup>)= 3363m, 2929m, 1735w, 1719w, 1701w, 1685m, 1676w, 1654s, 1636s, 1577m,  
1561m, 1540s, 1508w, 1497w, 1458w, 1093m, 1074m, 814w, 704w, 488w

**Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung von Arensulfinylharnstoffdipeptiden****(AAV5):**

Zu einem Überschuss an Thionylchlorid wird bei 0°C ein Equivalent des Natriumsalzes der Arensulfinsäure portionsweise als Feststoff zugegeben und, sobald die Reaktion nachgelassen hat, 1h auf ca. 30°C erwärmt. Das überschüssige Thionylchlorid wird durch Anlegen eines Vakuums entfernt. Der Rückstand wird mit trockenem Petrolether versetzt und filtriert. Das Arensulfinylchlorid ist nach Entfernen des Petrolethers im Vakuum rein genug für weitere Umsetzungen.

Das so erhaltene Arensulfinylchlorid wird, in trockenem Ether gelöst, bei 0°C zu einer Suspension von 1.2 Equivalenten Silbercyanat in trockenem Ether zugetropft und 2h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abtrennen des gebildeten Silberchlorides und des überschüssigen Silbercyanates wird die Lösung des Arensulfinylisocyanates langsam zu einer Lösung von einem Equivalent der Aminkomponente in trockenem Tetrahydrofuran getropft und über Nacht gerührt. Weitere Reaktionsbedingungen und Aufarbeitung sind bei den einzelnen Produkten angegeben.

**N-[(Benzosulfinyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (28a)**

**Ansatz:** 410 mg Benzosulfinsäure-Natriumsalz (2.5 mmol)  
10 ml Thionylchlorid  
450 mg AgOCN (3 mmol)  
729 mg H<sub>2</sub>N-Leu-Phe-NMe (2.5 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Methanol

**Ausbeute:** 494 mg (43 % d. Th.)

**Fp.:** 209°C (Methanol)

**Rf- Wert:** 0.629 (Dichlormethan/Methanol (9+1))

**EA:** C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S [458.58]

ber.: C: 60.24% H: 6.59% N: 12.22% S: 6.99%

gef.: C: 60.29% H: 6.34% N: 12.17% S: 6.87%

**MS (ESI):**

m/z (%) = 955 ([2M+K]<sup>+</sup>, 16), 939 ([2M+Na]<sup>+</sup>, 65), 917 ([2M+H]<sup>+</sup>, 100), 497 ([M+K]<sup>+</sup>, 9), 481 ([M+Na]<sup>+</sup>, 79), 459 ([M+H]<sup>+</sup>, 89)

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 30.0°C, 500MHz):**

δ<sub>H</sub> (ppm) = 9.37 (brs, 1H, NH), 8.27 (d, 1H, NH, J = 8.0 Hz), 7.84 (d, 1H, NH, J = 4.6 Hz), 7.71 – 7.70 (m, 2H, Aromat-C16-H), 7.62 – 7.61 (m, 3H, Aromat-C18-H und Aromat-C17-H), 7.28 – 7.16 (m, 5H, Phenyl-H), 6.43 (d, 1H, NH, J = 8.2 Hz), 4.43 (dd, 1H, PheC\*H, X- Teil eines ABX- Systems, J<sub>AX</sub> = 8.5 Hz, J<sub>BX</sub> = 5.3 Hz), 4.27 – 4.24 (m, 1H, LeuC\*H), 2.98 – 2.94 (m, 1H, PheC\*HCHH'), 2.83 – 2.78 (m, 1H, PheC\*HCHH'), 2.56 (d, 3H, NHCHH<sub>3</sub>, J = 4.4 Hz), 1.55 – 1.43 (m, 1H, LeuCHH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.40 – 1.25 (m, 2H, LeuC\*HCH<sub>2</sub>), 0.87 (d, 3H, LeuCHCHH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J = 6.6 Hz), 0.84 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(H<sub>3</sub>), J = 7.7 Hz)

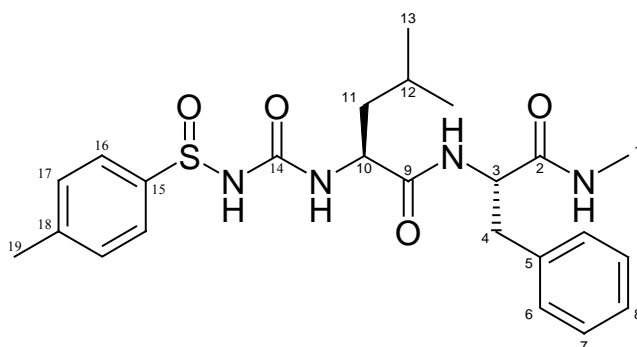
**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):**

$\delta_C$  (ppm) = 171.3/170.8 (C2/C9\*), 154.1 (C14), 144.5 (C15), 139.5 (C5), 131.1 (C18),  
128.9/128.8 (C6/C17\*), 127.7 (C7), 125.9 (C8), 124.4 (C16), 53.7 (C3), 51.6  
(C10), 41.7 (C11), 37.4 (C4), 25.2 (C1), 23.9 (C12), 22.7 (C13), 21.7 (C13')

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3288m, 3091w, 2955w, 1637s, 1556s, 1444w, 1411m, 1385w, 1223w, 1122m,  
1095w, 1064w, 1032w, 871w, 748w, 701w, 686w

**N-[(4-Methylbenzolsulfinyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (28b)**



**Ansatz:** 445 mg Toluolsulfinsäure-Natriumsalz (2.5 mmol)

2 ml Thionylchlorid

420 mg AgOCN (2.8 mmol)

593 mg H<sub>2</sub>N-Leu-Phe-NMe (2 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Ethanol

**Ausbeute:** 617 mg (65% d. Th.)

**Fp.:** 188°C (Ethanol)

**EA:**  $C_{24}H_{32}N_4O_4S$  [472.61]

ber.: C: 60.99% H: 6.82% N: 11.85% S: 6.78%

gef.: C: 61.03% H: 6.64% N: 11.28% S: 6.78%

**MS (ESI):**

m/z (%) = 1439 ( $[3M+Na]^+$ , 32), 983 ( $[2M+K]^+$ , 5), 967 ( $[2M+Na]^+$ , 100), 945 ( $[2M+H]^+$ , 32), 511 ( $[M+K]^+$ , 11), 495 ( $[M+Na]^+$ , 71), 473 ( $[M+H]^+$ , 26)

**$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 50.0°C, 500MHz):**

$\delta_H$  (ppm) = 9.26/9.25 (2s, 1H, NH), 8.17/8.06 (2d, 1H, NH, J = 8.2 Hz), 7.76 – 7.70 (m, 1H, NH), 7.59 – 7.54 (m, 2H, Aromat-C16-H), 7.43 – 7.40 (m, 2H, Aromat-C17-H), 7.28 – 7.16 (m, 5H, Phenyl-H), 6.46/6.42 (2d, 1H, NH, J = 8.2 Hz), 4.45 – 4.41 (m, 1H, PheC\*H), 4.26 – 4.22 (m, 1H, LeuC\*H), 3.01 – 2.96 (m, 1H, PheC\*HCH'), 2.86 – 2.80 (m, 1H, PheC\*HCH'), 2.57/2.56 (2d, 3H, NHCH<sub>3</sub>, J = 4.6 Hz), 2.40/2.39 (2s, 3H, Aromat-CH<sub>3</sub>), 1.54 – 1.50 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.39 – 1.24 (m, 2H, LeuC\*HCH<sub>2</sub>), 0.87 – 0.80 (m, 6H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

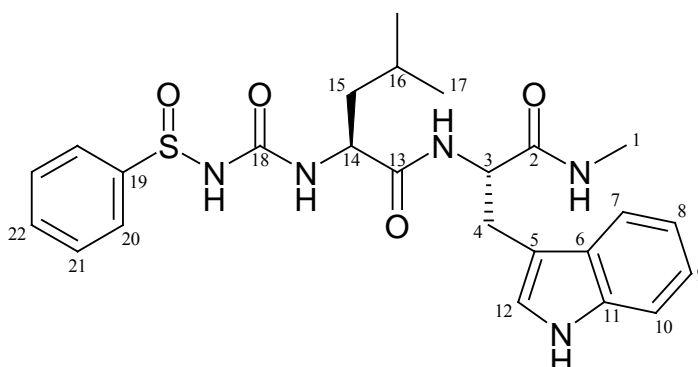
**$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 50.0°C, 500MHz):**

$\delta_C$  (ppm) = 172.5/171.3/170.9/170.8 (C2/C9\*), 158.3 (C14), 154.2/154.1 (C15), 141.5/141.2 (C18), 137.7/137.5 (C5), 129.4/129.2 (C17) 128.9/128.8 (C6), 127.8/127.7 (C7), 125.9/125.3 (C8), 124.4/124.2 (C16), 53.8/53.5 (C3), 52.0/51.7 (C10), 41.6/41.1 (C11), 37.5/37.2 (C4), 25.3 (2 Signale, C1), 23.9 (2 Signale, C12), 22.7 (2 Signale, C13), 21.7/21.6 (C13'), 20.6/20.5 (C19)

**IR (KBr):**

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3448s, 3280s, 2960m, 2357w, 1640s, 1560m, 1456w, 1168m, 1124w, 1036w, 1011w, 686w, 568w

**N-[(Benzolsulfinyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-tryptophan-N-methylamid (28c)**



**Ansatz:** 410 mg Benzolsulfinsäure-Natriumsalz (2.5 mmol)  
10 ml Thionylchlorid  
450 mg AgOCN (3mmol)  
826 mg H<sub>2</sub>N-Leu-Trp-NMe

**Reinigung:** Umkristallisation aus Ethanol

**Ausbeute:** 453 mg (36% d. Th.)

**Fp.:** 215 - 220°C (Ethanol)

**EA:** C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S [497.60]

ber.: C: 60.34 %	H: 6.28 %	N: 14.08 %	S: 6.44 %
gef.: C: 60.06%	H: 6.14 %	N : 13.62 %	S: 6.47 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 536 ([M+K]<sup>+</sup>, 43), 520 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100), 498 ([M+H]<sup>+</sup>, 70)

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 30.0°C, 500MHz):**

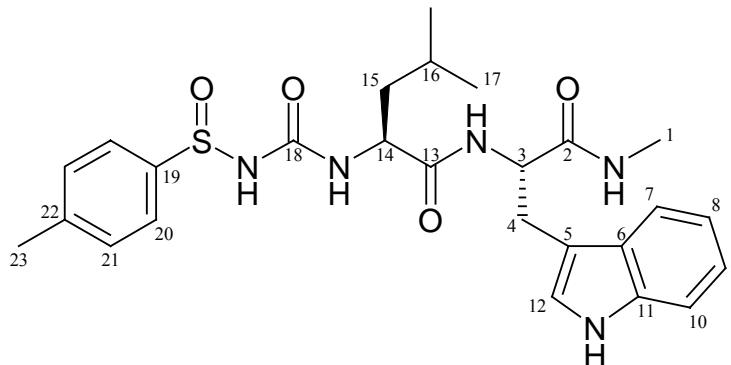
δ<sub>H</sub> (ppm) = 10.80/10.73 (2s, 1H, NH), 9.41/9.37 (2s, 1H, NH), 8.27 – 8.22 (2d, 1H, NH, J= 7.8 Hz und J= 8.2 Hz), 7.84 – 7.79 (2d, 1H, NH, J= 4.6 Hz), 7.72 – 7.71 (m, 2H, Aromat-C20-H), 7.60 – 7.55 (m, 4H, Indol-C7-H, Aromat-C22-H und Aromat-C21-H), 7.33 – 7.31 (m, 1H, Indol-C10-H), 7.11 – 7.03 (m, 2H, Indol-C8-H und Indol-C9-H), 6.98 – 6.95 (m, 1H, Indol-C12-H), 6.52 – 6.47 (m, 1H, NH), 4.48 – 4.44 (m, 1H PheC\*H), 4.23 – 4.27 (m, 1H, LeuC\*H), 3.12 – 3.07 (m, 1H, PheC\*HCHH'), 2.97 (dd, 1H, PheC\*HCHH', B-Teil eines ABX-Systems, J<sub>AB</sub>= 14.4 Hz, J<sub>BX</sub>= 8.0 Hz), 2.55 – 2.53 (m, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.58 – 1.48 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.42 – 1.29 (m, 2H, LeuC\*HCH<sub>2</sub>), 0.88 (d, 3H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>), J= 6.9 Hz), 0.85 (d, 3H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>), J= 7.3 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 30.0°C, 500MHz):**

δ<sub>C</sub> (ppm) = 171.5 (2 Signale)/171.4/171.3 (C2/C13\*), 154.4/154.3 (C18), 144.5/144.4 (C19), 136.0/135.9 (C11), 131.3 (C22), 129.2/129.1 (C21), 127.3 (C6), 124.6 (C20), 123.5/123.4 (C12), 120.7 (C8), 118.3 (C7), 118.1 (C9), 111.2 (C10), 110.0 (C5), 53.5/53.4 (C3), 51.6/51.5 (C14), 41.9 (2 Signale, C15), 27.9/27.8 (C4), 25.5 (C1), 24.1 (2 Signale, C16), 23.1/23.0 (C17), 21.8 (2 Signale, C17')

**IR (KBr) :**

ν (cm<sup>-1</sup>) = 3402w, 3290s, 3108w, 2956w, 1636s, 1543s, 1457w, 1417m, 1387w, 1357w, 1225m, 1121w, 1096m, 1067w, 876w, 825w, 769w, 746m, 687w, 651w

**N-[(4-Methylbenzolsulfinyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-tryptophan-N-methylamid (28d)**

**Ansatz:** 445 mg Toluolsulfinsäure-Natriumsalz (2.5 mmol)  
5 ml Thionylchlorid  
450 mg AgOCN (3 mmol)  
826 mg H<sub>2</sub>N-Leu-Trp-NMe

**Reinigung:** Umkristallisation aus n-Propanol/ H<sub>2</sub>O

**Ausbeute:** 355 mg (28% d. Th.)

**Fp.:** 227°C (n-Propanol/H<sub>2</sub>O)

**EA:** C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S [511.65]

ber.: C: 61.04 %    H: 6.50 %    N: 13.69 %

gef.: C: 60.33 %    H: 6.48 %    N: 13.30 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 1023 ([2M+H]<sup>+</sup>, 84), 534 ([M+Na]<sup>+</sup>, 35), 512 ([M+H]<sup>+</sup>, 100)

**$^1\text{H-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 50.0°C, 500MHz) :

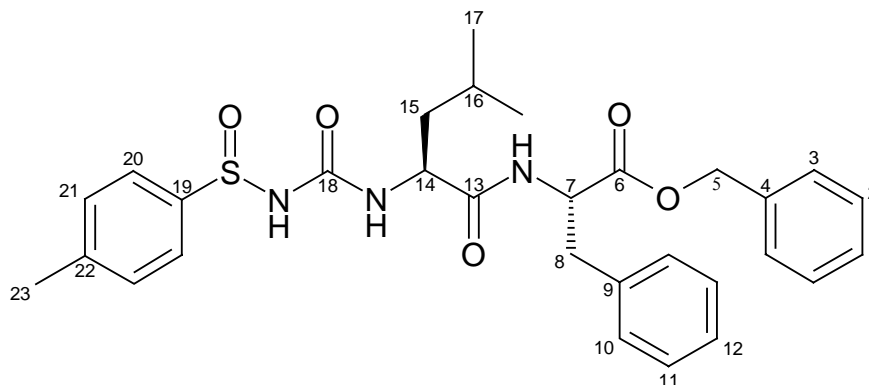
$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 10.80 (s, 1H, **NH**), 9.31 (s, 1H, **NH**), 8.22 (d, 1H, **NH**,  $J = 8.1$  Hz), 7.83 (d, 1H, **NH**,  $J = 4.6$  Hz), 7.61 – 7.55 (m, 3H, Aromat-C20-**H** und Indol-C7-**H**), 7.41 (m, 2H, Aromat-C21-**H**,  $J = 8.1$  Hz), 7.32 (d, 1H, Indol-C10-**H**,  $J = 8.1$  Hz), 7.11 (s, 1H, Indol-C9-**H**), 7.06 (tr, 1H, Indol-C8-**H**,  $J = 7.3$  Hz), 6.97 (tr, 1H, Indol-C12-**H**,  $J = 7.1$  Hz), 6.47 (d, 1H, **NH**,  $J = 8.1$  Hz), 4.49 – 4.43 (m, 1H, TrpC\***H**), 4.34 – 4.25 (m, 1H, LeuC\***H**), 3.13 – 3.07 (m, 1H, TrpC\*HC**HH'**), 2.97 (dd, 1H, TrpC\*HCH**HH'**, A- Teil eines ABX- Systems,  $J_{\text{AB}} = 14.4$  Hz,  $J_{\text{AX}} = 7.9$  Hz), 2.55 (d, 3H, NH**CH**<sub>3</sub>,  $J = 3.7$  Hz), 2.39 (s, 3H, Aromat-**CH**<sub>3</sub>), 1.59 – 1.46 (m, 1H, Leu**CH**(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.45 – 1.27 (m, 2H, LeuC\*H**CH**<sub>2</sub>), 0.89 – 0.84 (m, 6H, Leu**CH**(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

 **$^{13}\text{C-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 50.1°C, 500MHz) :

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 171.5/171.4 (C2/C13\*), 154.3 (C18), 141.5/141.3 (C19/C22\*), 136.0 (C11), 129.6 (C21), 127.3 (C6), 124.6 (C20), 123.4 (C12), 120.7 (C8), 118.4 (C7), 118.1 (C9), 111.2 (C10), 109.9 (C5), 53.5 (C3), 51.6 (C14), 41.9 (C15), 27.8 (C4), 25.5 (C1), 24.1 (C16), 23.0 (C17), 21.8 (C17'), 20.8 (C23)

**IR** (KBr) :

$\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3405m, 3283m, 2955w, 2928w, 1634s, 1544m, 1434w, 1223w, 1093w, 810w, 745w, 659w, 521w, 444w

**N-[(4-Methylbenzolsulfinyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-phenylalaninbenzylester (28e)**

**Ansatz:** 391 mg Toluolsulfinsäure (2.5 mmol)  
 0.2 ml Thionylchlorid (2.7 mmol)  
 450 mg AgOCN (3 mmol)  
 1206 mg Tfa\*H<sub>2</sub>N-Leu-PheOBz (2.5 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Ethanol

**Ausbeute:** 1055 mg (78 % d. Th.)

**Fp.:** 236°C (Ethanol)

**EA:** C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S [549.69]

ber.: C: 65.55 %	H: 6.42 %	N: 7.64 %	S: 5.83 %
gef.: C: 65.24 %	H: 6.52 %	N: 7.75 %	S: 5.56 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 1099 ([2M+H]<sup>+</sup>, 65), 572 ([M+Na]<sup>+</sup>, 26), 550 ([M+H]<sup>+</sup>, 100)

**<sup>1</sup>H-NMR** (Methanol-d<sub>4</sub>, 19.5°C, 400MHz):

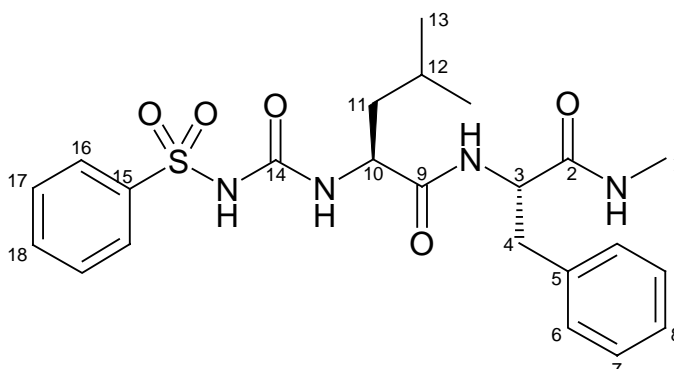
$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.76 – 7.74 (m, 2H, Aromat-C20-**H**), 7.39 – 7.24 (m, 12H, Aromat-**H**), 5.16 (d, 2H, Benzyl-**CH**<sub>2</sub>, J= 6.0 Hz), 4.82 – 4.79 (m, 1H, PheC\***H**), 3.88 – 3.85 (m, 1H, LeuC\***H**), 3.25 – 3.21 (m, 1H, PheC\***HCH**'), 3.08 (dd, 1H, PheC\***HCH**'), B-Teil eines ABX-Systems, J<sub>AB</sub>= 14.0 Hz, J<sub>BX</sub>= 8.7 Hz), 2.41 (s, 3H, Aromat-**CH**<sub>3</sub>), 1.72 – 1.61 (m, 3H, LeuCH<sub>2</sub>**CH**(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und Leu**CH**<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.97 (d, 3H, LeuCH**CH**<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J= 6.2 Hz), 0.96 (d, 3H, LeuCH<sub>2</sub>CHCH<sub>3</sub>(**CH**<sub>3</sub>), J= 6.0 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 170.5/169.2 (C6/C13\*), 159.0 (C18), 145.7 (C19), 137.4 (C22), 136.6 (C4), 135.4 (C9), 130.2, (C10), 128.9 (C11), 128.3/128.0/127.9 (2 Signale) (C12/ C2/ C21/ C1\*), 126.6 (C3), 125.4 (C20), 66.2 (C5), 53.8 (C7), 50.5 (C14), 40.1 (C15), 36.4 (C8), 23.2 (C16), 22.6 (C17), 21.5 (C17'), 20.6 (C23)

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3630m, 2961br, 1734s, 1700m, 1681s, 1636w, 1618w, 1560m, 1535s, 1497w, 1457w, 1389w, 1353w, 1260w, 1207s, 1127m, 1037m, 1013m, 812w, 749w, 721w, 698m, 686m, 572w

**N-[(Benzolsulfonyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (29a)**

**Ansatz:** 200 µl Phenylsulfonylisocyanat (1.5 mmol) in 20 ml trockenem THF werden zu einer Lösung von 437 mg H<sub>2</sub>N-Leu-Phe-NMe (1.5 mmol) in 50 ml trockenem THF getropft und 2h bei Raumtemperatur gerührt. Vom aufgefallenen Niederschlag wird abgesaugt und der Niederschlag mit THF gewaschen.

