Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

N^{α}-Arensulfonyl-Aminosäurechloride – Kupplung sterisch stark gehinderter Komponenten in der Peptidsynthese

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt Universität zu Berlin

von Diplom-Chemikerin Petra Henklein

geb. am 17.08.1968 in Berlin

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. B. Ronacher

Gutachter: 1. Prof. Dr. Michael Bienert

2. Prof. Dr. Jürgen Liebscher

3. Prof. Dr. Klaus Neubert

eingereicht: 19.04.2000

Datum der Promotion: 24.07.2000

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Bedeutung und Entwicklungstand der Peptidsynthese	8
1.2	Aminosäurehalogenide in der Peptidchemie	11
1.2.1	Fmoc-Aminosäurefluoride	11
1.2.2	Aminosäurechloride	13
1.3	Ziele der eigenen Arbeiten	16
2	Ergebnisse und Diskussion	18
2.1	Vergleich der Reaktivität von Fmoc-Aminosäurefluorid und -chlorid	18
2.2	Eigenschaften Arensulfonyl-geschützter Aminosäurehalogenide	18
2.2.1	Tosyl-geschützte Aminosäuren	19
2.2.2	Pbf-geschützte Aminosäuren	19
2.2.3	2- und 4-Nitrobenzensulfonylaminosäuren	20
2.2.4	Dinitrobenzensulfonylaminosäuren	21
2.2.5	Synthese Arensulfonyl-geschützter Aminosäuren und ihrer Halogenide	21
2.3	Kupplungen mit Arensulfonyl-geschützten Aminosäurehalogeniden	24
2.3.1	Tosylaminosäurehalogenide	24
2.3.2	Pbf-Aminosäurehalogenide	26
2.3.3	NBS-Aminosäurehalogenide	28
2.3.4	DNBS-Aminosäurehalogenide	29
2.3.5	Nebenreaktionen bei Synthesen mit Arensulfonyl-geschützten Aminosäurechloriden	31
2.4	Abspaltung der Arensulfonylschutzgruppen	33
2.4.1	Abspaltung der Pbf-Schutzgruppe	34
2.4.2	Abspaltung der NBS-Schutzgruppe	36
2.4.3	Abspaltung der DNBS-Schutzgruppe	36
2.5	Synthesen mit in situ gebildeten Arensulfonyl-geschützten Aminosäurehalogeniden	37
2.5.1	Modelluntersuchungen zur in situ Säurechloridbildung	37
2.5.2	In situ Aktivierung von DNBS-Aminosäuren	39
2.5.3	Kupplung von in situ gebildetem DNBS-Val-Cl	40
2.5.4	Synthesen mit in situ gebildeten sterisch gehinderten DNBS-Aminosäurehalogeniden	42

2.6 Anwendung der Arensulfonyl-geschützten Aminosäurechloride in der Festphasensynthese 46
2.6.1 Synthesen mit o-NBS-MeAib-Cl 46
2.6.2 Beladungsbestimmungen 47
2.6.3 Synthese eines Urocortin-Analogons 48
2.6.3.1 CD-spektroskopische Untersuchungen 50
2.6.3.2 Untersuchungen zur biologischen Aktivität 51
2.6.4 Nebenreaktionen Arensulfonyl-geschützter Aminosäurehalogenide im Verlauf der SPPS 52
2.7 Untersuchungen zur Stereomutation von DNBS-Aminosäurehalogeniden 56
2.7.1 Einfluß der Abspaltbedingungen auf die Stereomutation 56
2.7.2 Untersuchungen zur Stereomutation bei der Kupplung von DNBS-Val-Cl 57
3 Zusammenfassung 59
4 Ausblick 61
5 Experimenteller Teil 62
5.1 Geräte 62
5.2 Chemikalien 63
5.3 Synthesen der Aminosäurederivate 63
5.3.1 Synthese der Aminosäuremethylester 63
5.3.2 Synthese von Referenzsubstanzen 64
5.3.3 Tosyl- und Pbf-Aminosäuren nach dem Schotten-Baumann-Verfahren 65
5.3.4 NBS- und DNBS-Aminosäuren 66
5.3.5 Arensulfonyl-geschützte Aminosäurefluoride 68
5.3.6 Arensulfonyl-geschützte Aminosäurechloride 69
5.4 Kupplungen der Arensulfonylaminosäurehalogenide 71
5.4.1 RSO_2-Aib/MeAib-X an Aib-OMe 71
5.4.2 RSO_2-Aib/MeAib-X an MeAib-OMe 72
5.4.3 Synthese von DNBS-Val-Val-OMe 75
5.5 Abspaltung der Arensulfonylschutzgruppe 76
5.5.1 Abspaltung der Pbf-Schutzgruppe 76
5.5.2 Abspaltung der NBS-Schutzgruppe 77
5.5.3 Abspaltung