**Reinigung:** Umkristallisation aus Ethanol

**Ausbeute:** 559 mg (79 % d. Th.)

**Fp.:** 196 -198°C (Ethanol)

**EA:** C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S [474.58]

ber.: C: 58.21 %    H: 6.37 %    N: 11.81 %    S: 6.76 %

gef.: C: 58.06%    H: 6.30 %    N : 11.79 %    S: 6.75 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 320°C) :

m/z (%) = 474 ( M<sup>+</sup>, 0.3), 317 (100), 291 (71.5), 259 (74.2), 248 (77.5), 233 (68.7), 206 (80.2), 205 (73.5), 183 (77.2), 163 (71.7), 162 (69.7), 141 (73.7), 86 (67.0)

**$^1\text{H-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 50.0°C, 500MHz) :

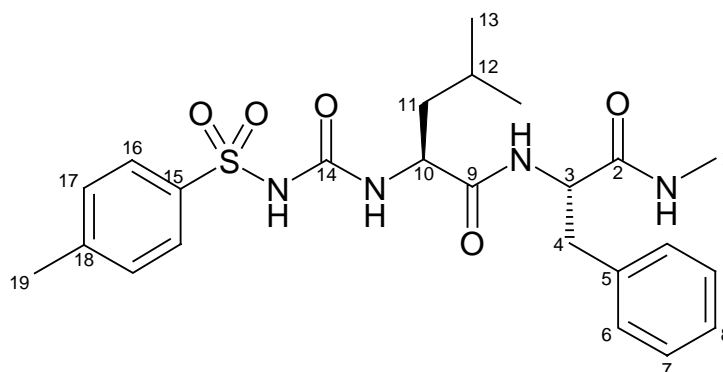
$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 10.46 (s, 1H, **NH**), 8.12 (d, 1H, **NH**,  $J = 8.5$  Hz), 7.91 – 7.90 (m, 2H, Aryl-C16-**H**), 7.69 – 7.66 (m, 2H, Aromat-C18-**H** und **NH**), 7.60 – 7.57 (m, 2H, Aryl-C17-**H**), 7.19 – 7.14 (m, 5H, Phenyl-**H**), 6.55 (d, 1H, **NH**,  $J = 8.0$  Hz), 4.42 – 4.38 (m, 1H, PheC\***H**), 4.10 – 4.06 (m, 1H, LeuC\***H**), 2.94 (dd, 1H, PheC\*HCH**H**′, A- Teil eines ABX- Systems,  $J_{\text{AB}} = 13.7$  Hz,  $J_{\text{AX}} = 5.5$  Hz), 2.78 (dd, 1H, PheC\*HCH**H**′, B- Teil eines ABX- Systems,  $J_{\text{AB}} = 13.7$  Hz,  $J_{\text{BX}} = 8.9$  Hz), 2.54 (d, 3H, N**CH**<sub>3</sub>,  $J = 4.6$  Hz), 1.35 – 1.23 (m, 3H, Leu**CH**<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und LeuCH<sub>2</sub>**CH**(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.77 (d, 3H, LeuCH**CH**<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>),  $J = 6.2$  Hz), 0.73 (d, 3H, LeuCH**CH**<sub>3</sub>(**CH**<sub>3</sub>),  $J = 6.2$  Hz)

 **$^{13}\text{C-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 50.0°C, 500MHz) :

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 170.9/170.7 (C2/C9\*), 150.6 (C14), 140.0 (C15), 137.5 (C5), 132.9 (C18), 128.8/128.7 (C6/C17\*), 127.7 (C7), 126.8 (C16), 125.9 (C8), 53.8 (C3), 51.4 (C10), 41.5 (C11), 37.4 (C4), 25.2 (C1), 23.8 (C12), 22.7 (C13), 21.6 (C13′)

**IR** (KBr) :

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3289m, 2926w, 2368w, 1708w, 1635s, 1559m, 1449w, 1341m, 1164m, 1094w, 898w, 690w, 591w, 571w, 532w, 518w

**N-[(4-Methylbenzolsulfonyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (29b)**

**Ansatz:** 437 mg H<sub>2</sub>N-Leu-Phe-NMe (1.5 mmol)  
296 mg 4-Methylphenylsulfonylisocyanat (1.5 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Ethanol

**Ausbeute:** 676 mg (92 % d. Th.)

**Fp.:** 202°C (Ethanol)

**EA:** C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S

ber.: C: 59.00 %    H: 6.60 %    N: 11.47 %    S: 6.56 %

gef.: C: 58.92%    H: 6.49 %    N: 11.15 %    S: 6.53 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 250°C):

m/z (%) = 488 (M<sup>+</sup>, 1), 317 (57), 206 (65), 197 (100), 163 (82), 162 (83), 161 (47), 160 (40), 155 (95), 120 (65), 91 (67), 87 (45), 86 (75)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 10.38 (s, 1H, NH), 8.12 (d, 1H, NH,  $J = 8.2$  Hz), 7.77 (d, 2H, Tosyl-C16-H,  $J = 8.2$  Hz), 7.67 (d, 1H, NH,  $J = 4.6$  Hz), 7.38 (d, 2H, Tosyl-C17-H,  $J = 8.0$  Hz), 7.19 – 7.12 (m, 5H, Phenyl-H), 6.53 (d, 1H, NH,  $J = 8.0$  Hz), 4.42 – 4.38 (m, 1H, PheC\*H), 4.10 – 4.06 (m, 1H, LeuC\*H), 2.94 (dd, 1H, PheC\*HCHH', A- Teil eines ABX- Systems,  $J_{\text{AB}} = 13.7$  Hz,  $J_{\text{AX}} = 5.5$  Hz), 2.78 (dd, 1H, PheC\*HCHH', B- Teil eines ABX- Systems,  $J_{\text{AB}} = 13.7$  Hz,  $J_{\text{BX}} = 8.9$  Hz), 2.54 (d, 3H, NCH<sub>3</sub>,  $J = 4.6$  Hz), 2.38 (s, 3H, Tosyl-CH<sub>3</sub>), 1.34 – 1.22 (m, 3H, LeuCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und LeuCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.78 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>),  $J = 6.2$  Hz), 0.74 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>),  $J = 6.2$  Hz)

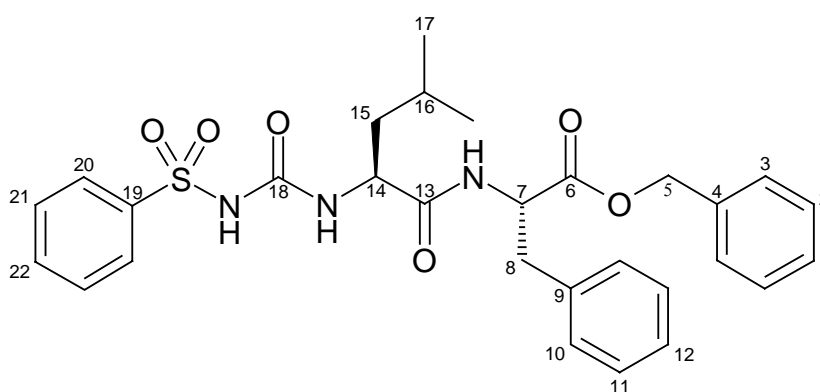
<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz) :

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 171.9/170.7 (C2/C9\*), 150.6 (C14), 143.4 (C15), 137.5 (C5), 137.2 (C18\*), 129.2 (C17), 128.8 (C6), 127.7 (C7), 126.9 (C16), 125.9 (C8), 53.8 (C3), 51.4 (C10), 41.5 (C11), 37.4 (C4), 25.3 (C1), 23.8 (C12), 22.7 (C13), 21.6 (C13'), 20.8 (C19)

IR (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3276m, 3094w, 2955w, 2924w, 1709m, 1637s, 1547s, 1456w, 1342s, 1229w, 1162s, 1092w, 1037w, 896w, 814w, 747w, 699m, 666m, 585w, 547m

**N-[(Benzolsulfonyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-phenylalaninbenzylester (29c)**



**Ansatz:** 620 mg Tfa\*H<sub>2</sub>N-Leu-PheOBz (1.3 mmol)  
352 mg Phenylsulfonylisocyanat (1.9 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Hexan/ Ethylacetat (6+4)

**Rf- Wert:** 0.293 (Hexan/ Ethylacetat (6+4))

**Ausbeute:** 531 mg (75 % d. Th.)

**Fp.:** 45°C (Hexan/ Ethylacetat (6+4))

**EA:** C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S [551.66]

ber.: C: 63.14 % H: 6.03 % N: 7.62 %

gef.: C: 61.16% H: 5.90 % N : 7.55 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 120°C) :

m/z (%) = 551 (M<sup>+</sup>, 0.5), 394 (21), 303 (27), 285 (22), 259 (88), 238 (42), 214 (67), 192 (45), 157 (39), 120 (43), 91 (100), 85 (82), 77 (89)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21.4°C, 400MHz):

δ<sub>H</sub> (ppm) = 8.00 – 7.98 (m, 2H, Aromat-C20-**H**), 7.90 (d, 1H, **NH**, J= 7.1 Hz), 7.56 – 6.82 (m, 15H, Aromat-H und **NH**), 5.15 – 5.03 (m, 2H, Benzyl-**CH**<sub>2</sub>), 4.91 – 4.86 (m, 1H, PheC\***H**), 4.35 – 4.31 (m, 1H, LeuC\***H**), 3.04 (d, 2H, PheC\*H**CH**<sub>2</sub>, J= 6.0 Hz), 1.47 – 1.37 (m, 3H, Leu**CH**<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und LeuCH<sub>2</sub>**CH**(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.77 (d, 3H, LeuCH(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, J = 5.7 Hz), 0.73 (d, 3H, LeuCH(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, J = 5.7 Hz)

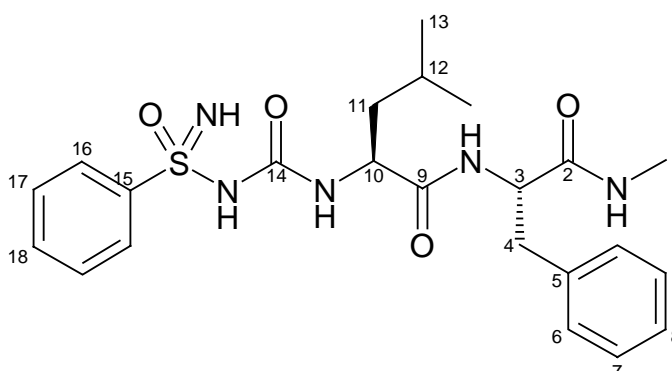
**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 24.5°C, 400MHz):

$\delta_c$  (ppm) = 172.0/170.8 (C6/C13\*), 151.3 (C18), 142.1 (C19), 139.6 (C4), 135.2 (C9), 134.9 (C22), 133.5 (C21), 129.3 (C10), 129.1 (C2), 128.6 (C11), 128.5 (C1), 127.5 (C3), 127.1 (C20), 126.4 (C12), 67.4 (C5), 53.5 (C14), 52.2 (C7), 41.7 (C15), 37.7 (C8), 24.5 (C16), 22.6 (C17), 22.0 (C17')

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3301s, 2958m, 1642s, 1542s, 1449s, 1338s, 1165s, 1090m, 1028m, 895m, 754m, 686s, 589s

**N-[(Benzolsulfonimidoyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (30a)**



**Ansatz:** 482 mg 28a (1.05 mmol) wird in trockenem THF suspendiert. 169 mg N-Chlorbenzotriazol wird in einer Portion dazugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird zu einer Lösung von Ammoniak in trockenem THF bei -45°C zugetropft. Der Ansatz wird über Nacht gerührt und vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird in Wasser suspendiert, abgesaugt, mit Wasser und wenig Ether gewaschen und säulenchromatographisch gereinigt.

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Ethylacetat

**Rf- Wert:** 0.244 (Ethylacetat)

**Ausbeute:** 195 mg (39.2% d. Th.)

**Fp.:** 178°C (Ethylacetat)

**EA:** C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>S [473.60]

ber.: C: 58.33 % H: 6.60 % N: 14.79 %

gef.: C: 58.36% H: 6.58 % N: 14.80 %

**MS (ESI):** 969 ([2M+Na]<sup>+</sup>, 23), 947 ([2M+H]<sup>+</sup>, 86), 512 ([M+K]<sup>+</sup>, 6), 496 ([M+Na]<sup>+</sup>, 30), 474 ([M+H]<sup>+</sup>, 100)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 34.9°C, 400MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 8.11 (d, 1H, NH, J= 8.1 Hz), 8.02 (d, 1H, NH, J= 8.4 Hz), 7.87 – 7.08 (m, 11H, Aromat-H und NH), 6.82 (s, 1H, NH), 6.20 (brs, 1H, S=NH), 4.44 – 4.37/4.27 – 4.20 (2m, 1H, PheC\*H), 3.93 – 3.83/3.72 – 3.66 (2m, 1H, LeuC\*H), 2.99 – 2.78 (m, 2H, PheC\*HCH<sub>2</sub>), 2.54 (d, 3H, NHCH<sub>3</sub>, J= 4.6 Hz), 1.53 – 1.17 (m, 3H, LeuCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und LeuCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.82 – 0.71 (m, 6H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

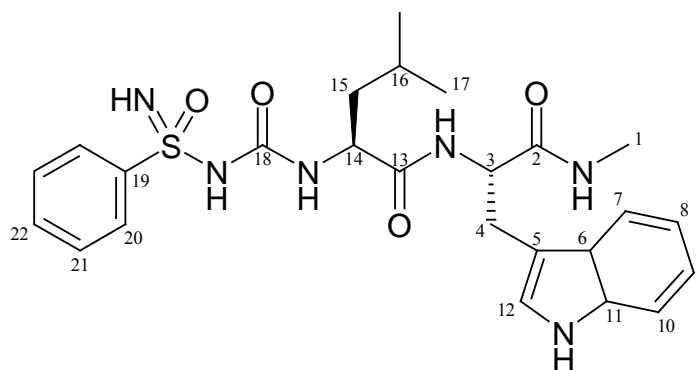
**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.0°C, 400MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 172.2/170.9/170.7/170.3 (C2/C9\*), 159.4/158.6 (C14), 143.8/140.8 (C15), 137.5/137.4 (C5), 132.1/131.7 (C18), 129.1/129.0 (C17), 128.6 (C6), 127.9 (2 Signale, C7), 126.8 (C8), 126.2/ 126.1 (C16), 54.0/53.7 (C3), 53.4/52.8 (C10), 41.9/40.8 (C11), 37.9/37.7 (C4), 25.4 (C1), 24.0/23.5 (C12), 22.8/22.7 (C13), 21.6/21.3 (C13')

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3430w, 3329s, 3064w, 3028w, 2955w, 2869w, 1642s, 1614s, 1538m, 1447w, 1367m, 1274m, 1240s, 1140m, 1091w, 963w, 785w, 748w, 687m, 571w, 518w, 484w, 444w, 430w

**N-[(Benzolsulfonimidoyl)-carbamoyl]-L-leucyl-L-tryptophan-N-methylamid (30b)**



**Ansatz:** 299 mg 28c (0.6 mmol)

97 mg N-Chlorbenzotriazol (0.63 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60

Elutionsmittel: Dichlormethan/ Methanol (9+1)

**Rf- Wert:** 0.224 (Dichlormethan/ Methanol (9+1))

**Ausbeute:** 112 mg (36% d. Th.)

**Fp.:** 195°C (Dichlormethan/Methanol (9+1))

**EA:** C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S [514.65]

ber.: C: 58.35 %    H: 6.66 %    N: 16.33 %    S: 6.23 %

gef.: C: 58.30 %    H: 6.82 %    N : 16.02%    S: 6.20 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 515 ( $[M+H]^+$ , 19)

 **$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 35.0°C, 500MHz) :**

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 10.72 (s, 1H, **NH**), 9.41 (s, 1H, **NH**), 8.22 (d, 1H, **NH**,  $J= 8.0$  Hz), 7.78 – 7.75 (m, 1H, **NH**), 7.73 – 7.71 (m, 3H, Aromat-C20-**H** und **NH**), 7.62 – 7.60 (m, 3H, Aromat-C22-**H** und Aromat-C21-**H**), 7.56 – 7.55 (m, 1H, Indol-C7-**H**), 7.33 – 7.31 (m, 1H, Indol-C10-**H**), 7.11 – 7.10 (m, 1H, Indol-C9-**H**), 7.06 – 7.03 (m, 1H, Indol-C8-**H**), 6.98 - 6.95 (m, 1H, Indol-C12-**H**), 6.53 (d, 1H, **NH**,  $J= 8.2$  Hz), 4.47 – 4.44 (m, 1H, TrpC\***H**), 4.32 – 4.30 (m, 1H, LeuC\***H**), 3.11 (dd, 1H, TrpC\***HCHH'**, A-Teil eines ABX-Systems,  $J_{\text{AX}}= 6.0$  Hz,  $J_{\text{AB}}= 14.7$  Hz), 2.97 (dd, 1H, TrpC\***HCHH'**,  $J_{\text{BX}}= 8.0$  Hz,  $J_{\text{AB}}= 14.7$  Hz), 2.54 (d, 3H, **NHCH**<sub>3</sub>,  $J= 4.6$  Hz), 1.52 – 1.49 (m, 1H, Leu**CH**(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.41 – 1.30 (m, 2H, LeuC\***HCH**<sub>2</sub>), 0.87 – 0.84 (m, 6H, Leu**CH**(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

 **$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 35.0°C, 500MHz) :**

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 171.4/171.3 (C2/C13\*), 154.4 (C18), 144.4 (C19), 135.9 (C11), 131.3 (C22), 129.1 (C21), 127.3 (C6), 124.6 (C20), 123.4 (C12), 120.7 (C8), 118.3 (C7), 118.1 (C9), 111.1 (C10), 109.9 (C5), 53.4 (C3), 51.6 (C14), 41.9 (C15), 27.8 (C4), 25.5 (C1), 24.0 (C16), 23.0 (C17), 21.8 (C17')

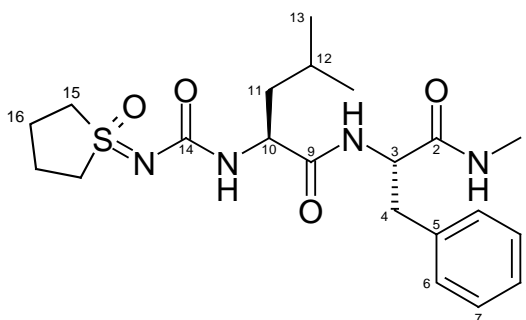
**IR (KBr):**

$\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3404w, 3337w, 3266m, 2959w, 2927w, 2911w, 1735w, 1719m, 1700w, 1685w, 1659w, 1633s, 1618w, 1570w, 1561w, 1540m, 1535m, 1523w, 1518w, 1508w, 1491w, 1474w, 1466w, 1458w, 1449w, 1437w, 1432w, 1420w, 1415w, 1401w, 1388w, 1286w, 1121s, 1092w, 745m, 685w

**Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Sulfoximinharnstoffdipeptide und Sulfodiiminharnstoffdipeptide (AAV13):**

Zu einer Lösung von 0.36 Äquivalenten Triphosgen in trockenem THF wird innerhalb einer halben Stunde eine Lösung von 1 Äquivalent der Dipeptidkomponente und 1.8 Äquivalenten Triethylamin in trockenem THF gelöst, zugetropft. Der Reaktionsansatz wird zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt und anschließend über eine N<sub>2</sub>-Fritte filtriert. Das Filtrat wird zu einer Lösung von 1 Äquivalent des Sulfoximids bzw. Sulfodiimids in trockenem THF getropft und über noch zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotavapor wird der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt.

**L-2-[3-(1-oxo-tetrahydro-1λ<sup>6</sup>-thiophen-1-yliden)-ureido]-isohexanoyl-L-phenylalanin-N-methylamid (36a)**



**Ansatz:** 291 mg H<sub>2</sub>N-Leu-Phe-NMe (1 mmol)  
110 mg Triphosgen (0.36 mmol)  
250 µl Triethylamin (1.8 mmol)  
120 mg Tetrahydrothiophensulfoximid (1 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatografie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Dichlormethan/ Methanol (9+1)

**Ausbeute:** 155 mg (37 % d. Th.)

**Fp.:** 155 - 157°C (Dichlormethan/ Methanol)

**EA:** C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S [436.58]

ber.: C: 57.78 % H: 7.39 % N: 12.83 % S: 7.34 %

gef.: C: 57.50 % H: 7.44 % N: 13.01 % S: 7.25 %

**MS** (EI, T= 160°C):

m/z (%) = 436 (M<sup>+</sup>, 1), 318 (33), 317 (100), 260 (12), 259 (35), 258 (15), 163 (26), 162 (72), 161 (56), 160 (54), 131 (29), 104 (15), 86 (14)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.0°C, 500MHz):

δ<sub>H</sub> (ppm) = 7.25 – 7.14 (m, 5H, Phenyl-H), 6.84 (s, 1H, NH), 6.71 (s, 1H, NH), 6.36 (s, 1H, NH), 4.93 – 4.86 (m, 1H, PheC\*H), 3.87 – 3.80 (m, 1H, LeuC\*H), 3.48 – 3.36 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>), 2.79 (d, 3H, NHCH<sub>3</sub>, J= 4.7 Hz), 2.02 – 1.92 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S), 1.69 – 1.48 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.32 – 1.12 (m, 2H, LeuC\*HCH<sub>2</sub>), 0.90 – 0.81 (m, 6H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

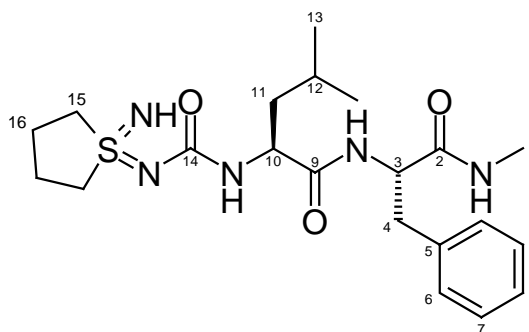
**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.0°C, 500MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 174.3/169.4 (C2/C9\*), 157.3 (C14), 136.4 (C5), 129.2 (C6), 128.6 (C7), 127.0 (C8), 60.4 (C3), 56.3 (C10), 55.5 (C15), 55.2 (C15'), 40.7 (C11), 34.7 (C4), 26.5 (C1), 24.9 (C16), 24.7 (C16'), 24.0 (C12), 22.9 (C13), 21.4 (C13')

**IR** (KBr):

ν (cm<sup>-1</sup>)= 3324m, 3057m, 2963m, 1712s, 1561w, 1420m, 1364m, 1266s, 1220s, 1141w, 1092w, 1002m, 964w, 738s, 704w, 531m, 422m

**L-2-[3-(1-Imino-tetrahydro-1 $\lambda^6$ -thiophen-1-yliden)-ureido]-isohexanoyl-L-phenylalanin-N-methylamid (36b)**



**Ansatz:** 437 mg H<sub>2</sub>N-Leu-Phe-NMe (1.5 mmol)  
 160 mg Triphosgen (0.54 mmol)  
 375  $\mu$ l Triethylamin (2.7 mmol)  
 177 mg Tetrahydrothiophensulfodiimid (1.5 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie mit Kieselgel 60  
 Elutionsmittel: Dichlormethan/Methanol (9+1)

**Ausbeute:** 140 mg (21 % d. Th.)

**Fp.:** 132°C (Dichlormethan/Methanol (9+1))

**EA:** C<sub>21</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S [435.59]

ber.: C: 57.91 % H: 7.64 % N: 16.08 % S: 7.36 %

gef.: C: 58.11 % H: 7.55 % N: 16.21 % S: 7.21 %

**MS (EI, T= 280°C):**

m/z (%) = 435 (M<sup>+</sup>, 2), 318 (31), 317 (100), 259 (12) 258 (36), 257 (15), 163 (27), 162 (73), 160 (53), 159 (52), 131 (30), 103 (16), 86 (15)

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 24.9°C, 500MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.26 – 7.14 (m, 5H, Aromat-**H**), 6.82 (s, 1H, **NH**), 6.70 (s, 1H, **NH**), 6.37 (s, 1H, **NH**), 4.92 – 4.86 (m, 1H, PheC\***H**), 3.86 – 3.81 (m, 1H, LeuC\***H**), 3.49 – 3.35 (m, 4H, **CH**<sub>2</sub>-S-**CH**<sub>2</sub>), 2.79 (d, 3H, **NCH**<sub>3</sub>, J= 4.7 Hz), 2.12 (s, 1H, **NH**), 2.02 – 1.92 (m, 4H, **CH**<sub>2</sub>-**CH**<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S), 1.68 – 1.48 (m, 1H, Leu**CH**(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.33 – 1.10 (m, 2H, LeuC\***HCH**<sub>2</sub>), 0.88 – 0.79 (m, 6H, Leu**CH**(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

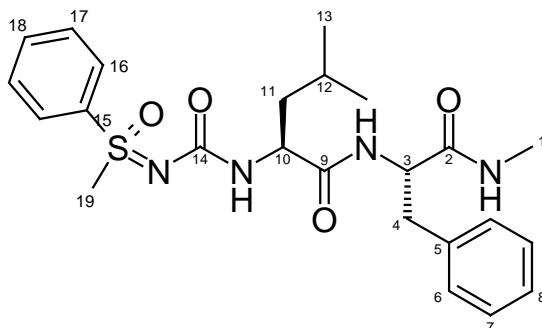
$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 25.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 174.1/173.5 (C2/C9\*), 160.8 (C14), 136.5 (C5), 129.0 (C6), 128.9 (C7), 127.0 (C8), 56.2 (C3), 55.8/55.6/55.2 (C10/C15/C15'\*), 40.6 (C11), 34.7 (C4), 25.4 (C1), 24.7 (C12), 24.3 (C16), 24.1 (C16'), 22.8 (C13), 21.8 (C13')

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3330m, 3062m, 2963m, 1720s, 1568w, 1425m, 1366m, 1270s, 1220s, 1135w, 1093w, 1008m, 964w, 738s, 704w, 531m, 422m

**N-(S-Methyl-S-phenylsulfoximidocarbonyl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid**  
**(36c)**



**Ansatz:** 583 mg H<sub>2</sub>N-Leu-Phe-NMe (2 mmol)

220 mg Triphosgen (0.72 mmol)

500  $\mu$ l Triethylamin (3.6 mmol)  
310 mg Phenylmethylsulfoximid (2 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie mit Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Dichlormethan/Methanol (9+1)

**Ausbeute:** 102 mg (5% d. Th.)

**Fp.:** 146°C (Dichlormethan/Methanol (9+1))

**EA:**  $C_{24}H_{32}N_4O_4S$  [472.61]

ber.: C: 60.99 % H: 6.82 % N: 11.85% S: 6.78 %

gef.: C: 61.17 % H: 6.74 % N: 11.99 % S: 6.62 %

**MS** (EI, 70eV, PT= 280°C):

m/z (%) = 472 ( $M^+$ , 2), 318 (31), 317 (100), 308 (40), 307 (15), 196 (56), 195 (55), 163 (25), 162 (70), 140 (16), 131 (26), 86 (13)

**$^1H$ -NMR** (DMSO- $d_6$ , 50.1°C, 500MHz):

$\delta_H$  (ppm) = 8.03 – 8.01 (m, 2H, Aromat-C16-H), 7.75 (d, 1H, NH, J = 8.7 Hz), 7.65 – 7.61 (m, 1H, Aromat-C18-H), 7.58 – 7.55 (m, 2H, Aromat-C17-H), 7.23 – 7.14 (m, 5H, Phenyl-H), 6.09 (d, 1H, NH, J= 4.4 Hz), 5.54 (d, 1H, NH, J= 4.8 Hz), 4.43 – 4.40 (m, 1H, PheC\*H), 3.71 – 3.67 (m, 1H, LeuC\*H), 3.12 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>), 3.11 – 3.07 (m, 1H PheC\*HCHH'), 2.85 – 2.80 (m, 1H PheC\*HCHH'), 2.57 (d, 3H, NHCH<sub>3</sub>, J= 4.6 Hz), 1.54 – 1.50 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.37- 1.31 (m, 1H LeuC\*HCHH'), 1.26 – 1.21 (m, 1H, LeuC\*HCHH'), 0.81 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J= 6.6 Hz), 0.75 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J= 6.4 Hz)



**Ausbeute:** 125 mg (13 % d. Th.)

**Fp.:** 158°C (Ethylacetat)

**EA:** C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S [471.63]

ber.: C: 61.62% H: 7.05 % N: 14.85 % S: 6.80 %

gef.: C: 61.54 % H: 7.22 % N: 14.66 % S: 6.77 %

**MS** (EI, 70eV, PT= 350°C):

m/z (%) = 471 (M<sup>+</sup>, 2), 318 (34), 317 (100), 309 (37), 197 (56), 196 (54), 163 (25), 162 (70), 139 (14), 131 (29), 86 (14), 77 (46), 65 (24)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

δ<sub>H</sub> (ppm) = 8.02 – 7.99 (m, 2H, Aromat-C16-**H**), 7.75 (d, 1H, **NH**, J = 8.7 Hz), 7.71 – 7.67 (m, 1H, Aromat-C18-**H**), 7.64 – 7.59 (m, 2H, Aromat-C17-**H**), 7.23 – 7.14 (m, 5H, Aryl-**H**), 6.09 (d, 1H, **NH**, J= 4.4 Hz), 5.54 (d, 1H, **NH**, J= 4.8 Hz), 4.43 (m, 1H, PheC\***H**), 3.71 – 3.67 (m, 1H, LeuC\***H**), 3.31 (s, 3H, S**CH**<sub>3</sub>), 3.11 – 3.07 (m, 1H PheC\***HCHH**'), 2.85 – 2.81 (m, 1H PheC\***HCHH**'), 2.71 (s, 1H, **NH**), 2.57 (d, 3H, **NHCH**<sub>3</sub>, J= 4.6 Hz), 1.56 – 1.52 (m, 1H, Leu**CH**(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.38- 1.32 (m, 1H LeuC\***HCHH**'), 1.26 – 1.22 (m, 1H, LeuC\***HCHH**'), 0.82 (d, 3H, Leu**CH**(**CH**<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)', J= 6.6 Hz), 0.76 (d, 3H, Leu**CH**(CH<sub>3</sub>)(**CH**<sub>3</sub>)', J= 6.4 Hz)

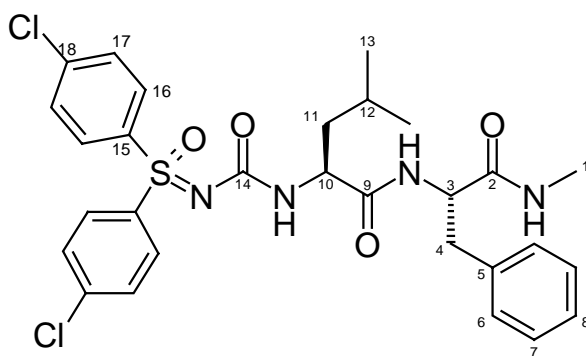
**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 171.1/171.0 (C2/C9\*), 158.8 (C14), 138.4 (C15), 136.7 (5), 133.9 (C18), 129.6 (C17), 129.0 (C6), 127.8/127.4 (C7/C16\*), 126.0 (C8), 53.1/ 53.0 (C3/C10\*), 46.1 (C19), 43.8 (C11), 37.9 (C4), 25.3 (C1), 23.8 (C12), 23.0 (C13), 21.6 (C13')

**IR (KBr):**

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3366w, 3288s, 2955s, 2929w, 2870w, 1768w, 1719s, 1700m, 1685m, 1654s, 1648s, 1636s, 1618m, 1560m, 1540m, 1466w, 1457w, 1437w, 1420w, 1390w, 1370w, 1322w, 1270w, 1221w, 1149w, 699w, 669w

**N-[S,S-Bis-(4-chlorphenyl)-sulfoximidocarbonyl]-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (36e)**



**Ansatz:** 437 mg H<sub>2</sub>N-Leu-Phe-NMe (1.5 mmol)  
160 mg Triphosgen (0.54 mmol)  
375  $\mu$ l Triethylamin (2.7 mmol)  
429 mg S,S-Bis-(4-Chlorphenyl)-sulfoximid (1.5 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie mit Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Ethylacetat

**Ausbeute:** 92 mg (10 % d. Th.)

**Fp.:** 189°C

**EA:** C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S [603.57]

ber.: C: 57.71 %    H: 5.34 %    N: 9.28 %    S: 5.31 %  
gef.: C: 57.59 %    H: 5.23 %    N: 9.19 %    S: 5.38 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 604 ([M+H]<sup>+</sup>, 19)

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.5°C, 400MHz):**

δ<sub>H</sub> (ppm) = 7.95 – 7.88 (m, 4H, Aromat-C17-H), 7.55 – 7.43 (m, 4H, Aromat-C16-H),  
7.25 – 7.14 (m, 5H, Aromat-H), 6.84 (s, 1H, NH), 6.71 (s, 1H, NH), 6.36 (s,  
1H, NH), 4.93 – 4.86 (m, 1H, PheC\*H), 3.87 – 3.80 (m, 1H, LeuC\*H), 2.79 (d,  
3H, NHCH<sub>3</sub>, J= 4.7 Hz), 1.69 – 1.48 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.32 – 1.12 (m,  
2H, LeuC\*HCH<sub>2</sub>), 0.90 – 0.81 (m, 6H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

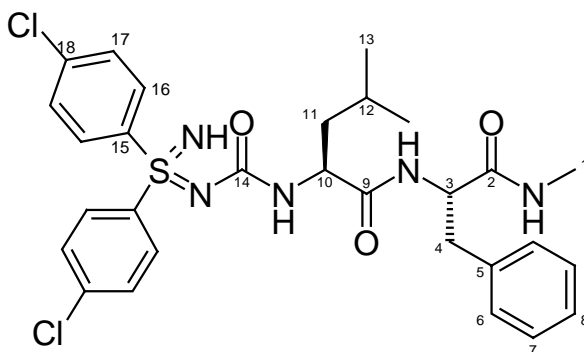
**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.5°C, 400MHz):**

δ<sub>C</sub> (ppm) = 174.1/171.6 (C2/C9\*), 160.8 (C14), 139.5/139.4 (C15/C15'), 138.8/138.7  
(C18/C18'), 136.5 (C5), 130.1/130.0 (C16/C16'), 129.6/129.5 (C17/C17'),  
129.0 (C6), 128.9 (C7), 127.0 (C8), 55.5 (C3), 52.8 (C10), 40.6 (C11), 34.7  
(C4), 25.4 (C1), 24.7 (C12), 23.2 (C13), 21.8 (C13')

**IR (KBr):**

ν (cm<sup>-1</sup>) = 3292s, 2965s, 2932w, 2883w, 1731s, 1680m, 1666s, 1632s, 1625m, 1553m,  
1537m, 1462, 1388w, 1369w, 1325m, 1265w, 1221m, 1185w, 1085m, 1065m,  
1149w, 845m, 702w, 595w, 580w, 510w, 490w, 475w, 445w

**N-[S,S-Bis-(4-chlorphenyl)-sulfodiimidocarbonyl]-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (36f)**



**Ansatz:** 583 mg H<sub>2</sub>N-Leu-Phe-NMe (2 mmol)  
 220 mg Triphosgen (0.72 mmol)  
 500 µl Triethylamin (3.6 mmol)  
 570 mg S,S-Bis-(4-Chlorphenyl)-sulfodiimid (2 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie mit Kieselgel 60  
 Elutionsmittel: Ethylacetat

**Ausbeute:** 96 mg (8% d. Th.)

**Fp.:** 244°C (Ethylacetat)

**EA:** C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S [602.59]

ber.: C: 57.80 %    H: 5.52 %    N: 11.62 %    S: 5.32 %

gef.: C: 57.58 %    H: 5.70 %    N: 11.68 %    S: 5.44 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 603 (M+H)<sup>+</sup>, 35)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 26.9°C, 400MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.96 – 7.87 (m, 4H, Aromat-C17-**H**), 7.56 – 7.44 (m, 4H, Aromat-C16-**H**), 7.25 – 7.14 (m, 5H, Aromat-**H**), 6.83 (s, 1H, **NH**), 6.70 (s, 1H, **NH**), 6.35 (s, 1H, **NH**), 4.92 – 4.85 (m, 1H, PheC\***H**), 3.86 – 3.81 (m, 1H, LeuC\***H**), 2.79 (d, 3H, **NHCH**<sub>3</sub>, J= 4.7 Hz), 2.43 (s, 1H, **NH**), 1.69 – 1.48 (m, 1H, Leu**CH**(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.32 – 1.12 (m, 2H, LeuC\***HCH**<sub>2</sub>), 0.90 (d, 3H, Leu**CH**(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, J= 6.7 Hz), 0.82 (d, 3H, Leu**CH**(**CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, J= 6.4 Hz)

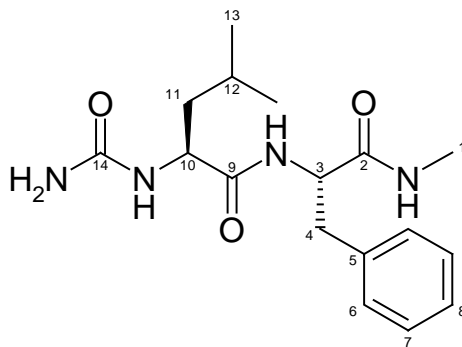
**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.1°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 174.7/171.3 (C2/C9\*), 161.2 (C14), 139.5/139.3 (C15/C15'), 138.7/138.6 (C18/C18'), 136.5 (C5), 130.1/130.0 (C16/C16'), 129.6/129.65(C17/C17'), 129.0 (C6), 128.9 (C7), 127.0 (C8), 55.5 (C3), 52.8 (C10), 40.6 (C11), 34.7 (C4), 25.4 (C1), 24.7 (C12), 23.2 (C13), 21.8 (C13')

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3350w, 3275s, 2935s, 1720s, 1663s, 1642s, 1542m, 1472w, 1455w, 1392w, 1366w, 1335w, 1295m, 1260w, 1223m, 1141w, 670w, 569w, 485w, 403w

**N-Carbamoyl-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (37)**



**Ansatz:** 291 mg H<sub>2</sub>N-L-Leu-L-Phe-NHMe (1 mmol) wird in 5 ml Eisessig gelöst. Dazu werden 100 mg KOCN (1.2 mmol) in 5 ml Wasser gelöst zugetropft und zwei Stunden auf 60°C erhitzt. Der beim Abkühlen ausfallende Niederschlag wird säulenchromatographisch gereinigt.

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Dichlormethan/Methanol (19+1)

**Ausbeute:** 106 mg (30.0% d. Th.)

**Fp.:** 215 – 216°C

**Rf- Wert:** 0.118 (Dichlormethan/Methanol (19+1))

**EA:** C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [334.42]

ber.: C: 61.06 %    H: 7.84 %    N: 16.75 %

gef.: C: 59.95%    H: 7.63 %    N: 16.59 %

**MS (EI, 70eV, PT = 300°C):**

m/z (%) = 334 (M<sup>+</sup>, 3), 317 (29), 259 (10), 163 (23), 162 (49), 161 (22), 160 (20), 157 (10), 131 (11), 129 (11), 120 (30), 87 (17), 86 (100)

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):**

δ<sub>H</sub> (ppm) = 7.75 (d, 1H, NH, J= 8.2 Hz), 7.72 (d, 1H, NH, J= 4.4 Hz), 7.24 – 7.14 (m, 5H, Phenyl-H), 6.06 (d, 1H, NH, J= 7.1 Hz), 5.64 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.43 – 4.39 (m, 1H, PheC\*H), 3.97 – 3.93 (m, 1H, LeuC\*H), 3.01 (dd, 1H, PheC\*HCHH', A-Teil eines ABX-Systems, J<sub>AX</sub>= 5.0 Hz, J<sub>AB</sub>= 13.8 Hz), 2.84 (dd, 1H, PheC\*HCHH', B-Teil eines ABX-Systems, J<sub>BX</sub>= 8.7 Hz, J<sub>AB</sub>= 13.8 Hz), 2.55 (d, 3H, NHCH<sub>3</sub>, J= 4.6 Hz), 1.53 – 1.49 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.33 – 1.22

(m, 2H, LeuC\*HCH<sub>2</sub>), 0.83 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J= 6.6 Hz), 0.80 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J= 6.6 Hz)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 172.6/170.9 (C2/C9\*), 158.4 (C14), 137.7 (C5), 128.9 (C6), 127.8 (C7), 125.9 (C9), 53.5 (C3), 52.0 (C10), 41.4 (C11), 37.2 (C4), 25.3 (C1), 23.9 (C12), 22.7 (C13), 21.6 (C13')

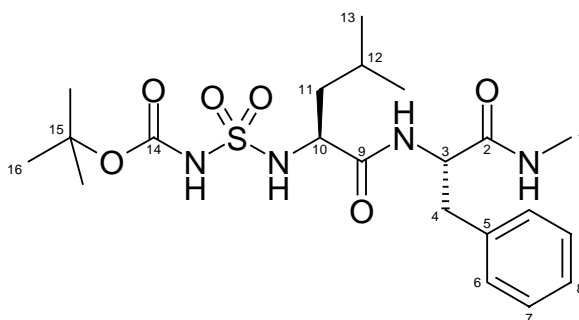
**IR (KBr):**

ν (cm<sup>-1</sup>) = 3445s, 3305s, 2956m, 2356w, 2330w, 1639s, 1542s, 1455w, 1414w, 1380w, 1262w, 1172w, 699w

### **Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung Boc-geschützter Sulfamoyldipeptide**

#### **(AAV6):**

Zu einem Equivalent Chlorsulfonylisocyanat in trockenem Dichlormethan wird bei 0°C eine Lösung von 1.1 Equivalenten t-Butanol in trockenem Dichlormethan zugetropft. Nach einer halben Stunde wird eine Lösung von 1 Equivalent der Aminkomponente und von 1.1 Equivalenten Triethylamin in trockenem THF dazugetroffen. Der Ansatz wird über Nacht gerührt, mit 2N KHSO<sub>4</sub> und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt.

**N-(t.-Butoxycarbonylsulfamoyl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (39a)**

**Ansatz:** 130  $\mu$ l Chlorsulfonylisocyanat (1.5 mmol)  
 122 mg t-Butanol (1.65 mmol)  
 230  $\mu$ l Triethylamin (1.65 mmol)  
 437 mg  $\text{H}_2\text{N-L-Leu-L-Phe-NMe}$  (1.5 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
 Elutionsmittel: Dichlormethan/ Methanol (9+1)

**Rf- Wert:** 0.246 (Dichlormethan/ Methanol (9+1))

**Ausbeute:** 203 mg (29 % d. Th.)

**Fp.:** 95 – 97°C (Dichlormethan/ Methanol)

**EA:**  $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$  [470.59]

ber.: C: 53.60 % H: 7.28 % N: 11.91 % S: 6.81 %

gef.: C: 53.38 % H: 7.00 % N: 11.93 % S: 6.78 %

**MS** (EI, 70eV, PT= 290°C):

m/z (%) = 470 ( $\text{M}^+$ , 2.8), 302 (100), 294 (73.8), 200 (77.2), 186 (60.2), 163 (77.0), 162 (79.8), 161 (80.1), 160 (65.4), 154 (46.5), 120 (67.3), 87 (48.9), 86 (57.9)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

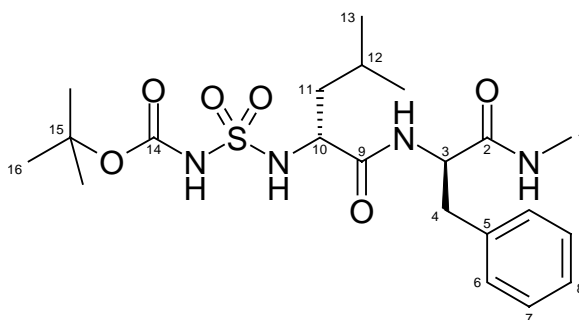
$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 10.86 (s, 1H, **NH**), 7.87 (d, 1H, **NH**, J= 8.7 Hz), 7.78 (d, 1H, **NH**, J= 7.7 Hz), 7.72 (d, 1H, **NH**, J= 4.6 Hz), 7.26 – 7.15 (m, 5H, Phenyl-**H**), 4.49 – 4.44 (m, 1H PheC\***H**), 3.70 – 3.64 (m, 1H LeuC\***H**), 2.99 (dd, 1H PheC\***HCHH'**, A-Teil eines ABX-Systems, J<sub>AX</sub>= 5.8 Hz, J<sub>AB</sub>= 13.8 Hz), 2.84 (dd, 1H PheC\***HCHH'**, B-Teil eines ABX-Systems, J<sub>BX</sub>= 8.5 Hz, J<sub>AB</sub>= 13.8 Hz), 2.56 (d, 3H, **NHCH<sub>3</sub>**, J= 4.6 Hz), 1.57 – 1.50 (m, 1H, Leu**CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**), 1.37 (s, 9H, (**CH<sub>3</sub>**)<sub>3</sub>C), 1.36 – 1.18 (m, 2H, LeuC\***HCH<sub>2</sub>**), 0.80 (tr, 6H, Leu**CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**), J= 7.0 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 170.9/ 170.7 (C2/C9\*), 150.3 (C14), 137.4 (C5), 129.0 (C6), 127.9 (C7), 126.1 (C8), 81.1 (C15), 55.7 (C3), 53.6 (C10), 41.2 (C11), 37.8 (C4), 27.6 (C16), 25.3 (C1), 23.6 (C12), 22.6 (C13), 21.6 (C13')

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>)= 3395s, 3294s, 3090w, 3032w, 2961m, 2936w, 2872w, 1735s, 1700w, 1654s, 1605w, 1560m, 1540s, 1535s, 1498w, 1456s, 1414w, 1396w, 1370s, 1249s, 1144s, 1083w, 1031w, 963m, 941m, 830m, 734m, 701m, 668w, 581m, 512w, 463w, 421w

**N-(tert-Butoxycarbonylsulfamoyl)-D-leucyl-D-phenylalanin-N-methylamid (39b)**

**Ansatz:** 160  $\mu$ l Chlorsulfonylisocyanat (1.8 mmol)  
148 mg t-Butanol (2 mmol)  
300  $\mu$ l Triethylamin (2 mmol)  
525 mg H<sub>2</sub>N-D-Leu-D-Phe-NMe (1.8 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Dichlormethan/Methanol (9+1)

**Rf- Wert:** 0.260 (Dichlormethan/Methanol (9+1))

**Ausbeute:** 348 mg (42.0% d. Th.)

**Fp.:** 101°C (Dichlormethan/Methanol (9+1))

**EA:** C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S [470.59]

ber.: C: 53.60 % H: 7.28 % N: 11.91 % S: 6.81 %

gef.: C: 53.33 % H: 7.02 % N: 11.88 % S: 6.66 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 471 ([M+H]<sup>+</sup>, 100)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 10.87 (s, 1H, **NH**), 7.86 (d, 1H, **NH**, J= 8.5 Hz), 7.80 (d, 1H, **NH**, J= 7.3 Hz), 7.25 – 7.15 (m, 5H, Phenyl-**H**), 5.74 (s, 1H, **NH**), 4.48 – 4.44 (m, 1H PheC\***H**), 3.70 – 3.65 (m, 1H LeuC\***H**), 3.01 – 2.97 (m, 1H PheC\***HCHH**'), 2.86 – 2.82 (m, 1H PheC\***HCHH**'), 2.55 (d, 3H, **NHCH<sub>3</sub>**, J= 4.6 Hz), 1.56 – 1.48 (m, 1H, Leu**CH**(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.41 (s, 9H, (**CH<sub>3</sub>**)<sub>3</sub>C), 1.37 – 1.12 (m, 2H, LeuC\***HCH<sub>2</sub>**), 0.80 (d, 3H, Leu**CHCH<sub>3</sub>**(CH<sub>3</sub>), J= 6.4 Hz), 0.79 (d, 3H, Leu**CHCH<sub>3</sub>**(**CH<sub>3</sub>**), J= 6.6 Hz)

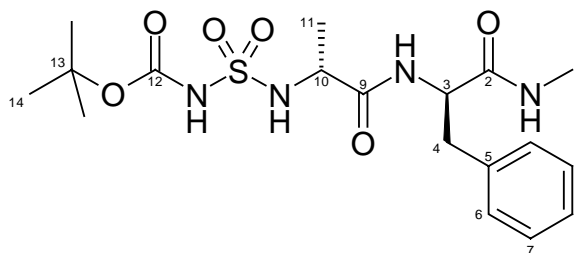
**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 170.9/ 170.7 (C2/C9\*), 150.3 (C14), 137.4 (C5), 129.1 (C6), 127.9 (C7), 126.1 (C8), 81.2 (C15), 55.7 (C3), 53.6 (C10), 41.2 (C11), 37.8 (C4), 27.6 (C16), 25.4 (C1), 23.6 (C12), 22.6 (C13), 21.6 (C13')

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>)= 3395s, 3294s, 3032w, 2961m, 2936w, 2872w, 1735s, 1654s, 1540s, 1535s, 1498w, 1456s, 1414w, 1370s, 1249s, 1144s, 1083w, 1031w, 963m, 941m, 830m, 734m, 701m, 668w, 581m, 512w, 463w, 421w

**N-(tert-Butoxycarbonylsulfamoyl)-D-alanyl-D-phenylalanin-N-methylamid (39c)**



**Ansatz:** 160  $\mu$ l Chlorsulfonylisocyanat (1.8 mmol)  
148 mg t-Butanol (2 mmol)

300  $\mu$ l Triethylamin (2 mmol)

449 mg H<sub>2</sub>N-D-Ala-D-Phe-NMe (1.8 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Dichlormethan/Methanol (19+1)

**Rf- Wert:** 0.256 (Dichlormethan/Methanol (19+1))

**Ausbeute:** 360 mg (47% d. Th.)

**Fp.:** 86°C

**EA:** C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S [428.51]

ber.: C: 50.45 %    H: 6.59 %    N: 13.07 %    S: 7.48 %

gef.: C: 50.30 %    H: 6.78 %    N: 12.92 %    S: 7.33 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 451 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100), 429 ([M+H]<sup>+</sup>, 53)

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):**

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 10.87 (s, 1H, NH), 7.80 (d, 1H, NH, J= 7.3 Hz), 7.72 (d, 1H, NH, J= 4.4 Hz),  
7.25 – 7.15 (m, 5H, Phenyl-H), 5.74 (s, 1H, NH), 4.48 – 4.44 (m, 1H  
PheC\*H), 3.84 – 3.80 (m, 1H AlaC\*H), 3.01 – 2.97 (m, 1H PheC\*HCHH'),  
2.86 – 2.82 (m, 1H PheC\*HCH'), 2.55 (d, 3H, NHCH<sub>3</sub>, J= 4.6 Hz), 1.41 (s,  
9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C), 1.33 (d, 3H, AlaC\*HCH<sub>3</sub>, J= 7.1 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):**

$\delta_c$  (ppm) = 171.7/170.9 (C2/C9\*), 150.3 (C12), 137.4 (C5), 129.1 (C6), 127.9 (C7), 126.1 (C8), 81.2 (C13), 55.7 (C3), 51.6 (C10), 37.8 (C4), 27.6 (C14), 25.4 (C1), 17.3 (C11)

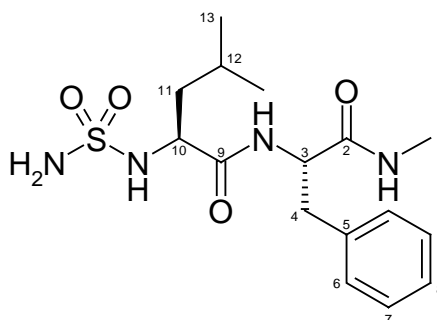
**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>)= 3293s, 3089m, 3032m, 2958s, 1654s, 1560m, 1522w, 1508m, 1498m, 1470w, 1456w, 1438w, 1408w, 1371w, 1319w, 1284w, 1221s, 1190s, 1080w, 1048s, 947w, 857s, 789w, 748w, 701m, 668w, 665w, 585m, 532w, 516w, 453w, 435w, 421w

**Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Entfernung der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure (AAV7):**

Das N-Boc-geschützte Derivat wird in Trifluoressigsäure gelöst und so lange bei Raumtemperatur gerührt, bis die Reaktion beendet ist (DC). Das Lösungsmittel wird am Rotavapor und an der Ölpumpe entfernt. Der erhaltene Rückstand wird mit trockenem Ether versetzt und das ausgefallene Produkt abgesaugt und mehrmals mit Ether gewaschen. Der Rückstand wird in Methanol gelöst und solange mit stark basischem Anionenaustauscher in OH-Form versetzt, bis die Lösung neutral reagiert. Die Lösung wird filtriert, eingengt und im Vakuum getrocknet.

**N-Sulfamoyl-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (40a)**



**Ansatz:** 150 mg 39a (0.3 mmol)

**Ausbeute:** 100 mg (90 % d. Th.)

**Fp.:** 127°C (Methanol)

**EA:** C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S [370.47]

ber.: C: 51.87 %    H: 7.07 %    N: 15.12 %    S: 8.65 %

gef.: C: 51.80 %    H: 6.95 %    N: 15.32%    S: 8.74 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 371 ([M+H]<sup>+</sup>, 100)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

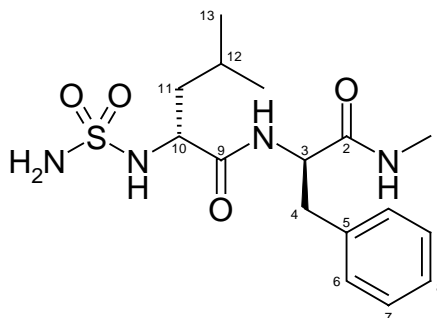
$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 10.87 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.90 (d, 1H, NH, J= 8.7 Hz), 7.76 (d, 1H, NH, J= 7.7 Hz), 7.72 (d, 1H, NH, J= 4.6 Hz), 7.26 – 7.15 (m, 5H, Phenyl-H), 4.49 – 4.44 (m, 1H PheC\*H), 3.70 – 3.64 (m, 1H LeuC\*H), 2.99 (dd, 1H PheC\*HCHH', A-Teil eines ABX-Systems, J<sub>AX</sub>= 5.8 Hz, J<sub>AB</sub>= 13.8 Hz), 2.84 (dd, 1H PheC\*HCHH', B-Teil eines ABX-Systems, J<sub>BX</sub>= 8.5 Hz, J<sub>AB</sub>= 13.8 Hz), 2.56 (d, 3H, NHC<sub>3</sub>, J= 4.6 Hz), 1.57 – 1.50 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.36 – 1.18 (m, 2H, LeuC\*HCH<sub>2</sub>), 0.80 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), J= 6.6 Hz), 0.78 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), J= 6.4 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 170.9/170.7 (C2/C9\*), 137.4 (C5), 129.0 (C6), 127.9 (C7), 126.1 (C8), 55.7 (C3), 53.6 (C10), 41.2 (C11), 37.8 (C4), 25.3 (C1), 23.6 (C12), 22.6 (C13), 21.6 (C13')

**IR (KBr):**

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>)= 3322s, 3087w, 3064w, 3033w, 2953s, 2932m, 2869w, 2847w, 1659s, 1628s, 1532s, 1498m, 1469m, 1544m, 1438w, 1411m, 1369m, 1319w, 1293w, 1252w, 1234w, 1198w, 1186w, 1154m, 1117w, 1096w, 1058w, 969w, 913w, 890w, 871w, 844m, 830m, 786w, 751s, 733m, 701s, 659m, 621w, 570w, 558w, 524w, 459w, 448w, 407w

**N-Sulfamoyl-D-leucyl-D-phenylalanin-N-methylamid (40b)**

**Ansatz:** 282 mg 39b (0.6 mmol)

**Ausbeute:** 160 mg (72% d. Th.)

**Fp.:** 131°C (Methanol)

**EA:** C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S [370.47]

ber.: C: 51.87 %    H: 7.07 %    N: 15.12 %    S: 8.65 %

gef.: C: 51.62%    H: 7.30 %    N: 15.03 %    S: 8.32 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 393 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100), 371 ([M+H]<sup>+</sup>, 32)

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 50.0°C, 500MHz):**

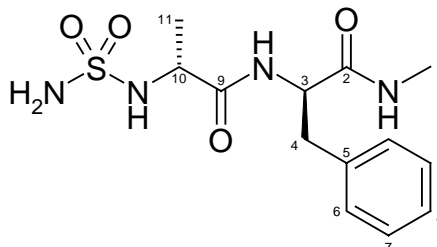
δ<sub>H</sub> (ppm) = 8.02 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.80 (d, 1H, NH, J= 7.3 Hz), 7.72 (d, 1H, NH, J= 4.4 Hz), 7.25 – 7.15 (m, 5H, Phenyl-H), 5.74 (s, 1H, NH), 4.48 – 4.44 (m, 1H PheC\*H), 3.70 – 3.65 (m, 1H LeuC\*H), 3.01 – 2.97 (m, 1H PheC\*HCHH'), 2.86 – 2.82 (m, 1H PheC\*HCHH'), 2.55 (d, 3H, NHCH<sub>3</sub>, J= 4.6 Hz), 1.56 – 1.48 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.37 – 1.12 (m, 2H, LeuC\*HCH<sub>2</sub>), 0.80 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J= 6.4 Hz), 0.79 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J= 6.6 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):**

δ<sub>C</sub> (ppm) = 170.9/ 170.7 (C2/C9\*), 137.4 (C5), 129.1 (C6), 127.9 (C7), 126.1 (C8), 81.2 (C15), 55.7 (C3), 53.6 (C10), 41.2 (C11), 37.8 (C4), 27.6 (C16), 25.4 (C1), 23.6 (C12), 22.6 (C13), 21.6 (C13')

**IR (KBr):**

ν (cm<sup>-1</sup>) = 3320s, 3088w, 3033w, 2953s, 2932m, 2869w, 1659s, 1628s, 1532s, 1498m, 1469m, 1544m, 1438w, 1411m, 1369m, 1293w, 1252w, 1198w, 1154m, 1117w, 1058w, 969w, 871w, 844m, 830m, 751s, 733m, 701s, 659m, 570w, 524w, 448w

**N-Sulfamoyl-D-alanyl-D-phenylalanin-N-methylamid (40c)**

**Ansatz:** 257 mg 39c (0.6 mmol)

**Ausbeute:** 124 mg (63% d. Th.)

**Fp.:** 156°C

**EA:** C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S [328.39]

ber.: C: 47.55 %    H: 6.14 %    N: 17.06 %    S: 9.76 %

gef.: C: 47.68%    H: 6.04%    N: 17.21 %    S: 9.98 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 329 ([M+H]<sup>+</sup>, 45)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.0°C, 500MHz):

δ<sub>H</sub> (ppm) = 8.60 (d, 1H, NH, J= 8.0 Hz), 8.07 (s, 2H, SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 8.00 (d, 1H, NH, J= 4.1 Hz), 7.29 – 7.18 (m, 5H, Phenyl-H), 4.48 – 4.43 (m, 1H, PheC\*H), 3.83 – 3.79 (m, 1H, AlaC\*H), 2.97 (dd, 1H, PheC\*HCHH', A-Teil eines ABX-Systems, J<sub>AB</sub>= 13.7 Hz, J<sub>AX</sub>= 5.3 Hz), 2.84 (dd, 1H, PheC\*HCHH', B-Teil eines ABX-Systems, J<sub>AB</sub>= 13.7 Hz, J<sub>BX</sub>= 8.9 Hz), 2.57 (d, 3H, NCH<sub>3</sub>, J= 4.6 Hz), 1.33 (d, 3H, AlaC\*HCH<sub>3</sub>, J= 7.1 Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 35.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 170.7/169.2 (C2/C9\*), 137.5 (C5), 129.0 (C6), 128.0 (C7), 126.3 (C8), 54.5 (C3), 48.0 (C10), 37.6 (C4), 25.4 (C1), 17.1 (C11)

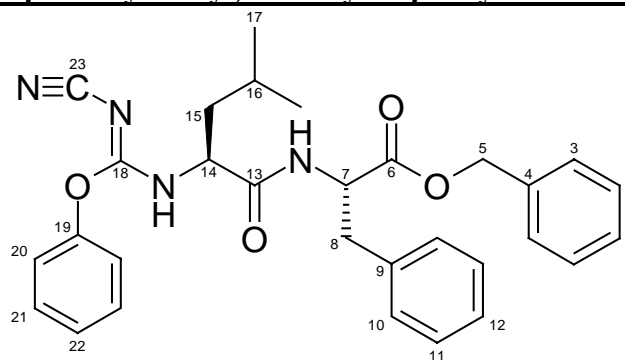
**IR** (KBr):

$\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )= 3301m, 3087m, 2947m, 1673s, 1653s, 1614w, 1525s, 1456w, 1418w, 1359w, 1238w, 1205s, 1183s, 1142s, 1078w, 1016w, 844s, 798s, 747m, 725m, 704m, 670m, 608w, 492w

**Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung Cyaniminophenoxymethyl-N-substituierter Dipeptide (AAV8):**

Ein Equivalent des entsprechenden Dipeptids wird mit einem Equivalent N-Cyaniminokohlensäurediphenylester in 50 ml Isopropanol suspendiert. Der Ansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird eventuell schon ausgefallenes Produkt über eine Nutsche abgesaugt. Das Filtrat wird am Rotavapor bis fast zu Trockne eingengt, mit Ether versetzt und der entstandene Niederschlag über eine Nutsche abgesaugt. Die vereinigten Niederschläge werden entweder aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert oder mittels „flash“-Chromatographie über Kieselgel gereinigt.

**N-(Cyaniminophenoxymethyl)-L-leucyl-L-phenylalaninbenzylester (42a)**



**Ansatz:** 477 mg N-Cyaniminokohlensäurediphenylester (2 mmol)  
965 mg Tfa\*H<sub>2</sub>N-Leu-Phe-OBz (2 mmol)  
0.31 ml Triethylamin (2.2 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Hexan/Ethylacetat (7+3)

**Rf- Wert:** 0.341 (Hexan/Ethylacetat (7+3))

**Ausbeute:** 926 mg (90 % d. Th.)

**Fp.:** 112°C (Hexan/ Ethylacetat)

**EA:** C<sub>30</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [512.61]

ber.: C: 70.29 %    H: 6.29 %    N: 10.93 %

gef.: C: 69.80 %    H: 6.26 %    N: 10.81 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 270°C):

m/z (%) = 512 (M<sup>+</sup>, 3), 419 (26), 418 (92), 373 (37), 283 (29), 238 (18), 193 (43), 192 (42), 181 (57), 131 (35), 94 (74), 91 (100), 65 (19)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 21.7°C, 400MHz):

δ<sub>H</sub> (ppm) = 7.44 – 6.95 (m, 15H, Aromat-H), 6.73 (d, 1H, NH, J=8.0 Hz), 6.51 (d, 1H, NH, J= 6.9 Hz), 5.18 – 5.08 (m, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>), 4.94 – 4.83 (m, 1H, PheC\*H), 4.38 – 4.35 (m, 1H LeuC\*H), 3.20 – 3.04 (m, 2H, PheC\*HCH<sub>2</sub>), 1.75 – 1.45 (m, 3H, LeuCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und LeuCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.95 – 0.83 (m, 6H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

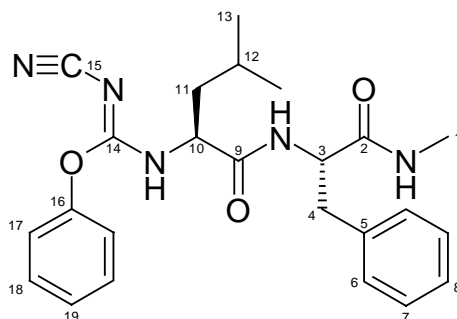
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $25.1^\circ\text{C}$ ,  $400\text{MHz}$ ):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 171.1/170.3 (C6/C13\*), 163.2 (C18), 150.9 (C19), 135.5/135.0 (C4/C9\*), 130.7 (C10), 129.5/129.3 (C2/C11\*), 128.6 (2 Signale, C3/C21\*), 127.1/126.8 (12/C22\*), 114.7 (C23), 67.4 (C5), 55.9 (C7), 53.2 (C14), 40.8 (C15), 37.7 (C8), 24.7 (C16), 22.8 (C17), 21.6 (C17')

**IR** (KBr):

$\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3322m, 3259m, 3071w, 2956m, 2872w, 2362w, 2192s, 1740s, 1653s, 1629s, 1559s, 1491m, 1464m, 1456s, 1429s, 1389m, 1348m, 1253m, 1209s, 1113w, 1023w, 971w, 866w, 812w, 753m, 697m, 633w, 559w, 486w

**N-(Cyaniminophenoxymethyl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (42b)**



**Ansatz:** 1013 mg N-Cyaniminokohlensäurediphenylester (4.25 mmol)  
1238 mg  $\text{H}_2\text{N-Leu-Phe-NMe}$  (4.25 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel  
Elutionsmittel: Hexan/ Ethylacetat (2+3)

**Rf-Wert:** 0.176 (Hexan/ Ethylacetat (2+3))

**Ausbeute:** 1.360 g (74 % d. Th.)

**Fp.:** 175°C (Hexan/ Ethylacetat)

**EA:** C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [435.53]

ber.: C: 66.18 %      H: 6.71 %      N: 16.08 %

gef.: C: 66.50 %      H: 6.69 %      N: 15.30 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 140°C):

m/z (%) = 435 (M<sup>+</sup>, 5), 340 (36), 283 (45), 207 (20), 160 (100), 137 (22), 124 (21), 103 (29), 94 (25), 91 (34), 84 (28), 68 (22), 58 (26)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 49.9°C, 400MHz):

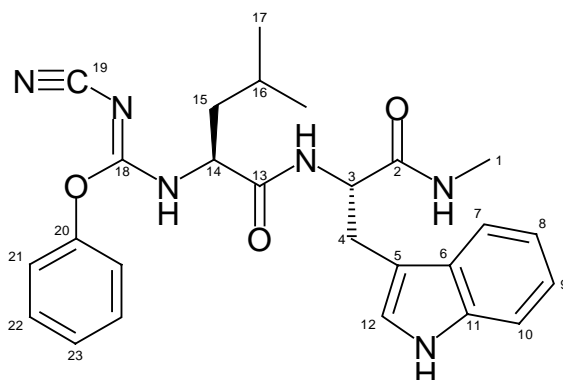
δ<sub>H</sub> (ppm) = 8.80/8.62 (2brs, 1H, NH), 8.19 (s, 1H, NH), 7.96/7.90 (2brs, 1H, NH), 7.42 – 7.01 (m, 10H, Aromat-H), 4.52 (brm, 1H, PheC\*H), 4.31 (brm, 1H, LeuC\*H), 3.00 – 2.81 (m, 2H, PheC\*HCH<sub>2</sub>), 2.58 (s, 3H, NHCH<sub>3</sub>), 1.73 – 1.43 (m, 3H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und LeuC\*HCH<sub>2</sub>), 0.82/0.80 (2s, 6H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 49.9°C, 400MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 171.0/170.3/170.1 (C2/C9\*), 161.9/159.2 (C14), 152.4/151.0 (C16), 137.5 (C5), 130.0/129.4 (C18), 129.0 (C6), 127.9 (C7), 126.1 (C8), 125.3 (C19), 121.3/118.4 (C17), 113.6/113.5 (C15), 54.9 (C3), 54.0/53.7 (C10), 40.2 (C11), 37.8 (C4), 25.4 (C1), 24.1 (C12), 22.8 (C13), 21.1 (C13')

**IR** (KBr):

ν (cm<sup>-1</sup>) = 3293m, 3078w, 2956w, 2194s, 1651s, 1622s, 1545m, 1495w, 1428m, 1211m, 763w, 695w, 622w, 512w

**N-(Cyaniminophenoxymethyl)-L-leucyl-L-tryptophan-N-methylamid (42c)**

**Ansatz:** 953 mg N-Cyaniminokohlensäurediphenylester (4 mmol)

1332 mg H<sub>2</sub>N-Leu-Trp-NMe (4 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60

Elutionsmittel: Hexan/Ethylacetat (2+3)

**Rf- Wert:** 0.242 (Hexan/Ethylacetat (2+3))

**Ausbeute:** 907 mg (48 % d. Th.)

**Fp.:** 115°-120°C (Hexan/ Ethylacetat)

**EA:** C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [474.57]

ber.: C: 65.81 %    H: 6.37 %    N: 17.71 %

gef.: C: 65.09 %    H: 6.37 %    N: 16.95 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 987 ([2M+K]<sup>+</sup>, 8), 971 ([2M+Na]<sup>+</sup>, 100), 949 (2M+H)<sup>+</sup>, 28), 497 ([M+Na]<sup>+</sup>, 83), 475 ([M+H]<sup>+</sup>, 28)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 34.9°C, 500MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 10.74 (s, 1H, NH), 8.76 – 8.62 (m, 1H, NH), 8.22 – 8.17 (m, 1H, NH), 7.89 – 7.82 (m, 1H, NH), 7.56 – 7.54 (m, 1H, Indol-C7-H), 7.42 – 7.36 (m, 2H, Phenoxy-C22-H), 7.33 – 7.31 (m, 1H, Indol-C10-H), 7.27 – 7.24 (m, 1H, Phenoxy-C23-H), 7.16 – 7.10 (m, 2H, Phenoxy-C21-H), 7.07 – 7.04 (m, 2H, Indol-C8-H und Indol-C9-H), 6.97 (s, 1H, Indol-C11-H), 4.57 – 4.49 (m, 1H, TrpC\*-H), 4.34 (brm, 1H, LeuC\*-H), 3.08 – 2.99 (m, 2H, TrpC\*HCH<sub>2</sub>), 2.55 (d, 3H, NHCH<sub>3</sub>, J= 4.6 Hz), 1.80 – 1.41 (m, 3H, LeuCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und LeuCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.90 – 0.89 (m, 6H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 171.3/170.3/170.0 (C2/C13\*), 161.9/159.3 (C18), 152.3/151.0 (C20), 136.1 (C11), 130.1/129.4 (C22), 127.3 (C6), 126.1/125.5 (C23), 123.2 (C12), 121.2/118.6 (C21), 120.7 (C8), 118.3 (C7), 118.1 (C9), 114.0/113.5 (C19), 111.2 (C10), 109.8 (C5), 54.9 (C3), 53.6/53.4 (C14), 39.8/39.6 (C15), 28.1/27.9 (C4), 25.5 (C1), 24.2 (C16), 22.9 (C17), 21.1 (C17')

**IR** (KBr):

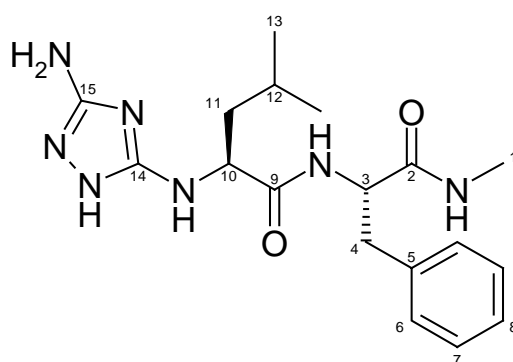
$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3287s, 3059w, 2957m, 2367w, 2197s, 1623s, 1538m, 1489w, 1458w, 1434m, 1342w, 1207m, 1096w, 1024w, 747m, 691w, 554w

**Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung N-(5-Amino-2H-[1,2,4]triazol-3-yl)-dipeptide (AAV9):**

1 mmol des entsprechenden 3-Cyano-2-phenyl-isoharnstoffes wird in 50 ml Isopropanol suspendiert, mit 1,3 mmol Hydrazinhydrat versetzt und 4h unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird der ölige Rückstand mit

Diethylether versetzt, wodurch Kristallisation eintritt. Der Niederschlag wird abgenuscht und säulenchromatographisch gereinigt.

**N-(5-Amino-2H-[1,2,4]triazol-3-yl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (43a)**



**Ansatz:** 436 mg 42b (1 mmol)  
65 mg Hydrazinhydrat (1.1 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Isopropanol

**Ausbeute:** 339 mg (91% d. Th.)

**Fp.:** 250°C (Isopropanol)

**EA:** C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> [373.46]

ber.: C: 57.89 %    H: 7.29 %    N: 26.25 %

gef.: C: 57.92 %    H: 7.08 %    N: 25.25 %

**HRMS:** kalkuliert: 373.222623  
gefunden: 373.223244

**MS** (EI, 70eV, PT = 300°C):

m/z (%) = 374 ([M+H]<sup>+</sup>, 4), 373 (M<sup>+</sup>, 16), 317 (5), 299 (3), 256 (11), 169 (18), 168 (100), 153 (5), 126 (11), 120 (8), 112 (9), 99 (4)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

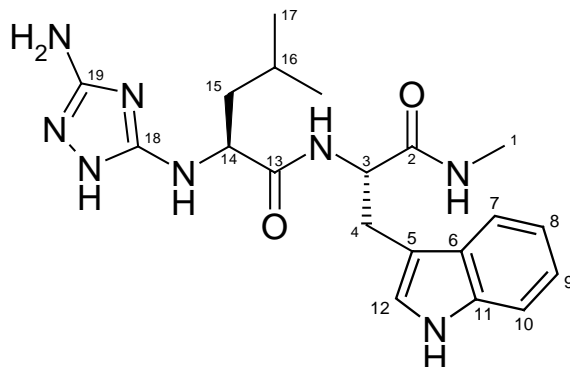
δ<sub>H</sub> (ppm) = 10.83 (s, 1H, **NH**), 7.75 (d, 1H, **NH**, J = 8.7 Hz), 7.62 (d, 1H, **NH**, J = 4.4 Hz), 7.23 – 7.14 (m, 5H, Phenyl-**H**), 5.54 (d, 1H, **NH**, J = 4.8 Hz), 5.45 (brs, 2H, Triazol-**NH**), 4.43 (sext, 1H, PheC\***H**, J = 4.6 Hz), 3.71 – 3.67 (m, 1H, LeuC\***H**), 3.11 – 3.07 (m, 1H, PheC\***HCHH**'), 2.85 – 2.80 (m, 1H PheC\***HCHH**'), 2.57 (d, 3H, **NHCH**<sub>3</sub>, J = 4.6 Hz), 1.54 – 1.50 (m, 1H, Leu**CH**(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.37- 1.31 (m, 1H LeuC\***HCHH**'), 1.26 – 1.21 (m, 1H, LeuC\***HCHH**'), 0.81 (d, 3H, Leu**CHCH**<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J = 6.6 Hz), 0.75 (d, 3H, Leu**CHCH**<sub>3</sub>(**CH**<sub>3</sub>), J = 6.4 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 173.2/171.1 (C2/C9\*), 160.6 (C15), 157.2 (C14), 138.1 (C5), 129.0 (C6), 127.8 (C7), 126.0 (C8), 56.4 (C3), 53.3 (C10), 41.3 (C11), 36.9 (C4), 25.6 (C1), 24.1 (C12), 22.7 (C13), 21.9 (C13')

**IR** (KBr):

ν (cm<sup>-1</sup>) = 3305s, 3032m, 2959w, 2934w, 2871w, 1659s, 1569s, 1546s, 1526s, 1498m, 1470w, 1455w, 1412w, 1367w, 1325w, 1282w, 1259w, 1167w, 1120w, 1061w, 1032w, 855w, 813w, 749w, 700w, 669w, 616w, 489w, 414w

**N-(5-Amino-2H-[1,2,4]triazol-3-yl)-L-leucyl-L-tryptophan-N-methylamid (43b)**

**Ansatz:** 475 mg 42c (1 mmol)  
65 mg Hydrazinhydrat (1.1 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Dichlormethan/ Methanol (9+1)

**Rf- Wert:** 0.195 (Dichlormethan/ Methanol (9+1))

**Ausbeute:** 167 mg (41 % d. Th.)

**Fp.:** 230° - 232°C (Dichlormethan/Methanol)

**EA:** C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub> [412.50]

ber.: C: 58.24 %    H: 6.84 %    N: 27.16 %

gef.: C: 57.56 %    H: 6.80 %    N: 29.22 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 300°C):

m/z (%) = 412 (M<sup>+</sup>, 35), 296 (41), 295 (97), 252 (83), 240 (68), 239 (100), 213 (31), 200 (63), 169 (30), 168 (68), 130 (56), 99 (34)

**$^1\text{H-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 35.0°C, 500MHz):

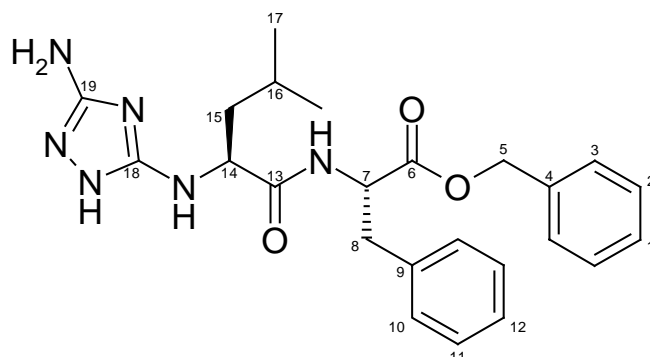
$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 10.83 (brs, 1H, **NH**), 10.72 (s, 1H, **NH**), 7.74 (d, 1H, **NH**,  $J= 8.2$  Hz), 7.68 (d, 1H, **NH**,  $J= 4.6$  Hz), 7.52 – 7.50 (m, 1H, Indol-C7-**H**), 7.31 – 7.29 (m, 1H, Indol-C10-**H**), 7.04 – 7.02 (m, 2H, Indol-C8-**H** und Indol-C9-**H**), 6.97 - 6.94 (m, 1H, Indol-C12-**H**), 5.58 (brs, 2H, Triazol-N**H**<sub>2</sub>), 4.46 – 4.42 (m, 1H, TrpC\***H**), 3.71 (brm, 1H, LeuC\***H**), 3.17 (dd, 1H, TrpC\*HC**HH**′, A-Teil eines ABX- Systems,  $J_{\text{AX}}= 4.8$  Hz,  $J_{\text{AB}}= 14.7$  Hz), 2.98 (dd, 1H, TrpC\*HC**HH**′, B-Teil eines ABX- Systems,  $J_{\text{BX}}= 8.5$  Hz,  $J_{\text{AB}}= 14.7$  Hz), 2.56 (d, 3H, NHC**H**<sub>3</sub>,  $J= 4.6$  Hz), 1.61 – 1.52 (m, 1H, LeuC**H**(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.38 – 1.25 (m, 2H, LeuC\*HC**H**<sub>2</sub>), 0.81 (d, 3H, LeuC**H**<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>),  $J= 6.6$  Hz), 0.75 (d, 3H, LeuCH<sub>3</sub>(**CH**<sub>3</sub>),  $J= 6.4$  Hz)

 **$^{13}\text{C-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 35.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 173.3/171.5 (C2/C13\*), 161.6 (C19), 157.3 (C18), 136.0 (C11), 127.3 (C6), 123.1 (C12), 120.7 (C8), 118.3 (C7), 118.1 (C9), 111.1 (C10), 110.2 (C5), 56.3 (C3), 52.9 (C14), 41.2 (C15), 27.1 (C4), 25.6 (C1), 24.1 (C16), 22.8 (C17), 21.7 (C17′)

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3418s, 3333s, 2959m, 2872w, 2365w, 1632s, 1573s, 1459m, 1438m, 1414m, 1369w, 1262w, 1230w, 1167w, 1087w, 1060w, 815w, 783w, 734m, 691w, 675w, 661w, 596w, 536w, 523w, 507w, 493w, 476w, 447w, 429w, 414w

**N-(5-Amino-2H-[1,2,4]triazol-3-yl)-L-leucyl-L-phenylalaninbenzylester (43c)**

**Ansatz:** 769 mg 42a (1.5 mmol)  
83 mg Hydrazinhydrat (1.65 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Isopropanol

**Ausbeute:** 524 mg (80 % d. Th.)

**Fp.:** 228°C

**EA:** C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [450.55]

ber.: C: 63.98 %    H: 6.71 %    N: 18.65 %

gef.: C: 63.67 %    H: 6.62%    N: 18.07 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 270°C):

m/z (%) = 450 (M<sup>+</sup>, 10), 420 (9), 378 (15), 377 (7), 335 (16), 327 (8), 258 (12), 192 (8),  
169 (11), 168 (100), 120 (11), 91 (41)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

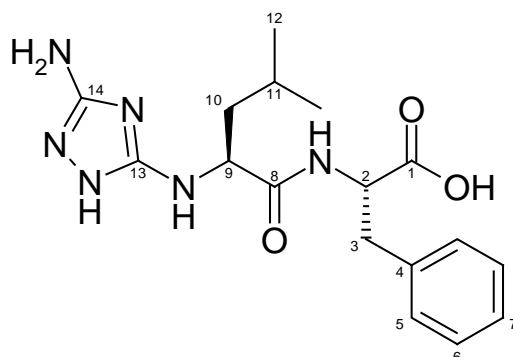
$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 10.62 (s, 1H, NH), 8.07 (s, 1H, NH), 7.35 – 7.13 (m, 10H, Aromat-H), 5.04 (d, 2H, Benzyl-CH<sub>2</sub>, J= 3.7 Hz), 4.56 – 4.52 (m, 1H, PheC\*H), 3.97 – 3.96 (m, 1H, LeuC\*H), 3.04 (dd, 1H, PheC\*HCHH' , A-Teil eines ABX-Systems, J<sub>AX</sub>= 5.7 Hz, J<sub>AB</sub>=, 13.7 Hz), 2.95 (dd, 1H, PheC\*HCHH' , B-Teil eines ABX-Systems, J<sub>BX</sub>= 8.2 Hz, J<sub>AB</sub>=, 13.7 Hz), 1.63 – 1.59 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.38 – 1.35 (m, 2H, LeuC\*HCH<sub>2</sub>), 0.83 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J= 6.6 Hz), 0.80 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J= 6.6 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 170.9/169.2 (C6/C13\*), 161.7 (C19), 154.5 (C18), 136.7 (C4), 135.5 (C9), 128.9 (C10), 128.1/127.9/127.7/127.6 (C3/C11/C1/C2\*), 126.2 (C12), 65.8 (C5), 54.9 (C7), 51.2 (C14), 41.5 (C15), 36.7 (C8), 24.0 (C16), 22.7 (C17), 21.7 (C17')

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3370m, 3323w, 2927m, 2867w, 1740w, 1734m, 1726s, 1719m, 1716w, 1700w, 1697w, 1685m, 1676w, 1670w, 1664w, 1654m, 1647m, 1636s, 1629s, 1618s, 1591m, 1577m, 1570w, 1565w, 1560m, 1555w, 1546m, 1540m, 1530w, 1508w, 1457w, 1437m, 1425w, 1420m, 1346w, 1278w, 1231w, 1179m, 1122w, 754m, 699m, 585w

**N-(5-Amino-2H-[1,2,4]triazol-3-yl)-L-leucyl-L-phenylalanin (43d)**

**Ansatz:** 351 mg 43c (0.8 mmol) werden in THF/Wasser suspendiert und mit LiOH (1 mmol) versetzt, wobei sich der Ansatz löst. Der Reaktionsverlauf wird mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach beendeter Umsetzung wird der Ansatz mit verdünnter Salzsäure neutralisiert, vom Lösungsmittel befreit und aus Ethanol umkristallisiert.

**Ausbeute:** 223 mg (77 % d. Th.)

**Fp.:** 272°C (Zersetzung)

**EA:** C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [360.42]

ber.: C: 56.65 %    H: 6.71 %    N: 23.32 %

gef.: C 56.52 %    H: 6.70 %    N: 23.28 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 360°C):

m/z (%) = 360 (M<sup>+</sup>, 3), 294 (100), 203 (45), 175 (77), 169 (54), 168 (91), 126 (66), 120 (65), 112 (49), 106 (41), 104 (45), 92 (42), 91 (63)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, Methanol-d<sub>4</sub>, 35.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.18 – 7.09 (m, 5H, Phenyl-**H**), 4.29 – 4.27 (m, 1H, PheC\***H**), 3.96 – 3.93 (m, 1H, LeuC\***H**), 3.14 (dd, 1H, PheC\*HC**H**H', A-Teil eines ABX-Systems,  $J_{\text{AX}} = 5.0$  Hz,  $J_{\text{AB}} = 13.3$  Hz), 2.97 (dd, 1H, PheC\*HC**H**H', B-Teil eines ABX-Systems,  $J_{\text{BX}} = 6.0$  Hz,  $J_{\text{AB}} = 13.3$  Hz), 1.72 – 1.67 (m, 1H, Leu**C**(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.55 – 1.42 (m, 2H, LeuC\*HC**H**<sub>2</sub>), 0.91 (d, 3H, LeuCHC**H**<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>),  $J = 6.6$  Hz), 0.87 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(**C**H<sub>3</sub>),  $J = 6.4$  Hz)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, Methanol-d<sub>4</sub>, 35.0°C, 500MHz):

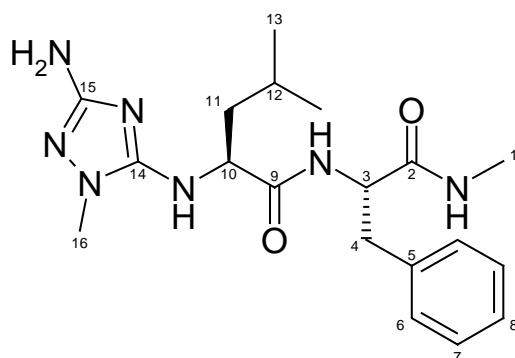
$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 175.6/173.9 (C1/C8\*), 139.1 (C4), 130.4 (C5), 128.3 (C6), 126.4 (C7), 56.6 (C2), 56.3 (C9), 42.6 (C10), 38.4 (C3), 25.2 (C11), 23.2 (C12), 21.9 (C12')

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3342brs, 2958w, 1700w, 1599s, 1516s, 1420s, 1369w, 1344w, 1259w, 1170w, 1091w, 1060w, 873w, 843w, 783w, 742w, 701m, 668w, 618w, 571w, 488w

**Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung N-(5-Amino-2-methyl-2H-[1,2,4]triazol-3-yl)-dipeptide (AAV10):**

1 mmol des entsprechenden Cyaniminophenoxymethyl-N-substituierten Dipeptids wird in 80 ml Isopropanol suspendiert, mit 1ml Methylhydrazin versetzt und 2h unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird der ölige Rückstand mit Diethylether versetzt, wodurch Kristallisation eintritt. Der Niederschlag wird abgenuscht und säulenchromatographisch gereinigt.

**N-(5-Amino-2-methyl-2H-[1,2,4]triazol-3-yl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid****(44a)**

**Ansatz:** 436 mg 42b (1 mmol)  
60 mg Methylhydrazin (1.3 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel  
Elutionsmittel: Dichlormethan/ Methanol (9+ 1)

**Rf- Wert:** 0.435 (Dichlormethan/Methanol (9+1))

**Ausbeute:** 405 mg (73 % d. Th.)

**Fp.:** 147°C- 151°C (Dichlormethan/Methanol)

**EA:** C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> [387.49]

ber.: C: 58.89 %    H: 7.57 %    N: 25.30 %

gef.: C: 57.44 %    H: 7.33 %    N: 23.43 %

**HRMS:** C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>

kalkuliert: 387.238273

gefunden: 387.241020

**MS** (EI, 70eV, PT = 340°C):

m/z (%) = 388 ([M+H]<sup>+</sup>, 4), 387 (M<sup>+</sup>, 17), 331 (1), 330 (1), 210 (1), 184 (1), 183 (12), 182 (100), 181 (2), 179 (1), 140 (1), 113 (1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

δ<sub>H</sub> (ppm) = 7.82 (d, 1H, NH, J= 8.5 Hz), 7.59 (d, 1H, NH, J= 4.6 Hz), 7.23 – 7.14 (m, 5H, Phenyl-H), 6.18 (d, NH, J= 6.9 Hz), 4.74 (s, 2H, Triazol-NH<sub>2</sub>), 4.45 – 4.40 (m, 1H, PheC\*H), 3.87 – 3.83 (m, 1H, LeuC\*H), 3.34 (s, 3H, Triazol-NHCH<sub>3</sub>), 3.13 – 3.09 (m, 1H, PheC\*HCHH'), 2.84 (dd, 1H, PheC\*HCHH', B-Teil eines ABX-Systems, J<sub>BX</sub>= 9.6 Hz, J<sub>AB</sub>= 14.0 Hz), 2.61 (d, 3H, NCH<sub>3</sub>, J= 4.6 Hz), 1.62 – 1.58 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.46 – 1.41 (m, 1H, LeuC\*HCHH'), 1.34 – 1.28 (m, 1H, LeuC\*HCHH'), 0.84 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J= 6.4 Hz), 0.78 (d, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J= 6.6 Hz)

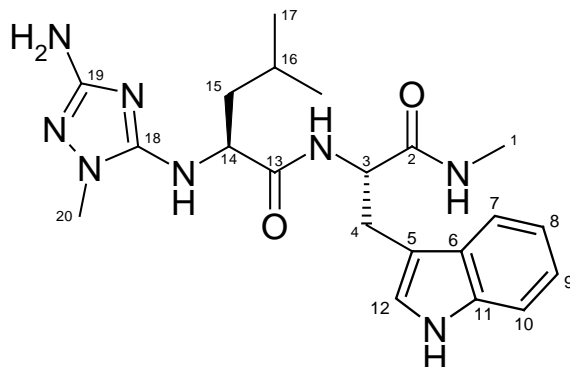
**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 172.5/170.9 (C2/C9\*), 159.7 (C15), 153.8 (C14), 137.9 (C5), 128.8 (C6), 127.7 (C7), 125.8 (C8), 56.2 (C3), 53.4 (C10), 40.5 (C11), 36.8 (C4), 32.5 (C16), 25.5 (C1), 23.9 (C12), 22.5 (C13), 21.4 (C13')

**IR** (KBr):

ν (cm<sup>-1</sup>) = 3305s, 3032m, 2959w, 2871w, 1659s, 1569s, 1526s, 1498m, 1455w, 1412w, 1367w, 1325w, 1282w, 1259w, 1167w, 1120w, 1061w, 1032w, 855w, 813w, 749w, 700w, 669w, 616w, 489w

**N-(5-Amino-2-methyl-2H-[1,2,4]triazol-3-yl)-L-leucyl-L-tryptophan-N-methylamid**  
**(44b)**



**Ansatz:** 392 mg 42c (0.8 mmol)  
2 ml Methylhydrazin

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Dichlormethan/Methanol (19+1)

**Rf- Wert:** 0.130 (Dichlormethan/Methanol (19+1))

**Ausbeute:** 240 mg (70 % d. Th.)

**Fp.:** 131°C (Dichlormethan/Methanol (19+1))

**EA:** C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub> × H<sub>2</sub>O [444.54]

ber.: C: 56.74 %    H: 6.80 %    N: 25.21 %

gef.: C: 57.10 %    H: 6.91 %    N: 24.40 %

**HRMS:** C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>  
berechnet: 426.249173  
gefunden: 426.250996

**MS** (EI, 70eV, PT = 240°C):

m/z (%) = 427 ([M+H]<sup>+</sup>, 8), 426 (M<sup>+</sup>, 27), 368 (5), 297 (6), 227 (8), 226 (5), 200 (5), 183 (16), 182 (100), 140 (7), 130 (7), 113 (5)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.0°C, 500MHz):

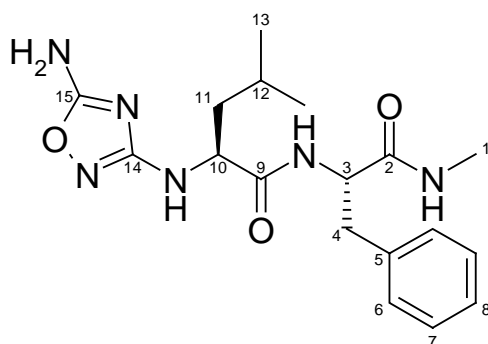
δ<sub>H</sub> (ppm) = 10.74 (brs, 1H, NH), 7.81 (d, 1H, NH, J= 8.2 Hz), 7.65 (d, 1H, NH, J= 4.6 Hz), 7.51 – 7.50 (m, 1H, Indol-C7-H), 7.32 – 7.29 (m, 1H, Indol-C10-H), 7.05 – 7.01 (m, 2H, Indol-C8-H und Indol-C9-H), 6.97 - 6.94 (m, 1H, Indol-C12-H), 6.23 (d, 1H, NH, J= 7.1 Hz), 4.81 (s, 2H, Triazol-NH<sub>2</sub>), 4.46 – 4.43 (m, 1H, TrpC\*H), 3.92 – 3.88 (m, 1H, LeuC\*H), 3.29 (s, 3H, Triazol-NCH<sub>3</sub>), 3.21 – 2.97 (m, 2H, TrpC\*HCH<sub>2</sub>), 2.59 (d, 3H, NHCH<sub>3</sub>, J= 4.6 Hz), 1.68 – 1.59 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.50 – 1.33 (m, 2H, LeuC\*HCH<sub>2</sub>), 0.85 (d, 3H, LeuCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J= 6.6 Hz), 0.79 (d, 3H, LeuCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J= 6.6 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.0°C, 500MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 172.7/171.5 (C2/C13\*), 159.9 (C19), 154.0 (C18), 136.0 (C11), 127.3 (C6), 123.0 (C12), 120.7 (C8), 118.2 (C7), 118.1 (C9), 111.1 (C10), 110.2 (C5), 56.2 (C3), 53.1 (C14), 40.5 (C15), 32.5 (C20), 27.1 (C4), 25.7 (C1), 24.1 (C16), 22.9 (C17), 21.3 (C17')

**IR** (KBr):

ν (cm<sup>-1</sup>) = 3303s, 2955m, 2870w, 1657s, 1549s, 1458w, 1425m, 1342w, 1265w, 1231w, 1157w, 1100w, 1013w, 745m, 657w

**N-(5-Amino-[1,2,4]oxadiazol-3-yl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (45a)**

**Ansatz:** 587 mg 42b (1.4 mmol) werden zusammen mit 8 Äquivalenten Hydroxylaminhydrochlorid und 8 Äquivalenten Triethylamin in 40 ml trockenem DMF gelöst und bei 60°C gerührt. Der Reaktionsverlauf wird mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach beendeter Umsetzung entfernt man das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen. Zur Entfernung des Triethylaminhydrochlorids wird die organische Phase zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und mit Wasser gewaschen und nach dem Trocknen über MgSO<sub>4</sub> am Rotationsverdampfer eingeengt. Der ölige Rückstand wird mit Diethylether versetzt, wodurch Kristallisation eintritt. Der Niederschlag wird abgenuscht und säulenchromatographisch gereinigt.

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Dichlormethan/ Methanol (19+1)

**Rf- Wert:** 0.185 (Dichlormethan/Methanol (19+1))

**Ausbeute:** 383 mg (76% d. Th.)

**Fp.:** 115- 120°C (Dichlormethan/Methanol)

**EA:**  $C_{18}H_{26}N_6O_3$  [374.45]

ber.: C: 57.74 % H: 7.00 % N: 22.44 %

gef.: C: 57.68 % H: 6.88 % N: 22.32 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 150°C):

m/z (%) = 374 ( $M^+$ , 49), 318 (38), 317 (100), 259 (52), 169 (84), 163 (62) 162 (84), 161 (73), 160 (68), 131 (44), 120 (58), 86 (51)

**$^1H$ -NMR** (DMSO- $d_6$ , 35.0°C, 500MHz):

$\delta_H$  (ppm) = 8.00 (d, 1H, NH, J = 8.5 Hz), 7.95 (d, 1H, NH, J = 8.0 Hz), 7.71 (d, 1H, NH, J = 4.6 Hz), 7.25 – 7.16 (m, 5H, Phenyl-H), 5.69 (s, 2H, Oxadiazol-NH<sub>2</sub>), 4.46 – 4.42 (m, 1H, PheC\*H), 3.99 – 3.95 (m, 1H, LeuC\*H), 3.00 (dd, 1H, PheC\*HCHH', A- Teil eines ABX- System,  $J_{AX} = 5.0$  Hz,  $J_{AB} = 13.7$  Hz), 2.81 (dd, 1H, PheC\*HCHH', B- Teil eines ABX- System,  $J_{BX} = 8.9$  Hz,  $J_{AB} = 13.7$  Hz), 2.57 (d, 3H, NHCH<sub>3</sub>, J = 4.6 Hz), 1.56 – 1.54 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.42 – 1.39 (m, 1H, LeuC\*HCHH'), 1.35 – 1.32 (m, 1H, LeuC\*HCHH'), 0.85 (d, 3H, LeuCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J = 6.4 Hz), 0.81 (d, 3H, LeuCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>), J = 6.6 Hz)

**$^{13}C$ -NMR** (DMSO- $d_6$ , 35.0°C, 500MHz):

$\delta_C$  (ppm) = 171.3/170.9 (C2/C9\*), 169.1 (C15), 168.2 (C14), 137.7 (C5), 129.0 (C6), 127.9 (C7), 126.1 (C8), 55.7 (C3), 53.7 (C10), 40.6 (C11), 37.5 (C4), 25.5 (C1), 24.0 (C12), 22.8 (C13), 21.2 (C13')

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3427s, 3386s, 3331s, 3065m, 2959m, 1647s, 1567s, 1469s, 1414w, 1387w, 1342w, 1282w, 1244w, 1216w, 1161w, 1059w, 773w, 744w, 699w

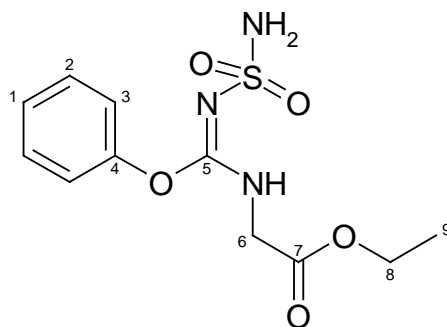
**Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Umsetzung von N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester mit  $\alpha$ -Aminosäureesterhydrochloriden (AAV11):**

Die Mischung von äquimolaren Mengen des  $\alpha$ -Aminosäureesterhydrochlorids und des N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester wird in Chloroform suspendiert. Anschließend tropft man langsam mit Chloroform verdünntes Triethylamin, ebenfalls in äquimolarer Menge, hinzu. Hierbei wird der Aminosäureester in situ freigesetzt. Die Suspension klärt sich. Nun läßt man über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Am nächsten Morgen ist in den meisten Fällen das Produkt ausgefallen. Triethylaminhydrochlorid und freigesetztes Phenol bleiben in Lösung, so daß durch Filtrieren und Waschen mit Diethylether eine ausreichende Reinigung zu erzielen ist.

Zu beachten ist, daß ein Überschuß von Triethylamin eine Salzbildung mit dem entstehenden Produkt zur Folge hat, wodurch sich die Ausbeute verringert.

Sollte das Produkt nicht ausgefallen sein, so zieht man das Rohprodukt im Vakuum auf Kieselgel auf und reinigt säulenchromatographisch mit dem angegebenen Fließmittel.

**N-(Sulfamoyliminophenoxyethyl)-glycinethylester (47a)**



**Ansatz:** 1.46g N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester (5mmol)  
0.70g Glycinethylesterhydrochlorid (5mmol)  
0.7ml Triethylamin (5mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Ethylacetat/Hexan (1+1)

**Ausbeute:** 920mg (61% d. Th.)

**Fp.:** 92°C

**EA:** C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S [301.32]

ber.: C: 43.85% H: 5.02% N: 13.95% S: 10.64%

gef.: C: 43.92% H: 5.00% N: 13.45% S: 10.42%

**MS** (EI, 70eV, PT = 310°C) :

m/z (%) = 302 ([M+H]<sup>+</sup>, 3), 239 (8), 155 (12), 129 (14), 119 (39), 101 (12), 95 (9), 94 (100), 77 (10), 65 (13), 64 (8), 55 (12)

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 20.0°C, 400MHz):

δ<sub>H</sub> (ppm) = 7.63 (s, 1H, -CH<sub>2</sub>NHC-), 7.32-7.00 (m, 2H, Phenoxy-C2-H), 7.20 – 7.17 (m, 1H, Phenoxy-C1-H), 7.03 – 7.01 (m, 2H, Phenoxy-C3-H), 4.60 (s, 2H, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 4.20 (qa, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O-, J=7.1 Hz), 4.10 (d, 2H, -OOCC<sub>2</sub>NH-, J=7.3 Hz), 1.24 (t, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O-, J=7.1 Hz)

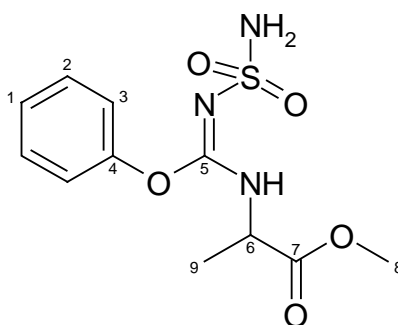
**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 29.8°C, 500MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 169.0 (C7), 157.3 (C4), 150.9 (C5), 129.4 (C2), 126.3 (C1), 121.7 (C3), 61.9 (C8), 43.6 (C6), 14.1 (C9)

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>)= 3345s, 3263s, 2991m, 2945w, 1748s, 1728s, 1632s, 1492s, 1445s, 1406s, 1356w, 1336m, 1319s, 1265s, 1219s, 1159m, 1126s, 1020m, 1001m, 916w, 875w, 771s, 727m, 690m, 668w, 639m, 590w, 554w, 336w

**N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-alaninmethylester (47b)**



**Ansatz:** 0.438g N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester (1.5mmol)  
0.210g Alaninmethylesterhydrochlorid (1.5mmol)  
0.21ml Triethylamin (1.5mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Ethylacetat/ Hexan (1+1)

**Ausbeute:** 317mg (70% d. Th.)

**Fp.:** 93°C

**EA:** C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S [301.32]

ber.: C: 43.85%	H: 5.02%	N: 13.95%	S: 10.64%
gef.: C: 43.98%	H: 4.94%	N: 13.65%	S: 10.51%

**MS (EI, 70eV, PT = 125°C):**

m/z (%) = 302 ([M+H]<sup>+</sup>, 1), 301 (M<sup>+</sup>, 0.2), 242 (13), 173 (10), 172 (100), 155 (16), 129 (11), 101 (18), 94 (61), 93 (8), 77 (11), 69 (22), 65 (9), 44 (9)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 22.0°C, 500MHz):

δ<sub>H</sub> (ppm) = 7.58 (d, 1H, NH, J= 6.4 Hz), 7.32 – 7.28 (m, 2H, Phenoxy-C2-H), 7.19 – 7.18 (m, 1H, Phenoxy-C1-H), 7.00 - 6.99 (m, 2H, Phenoxy-C3-H), 4.56 (s, 2H, SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 4.53 – 4.48 (m, 1H, AlaC\*H), 3.74 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 1.50 (d, 3H, AlaC\*HCH<sub>3</sub>, J=7.3 Hz)

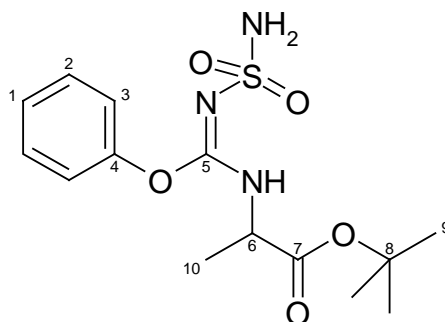
<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 26.3°C, 500MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 172.2 (C7), 156.5 (C4), 150.8 (C5), 129.4 (C2), 126.3 (C1), 121.6 (C3), 52.8 (C6), 50.8 (C8), 18.2 (C9)

IR (KBr):

ν (cm<sup>-1</sup>) = 3333s, 3262s, 3039w, 2961w, 1724s, 1628s, 1491m, 1445m, 1433m, 1386s, 1333s, 1292s, 1241w, 1208m, 1177m, 1137s, 1090m, 1067m, 978w, 905m, 848w, 787w, 759m, 719w, 668w, 616w, 540w, 499w

**N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-alanintertiärbutylester (47c)**



**Ansatz:** 0.876g N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester (3mmol)  
0.545g Alanin-tert.-butylesterhydrochlorid (3mmol)  
0.42ml Triethylamin (3mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Ethylacetat/Hexan (1+1)

**Ausbeute:** 519mg (50% d. Th.)

**Fp.:** 75°C

**EA:**  $C_{14}H_{21}N_3O_5S$  [343.40]  
ber.: C: 48.97% H: 6.16% N: 12.24% S: 9.34%  
gef.: C: 48.31% H: 6.11% N: 11.66% S: 8.68%

**HRMS:**  $C_{14}H_{21}N_3O_5S$  [343.40]

ber.(für  $[2M+H]^+$ ): 687.248211

gef.(für  $[2M+H]^+$ ): 687.248535

ber.(für  $[2M+Na]^+$ ): 709.230155

gef.(für  $[2M+Na]^+$ ): 709.228599

**MS (ESI):**

m/z (%) = 725 ( $[2M+K]^+$ , 9), 709 ( $[2M+Na]^+$ , 82), 687 ( $[2M+H]^+$ , 68), 382 ( $[M+K]^+$ , 10),  
366 ( $[2M+Na]^+$ , 44), 344 ( $[M+H]^+$ , 100)

**$^1H$ -NMR** ( $CDCl_3$ , 22.1°C, 500MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.57 (d, 1H, NH, J= 6.6 Hz), 7.30 – 7.26 (m, 2H, Phenoxy-C2-H), 7.18 – 7.14 (m, 1H, Phenoxy-C1-H), 7.01 – 6.99 (m, 2H, Phenoxy-C3-H), 4.65 (s, 2H, SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 4.37 – 4.33 (m, 1H, AlaC\*H), 1.46 (d, 3H, AlaC\*HC<sub>3</sub>, J= 7.1 Hz), 1.42 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO-)

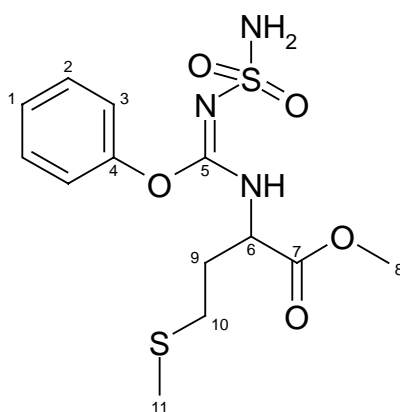
<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 25.7°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 170.8 (C7), 156.6 (C4), 150.9 (C5), 129.4 (C2), 126.2 (C1), 121.6 (C3), 82.8 (C8), 51.4 (C6), 27.9 (C9), 18.3 (C10)

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3381m, 3344m, 3250m, 3099w, 2981w, 2943w, 1727s, 1620s, 1591m, 1492m, 1458m, 1438m, 1389s, 1373m, 1314m, 1247m, 1213m, 1132s, 1041w, 899s, 841w, 775s, 726w, 691w, 649w, 556w, 541w, 495w, 430w

**N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-methioninmethylester (47d)**



**Ansatz:** 0.438g N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester (1.5mmol)  
0.300g Methioninmethylesterhydrochlorid (1.5mmol)  
0.21ml Triethylamin (1.5mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Ethylacetat/ Hexan (1+1)

**Ausbeute:** 361mg (66% d. Th.)

**Fp.:** gelbes Öl

**EA:**  $C_{13}H_{19}N_3O_5S_2$  [361.44]

ber.: C: 43.20%    H: 5.30%    N: 11.63%    S: 17.74%

gef.: C: 43.15%    H: 5.38%    N: 11.35%    S: 17.03%

**MS** (EI, 70eV, PT = 200°C):

m/z (%) = 361 ( $M^+$ , 3), 268 (47), 228 (90), 208 (19), 189 (30), 176 (28), 172 (48), 149 (30), 147 (29), 106 (21), 94 (100), 77 (23), 61 (73)

**$^1H$ -NMR** ( $CDCl_3$ , 19.3°C, 400MHz):

$\delta_H$  (ppm) = 7.60 (d, 1H, NH, J= 7.7 Hz), 7.31 – 7.27 (m, 2H, Phenoxy-C2-H), 7.20 – 7.15 (m, 1H, Phenoxy-C1-H), 7.01 – 6.99 (m, 2H, Phenoxy-C3-H), 4.72 – 4.67 (m, 3H, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> und MetC\*H), 3.74 (s, 3H, CH<sub>3</sub>OOC-), 2.60 – 2.56 (m, 2H, -SC<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 2.23 – 2.03 (m, 2H, -SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 2.05 (s, 3H, SCH<sub>3</sub>)

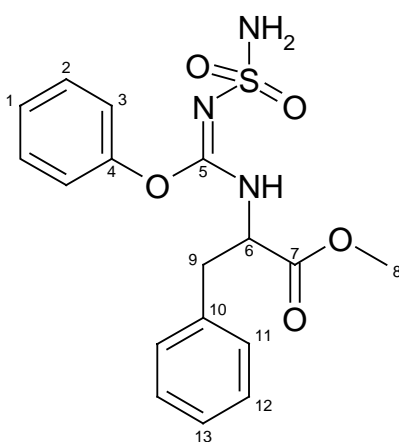
**$^{13}C$ -NMR** ( $CDCl_3$ , 24.1°C, 400MHz):

$\delta_C$  (ppm) = 171.4 (C7), 156.7 (C4), 150.8 (C5), 129.7 (C2), 126.3 (C1), 121.6 (C3), 65.8 (C8), 53.8 (C6), 31.3 (C9), 29.9 (C10), 15.3 (C11)

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3343m, 3257m, 1741m, 1735m, 1730m, 1727m, 1719w, 1654m, 1577s, 1570m, 1561m, 1555w, 1540w, 1508w, 1420w, 1413w, 1396w, 1388w, 1379w, 1357w, 1344w, 1321m, 1227m, 1208w, 1142s, 1103m, 1026w, 959w, 943w, 715w, 669w, 638w, 553w, 534w

**N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-phenylalaninmethylester (47e)**



**Ansatz:** 0.584g N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester (2mmol)  
0.430g Phenylalaninmethylesterhydrochlorid (2mmol)  
0.28ml Triethylamin (2mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Ethylacetat/Hexan (1+1)

**Ausbeute:** 251 mg (61% d. Th.)

**Fp.:** 134°C

**EA:** C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S [377.42]

ber.: C: 54.10%    H: 5.07%    N: 11.13%    S: 8.50%  
gef.: C: 54.17%    H: 5.20%    N: 10.33%    S: 8.63%

**MS** (EI, 70eV, PT = 150°C):

m/z (%) = 378 ([M+H]<sup>+</sup>, 4), 377 (M<sup>+</sup>, 1), 205 (46), 163 (14), 162 (40), 145 (15), 131 (13), 121 (19), 120 (16), 94 (100), 91 (53), 77 (20), 66 (12), 65 (22)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

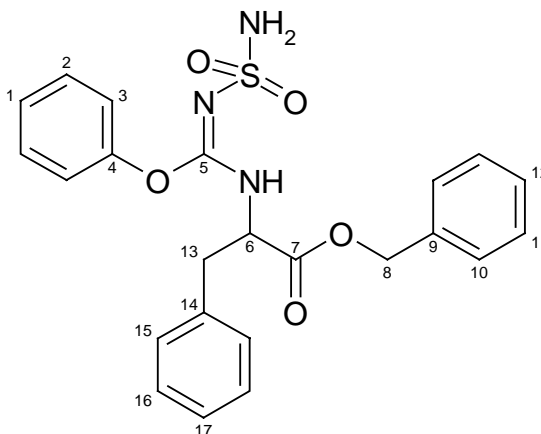
δ<sub>H</sub> (ppm) = 7.71 (d, 1H, NH, J= 6.4 Hz), 7.42-7.25 (m, 9H, Phenyl-H), 6.95 – 6.93 (m, 2H, Phenoxy-C3-H), 6.71 (s, 2H, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 4.88 (s, 1H, PheC\*-H), 3.77 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.27 (dd, 1H, PheC\*HCH<sub>2</sub>H', A-Teil eines ABX-Systems, J<sub>AB</sub>= 13.7 Hz, J<sub>AX</sub>= 4.6 Hz), 3.16 (dd, 1H, PheC\*HCH<sub>2</sub>H', B-Teil eines ABX-Systems, J<sub>AB</sub>= 13.7 Hz, J<sub>BX</sub>= 8.5 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

δ<sub>C</sub> (ppm) = 170.5 (C7), 154.7 (C5), 150.6 (C4), 135.7 (C10), 129.2 (C11), 129.0 (C2), 128.2 (C12), 126.6 (C13), 125.5 (C1), 121.4 (C3), 55.7 (C8), 52.1 (C6), 37.5 (C9)

**IR** (KBr):

ν (cm<sup>-1</sup>): 3323m, 2955s, 2924s, 2855m, 1738m, 1622s, 1493w, 1457m, 1401m, 1294w, 1206w, 1149w, 1108m, 1078w, 1054w, 1022w, 975w, 928w, 902w, 799w, 779w, 703w, 691w, 647w, 543w

**N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-phenylalaninbenzylester (47f)**

**Ansatz:** 1.435g N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester (5 mmol)  
 1.455g Phenylalaninbenzylesterhydrochlorid (5 mmol)  
 0.70ml Triethylamin (5 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
 Elutionsmittel: Ethylacetat/Hexan (1+1)

**Ausbeute:** 1225 mg (54 % d. Th.)

**Fp.:** 114°C

**EA:** C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S [453.52]

ber.: C: 60.91%    H: 5.11%    N: 9.27%    S: 7.07%

gef.: C: 60.81%    H: 5.11%    N: 9.11%    S: 7.33%

**MS** (EI, 70eV, PT = 350°C):

m/z (%) = 453 (M<sup>+</sup>, 2), 283 (25), 278 (38), 277 (58), 239 (27), 188 (36), 187 (32), 184 (34), 120 (67), 108 (29), 107 (27). 94 (100), 92 (43)

**$^1\text{H-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 29.9°C, 400MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.69 (d, 1H,  $\text{NH}$ ,  $J=7.5$  Hz), 7.39 – 7.16 (m, 13H, Aromat- $\text{H}$ ), 6.85 – 6.83 (m, 2H, Aromat- $\text{H}$ ), 6.77 (s, 2H,  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ), 5.21 (2 Signale, 2H, Benzyl- $\text{CH}_2$ ), 4.92 – 4.86 (m, 1H, PheC\* $\text{H}$ ), 3.27 – 3.13 (m, 2H, PheC\* $\text{HCH}_2$ )

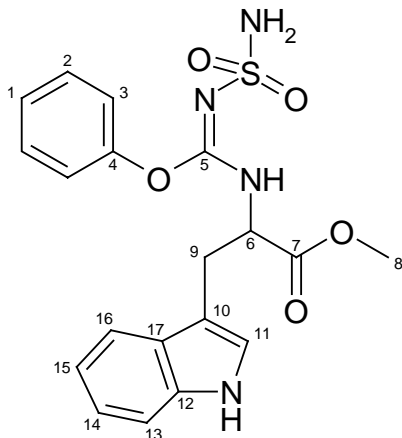
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (DMSO- $d_6$ , 30.0°C, 400MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 170.2 (C7), 154.9 (C4), 150.6 (C5), 136.0 (C9), 135.4 (C14), 129.4 (C15), 129.2 (C2), 128.4 (C11), 128.1 (C16), 126.8 (C17), 125.7 (C1), 121.6 (C3), 66.6 (C8), 55.8 (C6), 37.5 (C13)

**IR** (KBr):

$\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3355w, 3328m, 3272w, 3062w, 3033w, 1735s, 1654w, 1624s, 1561w, 1494m, 1455m, 1441s, 1420w, 1396s, 1335w, 1305m, 1246w, 1220m, 1190s, 1148m, 1113s, 1078w, 1052w, 1024w, 963w, 927w, 906w, 778m, 767m, 753m, 713m, 700m, 690s, 665m, 593w, 564w, 541w

**N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-tryptophanmethylester (47g)**



**Ansatz:** 1.35g N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester (5mmol)  
1.18g Tryptophanmethylesterhydrochlorid (5mmol)  
0.70ml Triethylamin (5mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Ethylacetat/Hexan (1+1)

**Ausbeute:** 1113 mg (58% d. Th.)

**Fp.:** 168°C

**EA:**  $C_{19}H_{20}N_4O_5S$  [416.46]

ber.: C: 54.80% H: 4.84% N: 13.45% S: 7.70%

gef.: C: 54.25% H: 4.85% N: 13.12% S: 7.73%

**MS** (EI, 70eV, PT = 150°C):

m/z (%) = 416 ( $M^+$ , 2), 322 (11), 243 (11), 201 (49), 184 (11), 170 (9), 157 (8), 143 (8),  
130 (100), 103 (9), 94 (35), 77 (14), 64 (10)

**$^1H$ -NMR** (DMSO- $d_6$ , 50.0°C, 500MHz):

$\delta_H$  (ppm) = 10.92 (s, 1H, NH), 7.70 (s, 1H, -CNHCRCOO-), 7.49 (d, 1H, Indol-C-16-H), 7.35 (m, 2H, Indol-C2-H und Indol-C13-H), 7.24 (s, 1H, Indol-C11-H), 7.20 (m, 1H, Phenoxy-C1-H), 7.08 (m, 1H, Indol-C14-H), 6.99 (m, 1H, Indol-C15-H), 6.88 (m, 1H, Phenoxy-C3-H), 6.65 (s, 2H, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 4.82 (s, 1H, -NHCRCOO-), 3.67 (s, 3H, -COOCH<sub>3</sub>), 3.31 (m, 2H, TrpC\*HCH<sub>2</sub>)

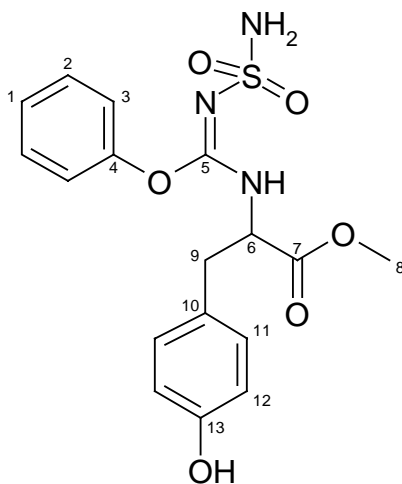
**$^{13}C$ -NMR** (DMSO- $d_6$ , 50.0°C, 500MHz):

$\delta_c$  (ppm) = 171.0 (C7), 154.9 (C4), 150.7 (C5), 136.1 (C12), 129.0 (C2), 125.5 (C11),  
124.2 (C1), 121.4 (C15), 120.9 (C16), 118.4 (C14), 117.8 (C3), 111.3 (C13),  
107.8 (C10), 55.0 (C6), 52.1 (C8), 27.7 (C9)

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3386s, 3316m, 3297m, 3114w, 3063 w, 2957w, 2945w, 1732s, 1619s, 1557w,  
1492m, 1458m, 1446m, 1406s, 1336m, 1306m, 1243m, 1218m, 1202m,  
1154m, 1123m, 1100s, 1080s, 1052m, 1026s, 1002s, 976m, 937w, 924s, 905s,  
867m, 846w, 775s, 764m, 747s, 721m, 692m, 667m, 644m, 595w, 565m,  
543m, 528m, 463w, 431w

**N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-tyrosinmethylester (47h)**



**Ansatz:** 0.584g N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester (2mmol)  
0.310g Tyrosinmethylesterhydrochlorid (2mmol)  
0.28ml Triethylamin (2mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Ethylacetat /Hexan (1+1)

**Ausbeute:** 608mg (74% d. Th.)

**Fp.:** 45°C

**EA:** C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S [393.42]

ber.: C: 51.90% H: 4.87% N: 10.68% S: 8.15%

gef.: C: 51.79% H: 4.94% N: 10.28% S: 8.25%

**HRMS:** C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S [393.42]

ber.(für [2M+H]<sup>+</sup>): 787.206740

gef.(für [2M+H]<sup>+</sup>): 787.207094

**MS (ESI):**

m/z (%)= 825 ([2M+K]<sup>+</sup>, 16), 787 ([2M+H]<sup>+</sup>, 61), 432 ([M+K]<sup>+</sup>, 17), 416 ([2M+Na]<sup>+</sup>, 54), 394 ([M+H]<sup>+</sup>, 100)

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):**

δ<sub>H</sub> (ppm) = 9.31 (1H, s, Phenyl-OH), 7.62 (d, 1H, NH, J= 7.6 Hz), 7.38 – 7.35 (m, 2H, Phenoxy-C2-H), 7.25 – 7.22 (m, 1H, Phenoxy-C1-H), 7.07 – 7.05 (m, 2H, Phenoxy-C3-H), 6.94 – 6.92 (m, 2H, Tyr-C11-H), 6.77 (s, 2H, SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 6.73 – 6.71 (m, 2H, Tyr-C12-H), 4.77 – 4.73 (m, 1H, TyrC\*H), 3.72 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.11 – 3.07 (m, 1H, TyrC\*HCH'), 3.04 – 2.99 (m, 1H, TyrC\*HCH)

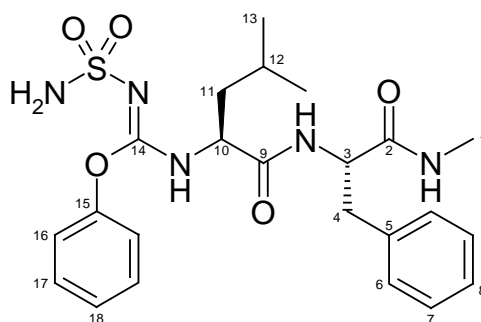
**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):**

δ<sub>C</sub> (ppm) = 170.7 (C7), 156.2 (C13), 154.8 (C4), 150.7 (C5), 130.1 (C11), 129.1 (C2), 125.5 (C1), 121.4 (C3), 115.2 (C12), 56.0 (C8), 52.1 (C6), 36.8 (C9)

**IR (KBr):**

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>)= 3287m, 2925m, 1735s, 1618s, 1516m, 1453m, 1400m, 1206m, 1115m, 908w,  
770m, 645m, 543m

**N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (52a)**



**Ansatz:** 438mg N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester (1.5mmol)  
437mg H<sub>2</sub>N-Leu-Phe-NMe (1.5mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Hexan/ Ethylacetat (3+2), später Ethylacetat/ Ethanol (9+1)

**Rf- Wert:** 0.727 (Ethylacetat/ Etanol (9+1))

**Ausbeute:** 346 mg (71 % d. Th.)

**Fp.:** 211°C (Ethylacetat/ Ethanol)

**EA:** C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S [489.60]

ber.: C: 56.43 %    H: 6.38 %    N: 14.30 %  
gef.: C: 53.85 %    H: 6.20 %    N: 14.33 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 1017 ([2M+K]<sup>+</sup>, 7), 1001 ([2M+Na]<sup>+</sup>, 69), 979 ([2M+H]<sup>+</sup>, 85), 528 ([M+K]<sup>+</sup>, 9), 512 ([M+Na]<sup>+</sup>, 80), 490 ([M+H]<sup>+</sup>, 100)

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 21.5°C, 400MHz):**

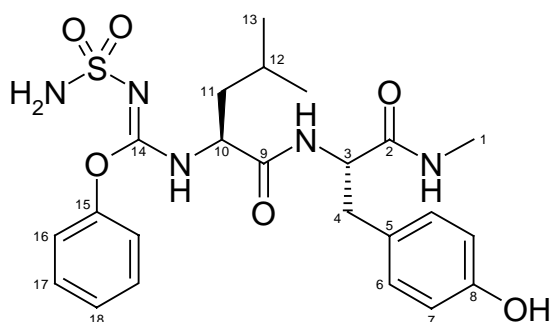
δ<sub>H</sub> (ppm) = 8.50 (d, 1H, NH, J= 8.4 Hz), 7.99 (d, 1H, NH, J= 4.8 Hz), 7.49 (d, 1H, NH, J= 7.5 Hz), 7.43 – 7.39 (m, 2H, Phenoxy-C17-H), 7.27 – 7.14 (m, 6H, Phenyl-H und Phenoxy-C18-H), 7.03 – 7.00 (m, 2H, Phenoxy-C16-H), 6.75 (s, 2H, SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 4.52 – 4.46 (m, 2H, PheC\*H und LeuC\*H), 2.93 (dd, 1H, PheC\*HCHH', A-Teil eines ABX- Systems, J<sub>AX</sub>= 5.9 Hz, J<sub>AB</sub>= 13.9 Hz), 2.81 (dd, 1H, PheC\*HCHH', B-Teil eines ABX- Systems, J<sub>BX</sub>= 9.0 Hz, J<sub>AB</sub>= 13.7 Hz), 2.55 (d, 3H, NHCH<sub>3</sub>, J= 4.4 Hz), 1.71 – 1.47 (m, 3H, LeuCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> und LeuCH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.93 (s, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)), 0.91 (s, 3H, LeuCHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>))

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 29.8°C, 400MHz):**

δ<sub>C</sub> (ppm) = 170.9/170.4 (C2/C9\*), 155.1 (C14), 150.9 (C15), 137.5 (C5), 129.3 (C17), 128.9 (C6), 127.9 (C7), 126.2 (C18), 125.7 (C8), 121.6 (C16), 53.9 (C3), 53.7 (C10), 41.7 (C11), 37.7 (C4), 25.4 (C1), 24.0 (C12), 23.0 (C13), 21.7 (C13')

**IR (KBr):**

ν (cm<sup>-1</sup>)= 3342s, 3299s, 2957w, 1629s, 1544m, 1493w, 1441w, 1391m, 1305m, 1222w, 1134m, 1101w, 906m, 767w, 690w, 650w, 548w

**N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-L-leucyl-L-tyrosin-N-methylamid (52b)**

**Ansatz:** 438mg N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester (1.5mmol)  
461mg H<sub>2</sub>N-Leu-Tyr-NMe (1.5mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Hexan/ Ethylacetat (2+3), später Ethylacetat/ Ethanol (9+1)

**Rf- Wert:** 0.625 (Ethylacetat/ Etanol (9+1))

**Ausbeute:** 710 mg (94 % d. Th.)

**Fp.:** 192°C (Ethylacetat/ Ethanol)

**EA:** C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>S\*H<sub>2</sub>O [523.62]

ber.: C: 52.76 %    H: 5.97 %    N: 13.38 %

gef.: C: 52.61 %    H: 6.09 %    N: 13.22 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 1011 ([2M+H]<sup>+</sup>, 51), 544 ([M+K]<sup>+</sup>, 15), 528 ([M+Na]<sup>+</sup>, 42), 506 ([M+H]<sup>+</sup>, 93),  
397 (100)

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):**

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 9.13 (s, 1H, OH), 8.39 (d, 1H, NH,  $J = 8.2$  Hz), 7.87 (d, 1H, NH,  $J = 4.4$  Hz), 7.52 (d, 1H, NH,  $J = 7.7$  Hz), 7.42 – 7.39 (m, 2H, Phenoxy-C17-H), 7.25 (tr, 1H, Phenoxy-C18-H,  $J = 7.4$  Hz), 7.03 (d, 2H, Phenoxy-C16-H,  $J = 8.0$  Hz), 6.97 (d, 2H, Tyr-C6-H,  $J = 8.5$  Hz), 6.72 (s, 2H, SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 6.61 (d, 2H, Tyr-C7-H,  $J = 8.5$  Hz), 4.50 – 4.46 (m, 1H, TyrC\*H), 4.44 – 4.40 (m, 1H, LeuC\*H), 2.82 (dd, 1H, TyrC\*HCHH', A-Teil eines ABX- Systems,  $J_{\text{AX}} = 6.0$  Hz,  $J_{\text{AB}} = 13.7$  Hz), 2.71 (dd, 1H, TyrC\*HCHH', B-Teil eines ABX- Systems,  $J_{\text{BX}} = 8.2$  Hz,  $J_{\text{AB}} = 13.7$  Hz), 2.55 (d, 3H, NHCH<sub>3</sub>,  $J = 4.7$  Hz), 1.69 – 1.65 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.58 – 1.51 (m, 2H, LeuC\*HCH<sub>2</sub>), 0.93 (s, 3H, LeuCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)), 0.91 (s, 3H, LeuCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>))

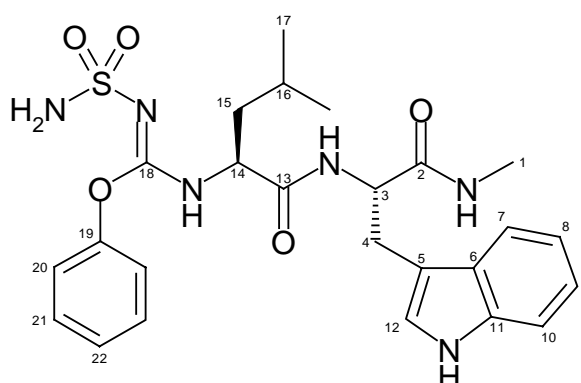
<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.1°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 171.0/170.3 (C2/C9\*), 155.7 (C8), 155.1 (C14), 150.9 (C15), 129.8 (C6), 129.3 (C17), 127.5 (C5), 125.7 (C18), 121.6 (C16), 114.8 (C7), 54.3 (C3), 53.7 (C10), 41.8 (C11), 37.0 (C4), 25.4 (C1), 24.0 (C12), 23.0 (C13), 21.7 (C13')

IR (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3290s, 2959m, 2357w, 1650s, 1628s, 1550s, 1517s, 1492m, 1446m, 1398m, 1302m, 1215m, 1136m, 1099w, 903w, 829w, 769w, 716w, 690w, 644w, 550w

**N-(Sulfamovliminophenoxymethyl)-L-leucyl-L-tryptophan-N-methylamid (52c)**



**Ansatz:** 438mg N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester (1.5mmol)  
496mg H<sub>2</sub>N-Leu-Trp-NMe (1.5mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60,  
Elutionsmittel: Hexan/ Essigester (1+1), später Essigester/ Ethanol (9+1)

**Rf- Wert:** 0.188 (Hexan/ Ethylacetat (1+1))

**Ausbeute:** 317 mg (40 % d. Th.)

**Fp.:** 205°C (Hexan/ Ethylacetat)

**EA:** C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S [528.63]

ber.: C: 56.80 %    H: 6.10 %    N: 15.90 %

gef.: C: 56.70 %    H: 6.08 %    N: 15.12 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 1079 ([2M+Na]<sup>+</sup>, 67), 1057 ([2M+H]<sup>+</sup>, 89), 567 ([M+K]<sup>+</sup>, 13), 551 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100), 529 ([M+H]<sup>+</sup>, 94)

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.0°C, 500MHz):**

δ<sub>H</sub> (ppm) = 10.74 (s, 1H, NH), 8.41 (d, 1H, NH, J= 8.2 Hz), 7.87 (d, 1H, NH, J= 4.4 Hz), 7.57 – 7.56 (m, 1H, Indol-C7-H), 7.39 – 7.36 (m, 2H, Phenoxy-C21-H), 7.33 – 7.31 (m, 1H, Phenoxy-C22-H), 7.24 – 7.22 (m, 1H, Indol-C10-H), 7.08 – 6.95 (m, 5H, Phenoxy-C20-H, Indol-C8-H, Indol-C9-H und Indol-C12-H), 6.71 (s, 2H, SO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 4.56 – 4.49 (m, 2H, TrpC\*H und LeuC\*H), 3.10 – 3.06 (m, 1H, TrpC\*HCHH'), 2.99 – 2.94 (m, 1H, TrpC\*HCHH'), 2.54 (d, 3H, NCH<sub>3</sub>, J= 4.4Hz), 1.68 – 1.58 (m, 3H, LeuC\*HCH<sub>2</sub> und LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.93 (s, 3H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)), 0.92 (s, 3H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>))

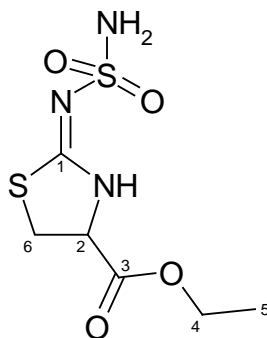
$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 35.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 171.2/170.3 (C2/C13\*), 155.1 (C18), 150.9 (C19), 135.9 (C11), 129.2 (C21), 127.3 (C6), 125.6 (C22), 123.2 (C12), 121.6 (C20), 120.7 (C8), 118.3/118.1 (C7/C9\*), 111.2 (C10), 109.8 (C5), 53.7/53.5 (C3/C14\*), 41.8 (C15), 28.0 (C4), 25.4 (C1), 24.0 (C16), 23.0 (C17), 21.7 (C17')

**IR** (KBr):

$\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3284s, 3080w, 2957w, 2871w, 1654s, 1648s, 1636s, 1624s, 1591w, 1577w, 1570w, 1561w, 1555w, 1540w, 1535w, 1523w, 1518w, 1509w, 1491w, 1458w, 1438w, 1433w, 1420w, 1398s, 1297m, 1245w, 1210w, 1133m, 1098w, 903w, 769w, 740w, 716w, 690w, 669w, 647w, 613w, 557w, 541w

**2-Sulfamoylimino-thiazolidin-4-carbonsäureethylester (48a)**



**Methode A:** Gemäß Allgemeiner Arbeitsvorschrift 11

**Ansatz:** 3.86g N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester (13.2mmol)  
2.45g Cysteinethylesterhydrochlorid (13.2mmol)  
2.81ml Triethylamin (13.2mmol)

**Methode B:**

N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester, Cysteinethylesterhydrochlorid und Natriumcarbonat als Hilfsbase werden in äquimolarer Menge gemischt und in einer Kugelmühle für 30min kräftig geschüttelt. Es kommt zum gleichen Produkt wie auf naßchemischem Wege (Methode A), das, wie beschrieben, gereinigt wird.

**Ansatz:** 438mg N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester (1.5mmol)  
279mg Cysteinethylesterhydrochlorid (1.5mmol)  
125mg Natriumcarbonat (1.5mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Ethylacetat

**Ausbeute:** Methode A: 3.14g (69% d. Th.)  
Methode B: 303mg (80% d. Th.)

**Fp.:** 110°C

**EA:** C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub> [253.30]

ber.: C: 28.45% H: 4.38% N: 16.59%

gef.: C: 28.36% H: 4.50% N: 16.50%

**MS** (EI, 70eV, PT = 200°C):

m/z (%) = 253 (M<sup>+</sup>, 11), 237 (14), 206 (8), 182 (8), 181 (7), 180 (85), 163 (59), 102 (7),  
101 (100), 80 (6), 74 (6), 59 (10)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

δ<sub>H</sub> (ppm) = 8.90 (s, 1H, RRCNHCHRR), 6.49 (s, 2H, SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 4.64/4.63 (2d, 1H, NHCHRCOOR, J= 8.7 Hz), 4.17 (2qa, 2H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, J= 7.1 Hz), 3.60 (dd,

1H, -SCHH'CHRR, A-Teil eines ABX- Systems,  $J_{AX}=8.7$  Hz.  $J_{AB}= 11.7$ Hz),  
3.42 (dd, 2H, -SCHH'CHRR, B-Teil eines ABX- Systems,  $J_{BX}=7.8$  Hz,  $J_{AB}= 11.7$  Hz), 1.22 (t, 3H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>,  $J_3=7.1$  Hz)

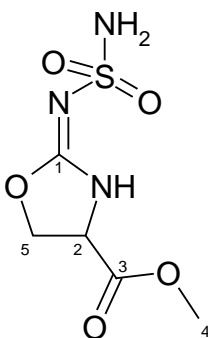
<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

$\delta_c$  (ppm) = 170.0/168.5 (C1/C4\*), 61.3 (C5), 56.9 (C3), 32.0 (C2), 13.8 (C6)

IR (KBr):

$\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3336s, 3295s, 3247s, 2991m, 1731s, 1547s, 1473m, 1450m, 1409m, 1375m,  
1362m, 1317s, 1232s, 1141s, 1126s, 1101s, 1024m, 994w, 958m, 938m, 889w,  
862w, 639m, 557m, 530m, 422w

### 2-Sulfamoylimino-oxazolidin-4-carbonsäureethylester (48b)



**Ansatz:** 0.584g N-Sulfamoyliminokohlensäurediphenylester (2mmol)  
0.310g Serinmethylesterhydrochlorid (2mmol)  
0.28ml Triethylamin (2mmol)

**Reinigung:** mehrfaches Waschen mit Diethylether

**Ausbeute:** 382mg (81% d. Th.)

**Fp.:** 100°C

**EA:** C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S [223.21]

ber.: C: 26.91% H: 4.06% N: 18.83% S: 14.37%

gef.: C: 26.90% H: 4.01% N: 17.92% S: 13.77%

**HRMS:** C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S [223.21]

ber. (für [2M+H]<sup>+</sup>): 575.123010

gef. (für[2M+H]<sup>+</sup>): 575.127692

**MS (ESI):**

m/z (%) = 708 ([3M+K]<sup>+</sup>, 7), 691 ([3M+Na]<sup>+</sup>, 55), 670 ([3M+H]<sup>+</sup>, 45), 485 ([2M+K]<sup>+</sup>, 11), 469 ([2M+Na]<sup>+</sup>, 85), 447 ([2M+H]<sup>+</sup>, 49), 224 ([M+H]<sup>+</sup>, 76)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 49.9°C, 500MHz):

δ<sub>H</sub> (ppm) = 8.58 (s, 1H, ONCNHCHRR'), 6.39 (s, 2H, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 4.68 – 4.63 (m, 2H, -NHCHCH<sub>2</sub>COO-), 4.56 – 4.51 (m, 1H, -NHCHCH<sub>2</sub>COO-), 3.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>OOC-)

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

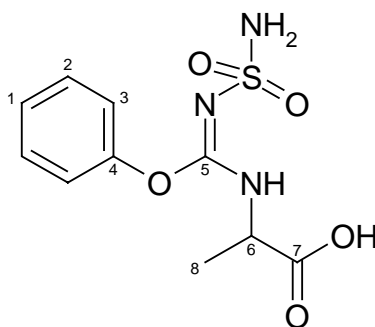
δ<sub>C</sub> (ppm) = 170.2 (C3), 159.4 (C1), 68.8 (C4), 55.1 (C5), 52.4 (C2)

**IR** (KBr):

ν (cm<sup>-1</sup>) = 3337s, 3262s, 3162w, 1735m, 1724m, 1719m, 1685m, 1670w, 1654s, 1648s, 1636s, 1577w, 1561w, 1473m, 1450m, 1438m, 1433w, 1360w, 1333s, 1277s,

1245w, 1156s, 1124w, 1066w, 971w, 945w, 919w, 869w, 747w, 724w, 685w, 669w, 606w

**N-(Sulfamoyliminophenoxymethyl)-alanin (47i)**



**Ansatz:** 343 mg 47c (1mmol) werden in Trifluoressigsäure gelöst und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend entfernt man die überschüssige Säure im Vakuum. Es resultiert ein rötliches Öl. Durch Zugabe von Diethylether kristallisieren feine weiße Kristalle aus.

**Reinigung:** mehrfaches Waschen mit Diethylether

**Ausbeute:** 117mg (45% d. Th.)

**Fp.:** 143°C

**HRMS:**  $C_{10}H_{13}N_3O_5S$  [287.30]

ber.(für  $[2M+H]^+$ ): 575.123010

gef.(für  $[2M+H]^+$ ): 575.127692

ber.(für  $[2M+Na]^+$ ): 597.104955

gef.(für  $[2M+Na]^+$ ): 597.107562

**MS (ESI):**

m/z (%) = 613 ([2M+K]<sup>+</sup>, 67), 597 ([2M+Na]<sup>+</sup>, 100), 575 ([2M+H]<sup>+</sup>, 63), 326 ([M+K]<sup>+</sup>, 42), 309 ([M+Na]<sup>+</sup>, 40), 288 ([2M+H]<sup>+</sup>, 95)

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.1°C, 500MHz):**

δ<sub>H</sub> (ppm) = 7.65 (d, 1H, NH, J= 6.2 Hz), 7.42 – 7.39 (m, 2H, Phenoxy-C2-H), 7.26 – 7.23 (m, 1H, Phenoxy-C1-H), 7.13 - 7.11 (m, 2H, Phenoxy-C3-H), 6.66 (s, 2H, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 4.46 (tr, 1H; HOOCCHCH<sub>3</sub>NH-, J=6.4 Hz), 1.48 (d, 3H, CH<sub>3</sub>CHRR, J<sub>3</sub>=6.4 Hz)

**<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):**

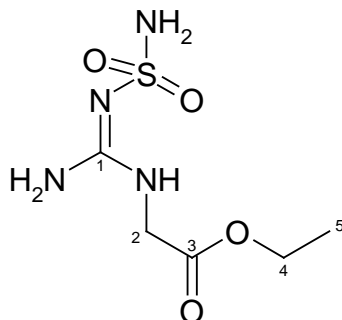
δ<sub>C</sub> (ppm) = 172.8 (C7), 155.0 (C5), 150.9 (C4), 129.1 (C2), 125.5 (C1), 121.5(C3), 50.2 (C6), 18.0 (C8)

**IR (KBr):**

ν (cm<sup>-1</sup>) = 3327w, 3274w, 1718s, 1632s, 1559w, 1492w, 1461w, 1437w, 1393m, 1330w, 1217m, 1190w, 1131m, 1070w, 1028w, 907w, 778w, 716w, 686w, 633w, 539w, 494w

**Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der N<sup>2</sup>-Sulfamoylguanidine (AAV12):**

Ein Equivalent des 2-Phenyl-3-sulfamoyl-isoharnstoffes wird in 50ml Isopropanol suspendiert. Bei 50°C wird unter Rühren für zwei Stunden ein starker Strom Ammoniakgas, das über Natriumhydroxid getrocknet wurde, durchgeleitet. Das Produkt fällt aus, durch Einengen der Lösung wird die Fällung vervollständigt. Die Kristalle werden abgenutscht und mit Diethylether nachgewaschen. Die Reinigung erfolgt wie angegeben.

**N<sup>2</sup>-Sulfamoylguanidinoessigsäureethylester (49)**

**Ansatz:** 301 mg 47a (2 mmol)

**Reinigung:** mehrfaches Waschen mit Diethylether

**Ausbeute:** 65mg (15% d. Th.)

**Fp.:** 173°C

**EA:** C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S [224.24]

ber.: C: 26.78% H: 5.39 % N: 24.99 %

gef.: C: 26.58 % H: 5.19 % N: 24.11 %

**MS** (EI, 70eV, PT = 300°C):

m/z (%) = 224 (M<sup>+</sup>, 18), 192 (18), 178 (20), 162 (41), 160 (31), 128 (22), 96 (61), 94 (22),  
80 (64), 65 (14), 64 (100), 48 (26)

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO-d<sub>6</sub>, 50.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 6.45 (s, 2H,  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ), 5.97 (s, 1H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 4.00 (s, 2H,  $\text{NCNH}_2$ ), 3.69 (d, 2H,  $-\text{OOCCH}_2\text{NH}-$ ,  $J=4.8$  Hz), 2.98 (qa, 2H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ,  $J=7.3$  Hz), 1.16 (t, 3H,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ,  $J=7.3$  Hz)

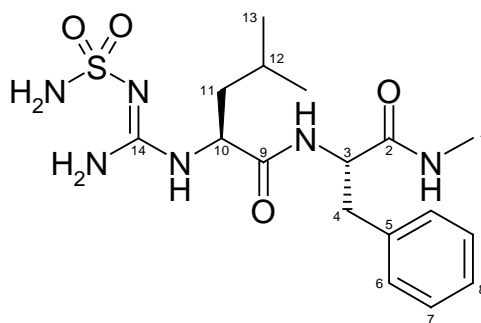
$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 50.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 172.5 (C3), 156.0 (C1), 48.2 (C4), 45.6 (C2), 8.7 (C5)

IR (KBr):

$\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3349s, 3258s, 3025w, 2936w, 1793w, 1757s, 1719w, 1700w, 1654s, 1648s, 1618m, 1570w, 1560w, 1468s, 1437w, 1430w, 1396w, 1379w, 1318w, 1288m, 1218w, 1179w, 1170w, 1150s, 1099m, 1038w, 915w, 860m, 816w, 749s, 732s, 684w, 646w, 596m, 579w, 547m, 510m, 490w

**N-(Sulfamoylcarbamidoyl)-L-leucyl-L-phenylalanin-N-methylamid (53a)**



**Ansatz:** 392 mg 52a (0.8 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Isopropanol

**Ausbeute:** 117 mg (36% d. Th.)

**Fp.:** 177°C (Isopropanol)

**EA:**  $C_{17}H_{28}N_6O_4S$  [412.52]

ber.: C: 49.50 % H: 6.84 % N: 20.37 %

gef.: C: 50.98 % H: 6.23 % N: 20.52 %

**MS** (EI, 70eV, PT=210°C):

m/z (%) = 412 ( $M^+$ , 5), 395 (100), 316 (62), 273 (95), 260 (60), 256 (85), 243 (46), 235 (47), 162 (71), 161 (72), 160 (67), 154 (54), 131 (45)

**$^1H$ -NMR** (DMSO- $d_6$ , 50.1°C, 500MHz):

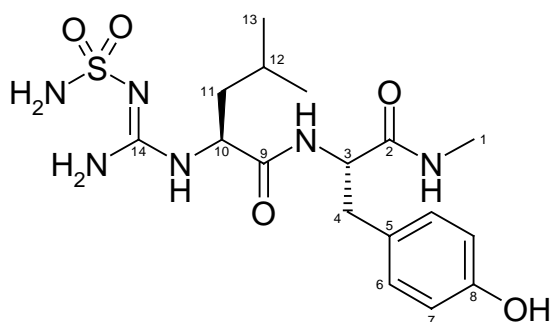
$\delta_H$  (ppm) = 8.16/ 8.13 (2s, 1H, NH), 7.98 – 7.85 (m, 1H, NH), 7.26 – 7.12 (m, 5H, Phenyl-H), 6.72/6.61 (2s, 2H, SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 4.86 – 4.76 (m, 1H, PheC\*H), 3.92 – 3.89 (m, 1H, LeuC\*H), 3.48 – 3.28 (m, 4H, PheC\*CH<sub>2</sub>, und NCNH<sub>2</sub>), 2.63 (d, 3H, NHCH<sub>3</sub>, J= 3.2 Hz), 1.66 – 1.48 (m, 1H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.13 – 0.98 (m, 2H, LeuC\*HCH<sub>2</sub>), 0.78 – 0.75 (m, 6H, LeuCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)

**$^{13}C$ -NMR** (DMSO- $d_6$ , 30.0°C, 500MHz):

$\delta_C$  (ppm) = 173.7/173.5/167.5 (2 Signale), (C2/C9\*), 154.1/153.3 (C14), 137.4/ 137.0 (C5), 129.1/ 128.7 (C6), 128.1 (C7), 126.3/126.2 (C8), 56.0/ 55.7 (C3), 54.7/54.5 (C9), 33.0/32.8 (C4), 25.9 (C1), 23.3/ 23.2 (C12), 22.5 (C13), 22.1/22.0 (C13')

**IR** (KBr):

$\nu$  ( $cm^{-1}$ )= 3336m, 2961w, 1773w, 1735w, 1719w, 1701w, 1697w, 1685m, 1654s, 1636s, 1561m, 1508w, 1500w, 1453m, 1415w, 1382w, 1262m, 1198w, 1140m, 906m, 747m, 700m, 606w, 549w

**N-(Sulfamoylcarbamidoyl)-L-leucyl-L-tyrosin-N-methylamid (53b)**

**Ansatz:** 461 mg 52b (0.9 mmol)

**Reinigung:** Säulenchromatographie an Kieselgel 60  
Elutionsmittel: Dichlormethan/ Methanol (19+1)

**Rf- Wert:** 0.225 (Dichlormethan/ Methanol (19 + 1))

**Ausbeute:** 120 mg (32 % d. Th.)

**Fp.:** 189°C (Dichlormethan/Methanol (19+1))

**EA:** C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S [428.52]

ber.: C: 47.65 %    H: 6.59 %    N: 19.61 %

gef.: C: 47.54 %    H: 6.41 %    N: 19.63 %

**MS (EI, PT= 270°C):**

m/z (%) = 428 (M<sup>+</sup>, 1), 315 (99), 313 (49), 301 (61), 273 (64), 272 (100), 259 (8), 258 (55), 209 (44), 195 (35), 181 (60), 166 (39), 107 (56)

**<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 35.0°C, 500MHz):**

$\delta_{\text{H}}$  (ppm) = 7.91 (d, 1H,  $\text{NH}$ ,  $J= 4.6$  Hz), 7.80 (d, 1H,  $\text{NH}$ ,  $J= 4.4$  Hz), 6.96 – 6.90 (m, 2H Tyr-C6- $\text{H}$ ), 6.68 (s, 2H,  $\text{SO}_2\text{NH}_2$ ), 6.63 – 6.59 (m, 2H, Tyr-C7- $\text{H}$ ), 4.77 – 4.66 (m, 1H, TyrC\* $\text{H}$ ), 3.94 – 3.90 (m, 1H, LeuC\* $\text{H}$ ), 3.39 – 3.18 (m, 4H, TyrC\* $\text{HCH}_2$  und  $\text{NH}_2$ ), 2.62 (d, 3H,  $\text{NCH}_3$ ,  $J= 3.7$  Hz), 1.69 – 1.50 (m, 1H, Leu $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.19 – 1.06 (m, 2H, LeuC\* $\text{HCH}_2$ ), 0.81 – 0.78 (m, 6H, Leu $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ )

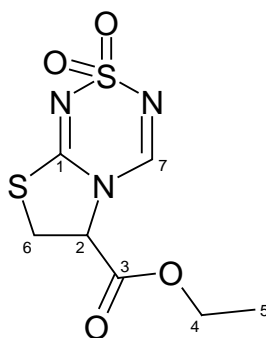
$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $\text{d}_6$ , 35.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 173.8/ 173.5 (C3/ C9\*), 155.8/ 155.7 (C8), 154.3/ 153.4 (C14), 129.9/ 129.6 (C6), 127.2/ 126.9 (C5), 114.9 (d, C7), 56.0/ 55.7 (C3), 55.1/ 54.8 (C10), 39.9/ 39.8 (C11), 32.1/ 31.9 (C4), 25.8 (C1), 23.4/ 23.2 (C12), 22.5 (C13), 22.2/ 22.0 (C13')

**IR** (KBr):

$\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )= 3386s, 2960w, 2872w, 1756w, 1700w, 1653s, 1632s, 1560w, 1517m, 1452m, 1414w, 1387w, 1299m, 1268w, 1232w, 1203w, 1173w, 1135m, 988w, 905w, 852w, 830w, 801w, 775w, 747w, 721w, 697w, 606w, 561w, 501w

**6-R,S-6,7-Dihydrothiazolo[2.3-c]-1,2,4,6-thiatriazin-6-carbonsäureethylester-S<sup>2</sup>,S<sup>2</sup>-dioxid (51)**



**Ansatz:** 3.012g 48a (11.9mmol) wird in 10ml Triethylorthoformiat suspendiert und mit ca. 10mg p-Toluolsulfonsäure versetzt. Man erhitzt vorsichtig bis zum Sieden, wobei sich die Suspension klärt und läßt drei Stunden unter Rückfluß sieden. Nun trennt man das entstandene Ethanol destillativ ab und erhitzt erneut für eine Stunde. Der überschüssige Orthoester wird im Vakuum weitgehend entfernt, der Rückstand in wenig Isopropanol ausgekocht. Das Rohprodukt kristallisiert in der Kälte aus.

**Reinigung:** Umkristallisieren aus Isopropanol

**Ausbeute:** 1.564g (49% d. Th.)

**Fp.:** 117°C (Isopropanol)

**EA:**  $C_{13}H_{19}N_3O_5S_2$  [263.30]

ber.: C: 31.93%    H: 3.45%    N: 15.96%    S: 24.36%

gef.: C: 32.02%    H: 3.48%    N: 15.42%    S: 24.23%

**MS** (EI, 70eV, PT = 400°C) :

m/z (%) = 263 ( $M^+$ , 13), 192 (12), 191 (38), 190 (100), 163 (66), 126 (9), 100 (11), 99 (20), 64 (11), 46 (6), 45 (7), 44 (7)

**$^1H$ -NMR** (DMSO- $d_6$ , 50.0°C, 500MHz):

$\delta_H$  (ppm) = 8.27 (s, 1H, RNCHNRR), 5.54 (2d, 1H, -CH<sub>2</sub>CHCOO-, J=8.5 Hz), 4.25 (q, 2H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, J=7.1 Hz), 3.94 (dd, 1H, -SCHH'CH-, A-Teil eines ABX-Systems,  $J_{AX}$ =8.5 Hz,  $J_{AB}$ = 11.7 Hz), 3.71 (dd, 1H, -SCHH'CH-, B-Teil eines ABX-Systems,  $J_{BX}$ =9.9 Hz,  $J_{AB}$ = 11.7 Hz), 1.25 (t, 3H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, J=7.1 Hz)

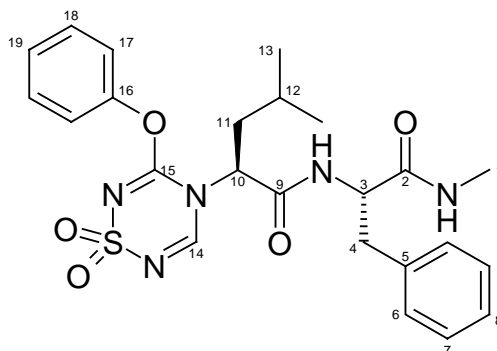
$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 50.0°C, 500MHz):

$\delta_{\text{C}}$  (ppm) = 167.7/166.2 (C1/C3\*), 149.5 (C7), 63.0 (C4), 62.7 (C2), 30.1 (C6), 13.6 (C5)

**IR** (KBr):

$\nu$  (cm $^{-1}$ ) = 3070w, 3046w, 3000m, 2986m, 2965s, 2942m, 1736s, 1646s, 1523m, 1472m, 1445m, 1381s, 1327s, 1276s, 1253s, 1222s, 1161s, 1102s, 1022s, 966m, 904m, 860m, 807m, 760s, 733w, 711m, 683m, 662s, 627w, 572m, 552m, 531m, 457m

**N-[L-2-(1,1-Dioxo-3-phenoxy-1H-1 $\lambda^6$ -[1,2,4,6]thiatriazin-4-yl)-isohexanoyl]-L-phenylalanin-N-methylamid (54)**



**Ansatz:** 300 mg 52a (0.6 mmol)

**Reinigung:** Umkristallisation aus Ether

**Ausbeute:** 109 mg (36% d.Th.)

**Fp.:** 196°C

**EA:**  $C_{24}H_{29}N_5O_5S$  [499.59]

ber.: C: 57.70 %    H: 5.85 %    N: 14.02 %    S: 6.42%

gef.: C: 57.85 %    H: 5.88 %    N: 14.33 %    S: 6.55 %

**MS (ESI):**

m/z (%) = 500 ( $[M+H]^+$ , 35)

**$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 34.9°C, 500MHz):**

$\delta_H$  (ppm) = 8.28 (s, 1H, C-14-**H**), 7.99 (d, 1H, **NH**, J= 4.8 Hz), 7.49 (d, 1H, **NH**, J= 7.5 Hz), 7.43 – 7.39 (m, 2H, Phenoxy-C18-**H**), 7.27 – 7.14 (m, 6H, Phenyl-**H** und Phenoxy-C19-**H**), 7.03 – 7.00 (m, 2H, Phenoxy-C17-**H**), 4.62 – 4.49 (m, 2H, PheC\***H** und LeuC\***H**), 2.93 (dd, 1H, PheC\***HCHH'**, A-Teil eines ABX-Systems,  $J_{AX}$ = 5.9 Hz,  $J_{AB}$ = 13.9 Hz), 2.81 (dd, 1H, PheC\***HCHH'**, B-Teil eines ABX-Systems,  $J_{BX}$ = 9.0 Hz,  $J_{AB}$ = 13.9 Hz), 2.55 (d, 3H, **NHCH<sub>3</sub>**, J= 4.4 Hz), 1.71 – 1.47 (m, 3H, Leu**CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>** und Leu**CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**), 0.93 (s, 3H, Leu**CHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)**), 0.91 (s, 3H, Leu**CHCH<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)**)

**$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 35.0°C, 500MHz):**

$\delta_C$  (ppm) = 171.0/170.5 (C2/C9\*), 166.8 (C15), 150.8 (C16), 149.9 (C14), 137.5 (C5), 129.2 (C18), 128.9 (C6), 127.9 (C7), 126.2 (C19), 125.7 (C8), 121.5 (C17), 54.0/53.9 (C3/C10\*), 41.7 (C11), 37.8 (C4), 25.4 (C1), 24.0 (C12), 23.0 (C13), 21.7 (C13')

**IR (KBr):**

$\nu$  ( $cm^{-1}$ )= 3379s, 3065w, 3012w, 2962s, 2873w, 1784m, 1674s, 1636m, 1627m, 1585w, 1561s, 1508w, 1498ww, 1457w, 1428s, 1391w, 1358w, 1334s, 1297w, 1268w,

1197w, 1156s, 1088w, 1023w, 945w, 911w, 877w, 856w, 818w, 770w, 748w,  
737w, 716w, 701m, 668w, 596w, 582w, 571w, 513w

1. Babine, R., E., Bender, S., L, Chem. Rev. **97**, 1359-1472 (1997)
2. Lipscomb, W., N., Sträter, N., Chem. Rev. **96**, 2375-2433 (1996)
3. Hooper, N. M. FEBS Lett. **354**, 1-6 (1994)
4. Borkakoti, N., Gubernator, K., Böhm, H. J., Zinc Proteases: A structural Superfamily. Structure- based Ligand Design. Weinheim, Wiley VHC. **6**, 73 – 88 (2000)
5. Endo, S., J. Ferment Tech. **40**, 346 – 353 (1962)
6. Titani, K., Hermodson, M. A., Ericson, L. H., Walsh, K. A., Biochemistry **11**, 2427 –2435 (1972)
7. Colman, P. M., Jansonius, J. N., Matthew, B. W., J. Mol. Biol. **70**, 701 – 724 (1972)
8. Matthews, B. W., Weaver, L. H., Kester, W. R., J. Biol. Chem. **249**, 8030 – 8044 (1974)
9. Matthews, B. W., Acc. Chem. Res. **21**, 333 – 340 (1988)
10. Ksander, G. M., de Jesus, R., Yuan, A., Ghai, R. D., Trapani, A., McMartin, C., Bohacek, R., J. Med. Chem. **40**, 495 – 505 (1997)
11. Ksander, G. M., de Jesus, R., Yuan, A., Ghai, R. D., Trapani, A., McMartin, C., Bohacek, R., J. Med. Chem. **40**, 506 – 514 (1997)
12. Gaucher, J. F., Seltki, M., Tiraboschi, G., Prange, T., Roques, B. P., Tomas, A., Fournie- Zaluski, M. C., Biochemistry **38**, 12569 – 76 (1999)
13. Matsubara, H., Sasaki, R., Singer, A., Jukes, T. H., Biochem. Biophys. Res. Commun. **24**, 427 (1966)
14. Feder, J., Garret, L. R., Wildi, B. S., Biochemistry **10**, 4552 (1971)
15. Schlechter, I., Berger, A., Biochem. Biophys. Res. Commun. **27**, 157 – 162 (1967)
16. Woessner, J. F. Jr., FASEB J. **5**, 2145- 2155 (1991)
17. Rawlings, N. D., Barret, A. J., Methods Enzymol. **248**, 183 – 229 (1995)
18. Wilhelm, S. M., Eisen, A. Z., Teter, M., Clark, S. D., Kronberger, A., Goldberg, G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 3756 (1986)
19. Hasty, K. A., Pourmotabbed, T. F., Goldberg, G. I., Thompson, J. P., Spinella, D. G., Stevens, R. M., Mainardi, C. L., J. Biol. Chem., **265**, 6579 (1990)
20. Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Robey, P. G., Abe, S., Biochemistry, **20**, 100 (1981)

21. Wilhelm, S. M., Collier, I. E., Kronberger, A., Eisen, A. Z., Marmer, B. L., Grant, G. G., Bauer, E. A., Goldberg, G.I., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 6725 (1987)
22. Muller, D., Quantin, B., Gesnel, M. C., Millon-Collard, R., Abecassis, J., Breathnach, R., Biochem. J., 253, **187** (1988)
23. Massowa, I., Kotra, L. P., Fridman, R., FASEB **12**, , 1075-1095 (1998)
24. Bode et al., Cell. Mol. Life Sci. **55**, 639-652 (1999)
25. Lovejoy et al., Science **263**, 375- 377 (1994)
26. Borkakoti et al., Nature Struct. Biol. **1**, 106 – 110 (1994)
27. Stams et al., Nature Struct. Biol. **1**, 106 – 110 (1994)
28. Bode et al., EMBO J. **13**, 1263 – 1269 (1994)
29. Reinemer et al., FEBS Lett. **338**, 227 – 233 (1994)
30. Gooley et al., Nature Struct. Biol. **1**, 111 – 118 (1994)
31. Grams et al., Eur. J. Biochem. **228**, 830 – 841 (1995)
32. Lovejoy et al., Biochemistry **33**, 8207 (1994)
33. Chambers A. F., Matrisian, L. M., Journal of the National Cancer Institute **89** (17) 1260 – 1270 (1997)
34. Böhm H.-J., Klebe G., Kubinyi H. in: Wirkstoffdesign, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S.508 ff. (1996)
35. Seltzer, J. L., Akers, K. T., Weingarten, H., Grant, G.A., McCourt, D. W., Eisen, A. Z., J. Biol. Chem. **265**, 20409 (1990)
36. Wu, J. J., Lark, M. W., Chun, L. E., Eyre, D. R., J. Biol. Chem. **266**, 5625 (1991)
37. Nagase, H., Fields, G.B., J. Biol. Chem. **269**, 20952 (1994)
38. Netzel- Arnett, S., Fields, G., Birkedal- Hansen, Van Wart, H.E., J. Biol. Chem., **266**, 1(1991))
39. Netzel- Arnett, S., Sang, Q. X., Moore, W. G. I., Navre, M., Birkedal- Hansen, H., Van Wart, H. E., Biochemistry **32**, 6427 (1993)
40. Niedzwiecki, L., Teahan, J. Harrison, R. K., Stein, R. L., Biochemistry **31**, 12618 (1992)
41. Smith, M. M., Shi, L., Navre, M., J. Biol Chem. **270**, 6440 (1995)
42. Whittaker, M., Floyd, C. D., Brown, P., Gearing, A. J. H., Chem. Rev. **99**, 2735-2776 (1999)

43. Castelhana, A. L., Billedeau, R., Dewdney, N., Donnelly, S., Horne, S., Kurz, L. J., Liak, T. J., Martin, R., Uppington, R., et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **5**, 1415 – 1420 (1995)
44. Morphy, J. R., Beeley, N. R. A., Boyce, B. A., Leonard, J., Manson, B., Millican, A., Millar, K., O'Connell, J. P., Porter, J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **4**, 2747 – 2752 (1994)
45. Browner, M. F., Smith, W. W., Castelhana, A. L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6**, 1601 – 1606 (1996)
46. Wasielewski, S., *Pharmakologie aktuell* **24** (1), 2-5 (2001)
47. Böhm, H. J., Klebe, G., Kubiny, H. in: *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, S. 131 ff. (1996)
48. Bols, M., Binderup, L., Hansen, J., Rasmussen, P., *J. Med. Chem.* **35**, 2768 (1992)
49. Suomalainen, K., Sorsa, T., Golub, L. M., Ramamurthy, N. S., Lee, H. –M., Uitto, V. –J., Saari, H., Kontinnen, Y. T., *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 227 (1992)
50. Makimura, M., Hirasawa, M., Kobayashi, K., Indo, J., Sakamaka, S., Taguchi, T., Otake, S., *J. Periodontol.* **64**, 630 (1993)
51. Harris, G. H., Hoogsteen, K., Silverman, K. C., Raghoobar, S. L., Bills, G. F., Lingham, R. B., Smith, J. L., Dougherty, H. W., Cascales, C., Pelaez, F., *Tetrahedron* **49**, 2139 (1993)
52. Yeh, L. A., Chen, J., Baculi, F., Gingrich, D. E., Shen, T. Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **5**, 1637(1995)
53. Haake, M., *Tetrahedron Letters* **52**, 4449, (1979)
54. Haake, M., *Zur Chemie azaloger Sulfone*, Habilitationsschrift Marburg 1971
55. Pothmann, R., *Dissertation*, Marburg 1977
56. Zimmermann, W., *Dissertation*, Marburg 1985
57. Schrage, C., *Dissertation*, Marburg 1996
58. Haake, M. in: *The Chemistry of S,S-Diorgano-Sulfodiimides*, Topics in Sulfur Chemistry, Vol. 1, 185, Thieme-Verlag, Stuttgart, (1976)
59. Meienhofer, J., Kuromizu, K., *Tetrahedron Lett.* **37**, 3259 (1974)
60. Bodanszky, M., *Principles of Peptide Synthesis*, Springer-Verlag, (1984)
61. Nihei, K., Massuo, J. K., Yamane, T., Palma, M. S., Konno, K., *Synlett* **7**, 1167 (2001)
62. *Organikum*, 18. Aufl., Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1990), S.206

63. Krauthausen, E. in: Houben-Weyl Methoden der Organischen Chemie Bd. E11/1, Organische Schwefelverbindungen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1985), S. 655 ff.
64. Furukawa, M., Ohkawara, T., Synthesis, 339 (1976)
65. Furukawa, M., Ohkawara, T., Noguchi, Y., Isoda, M., Hitoshi, T., Synthesis, 937 (1980)
66. Kice, J. L., Hampton, D. C., Fitzgerald, A., J. Org. Chem. **30**, 882- 885 (1965)
67. Chiang, Y. H., Luloff, J. S., Schipper, E., J. Org. Chem. **34**, 2397 (1969)
68. Hilditch, T. P., Smiles, S., Ber. Dtsch. Chem. Ges. **41**, 4113- 4116 (1908)
69. Douglass, I. B., Norton, R. V., J. Org. Chem. **33**, 2104 (1968)
70. Jähnchen, G., Westphal, G., Z. Chemie **9**, 305 (1969)
71. Mutschler, E., Arzneimittelwirkungen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S.348 ff., 7. Aufl. (1996)
72. Stetter, J.; Lieb, F., Angew. Chem. **112**, 1792 (2000)
73. Toth et al., J. Med. Chem. **40**, 1018 (1997)
74. Johnson, C. R., Wambsgans, A., J. Org. Chem. **44**, 2278 (1979)
75. Haake, M., Eichenauer, B., Arch. Pharm. **305**, 644 (1968)
76. Boudjabi, S., Dewynter, G., Voyer, N., Toupet, L. Montero, J.-L., Eur. J. Org. Chem., 2275 (1999)
77. Webb, R. L., Labaw, C. S., J Heterocyclic Chem. **19**, 1205 (1982)
78. Müller, H. J., Dissertation Marburg 1987
79. Siuts, A., Dissertation Marburg 1994
80. Heumann-Pharma GmbH & Co., (Erf. Haake, M., Schikaneder, H., Ahrens, K. H.), DE 3624820 (1988), CA 109: 6237y (1988)
81. Korolkovas, A., Grundlagen der molekularen Pharmakologie, S. 52, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974)
82. Supuran, C. T., Scozzafava, A., Expert Opin. Ther. Patents **12** (2), 217-242 (2002)
83. Schümmelfeder, B., Dissertation Marburg 1991
84. Morgan et al., J. Am. Chem. Soc. **113**, 297 (1991)
85. Bartlett, P. A., Marlowe, C. K., Biochemistry **22** (20), 4618-24 (1983)
86. Feder, J., Biochem. Biophys. Res. Commun. **32** (2), 346 (1968)
87. Grobelny, D., Goli, U. B., Galardy, R. E., Biochemistry **28** (12), 4948-51 (1989)

88. de Kreijl, A., van Den Burg, B., Venema, G., Vriend, G., Eijssink, V. G., Nielsen, J. E., *J. Biol. Chem.* **271**, 21 (2002)
89. Holmquist, B., Vallee, B. L., *Biochemistry* **15** (1), 101 (1976)
90. Feder, J., Schuck, J. M., *Biochemistry* **9** (14), 2784 (1970)
91. Inouye, K., *J. Biochem. (Tokyo)* **112** (3), 335 (1992)
92. Powers, J. C., Kam, C. M., *Meth. Enzymol.* **248**, 3 (1995)
93. Johnson et al., *J. Biol. Chem.* **274**, 24881 (1999)
94. Van Wart, H. E., Steinbrinck, D. R., *Anal. Biochem.* **113**, 156 (1981)
95. Supuran, C. T., Scozzafava, A., *Expert Opin. Ther. Patents* **10**, 575-600 (2000)
96. Lindskog, S., *Pharmacol. Ther.* **74** (1), 1-20 (1997)
97. Liljas et al., *Nature New Biol.* **235**, 131-137 (1972)
98. Khalifah, R. G., *J. Biol. Chem.* **246**, 2561-2573 (1971)
99. Casini et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 838 (2003)
100. Pocker, Y., Stone, J. T., *Biochemistry* **6** (3), 668-678 (1967)
101. Still, W. et al., *J. Org. Chem.* **43**, 2923 (1978)

## Lebenslauf

03.06.1970	Geboren in Marburg/Lahn
1976 - 1980	Grundschule Marburg
1980 - 1989	Gymnasium Philippinum in Marburg
05/1989	Allgemeine Hochschulreife
1989 – 1990	Wehrdienst
1990 - 1993	Studium der Chemie an der Philipps - Universität Marburg
10/1992	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
1993 - 1995	Studium der Lebensmittelchemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
05/1995	Erste staatliche Prüfung für Lebensmittelchemiker
1996 - 1997	Anerkennungsjahr
04/1997	Zweite staatliche Prüfung für Lebensmittelchemiker
09/1997 – 09/2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Chemie an der Phillips-Universität Marburg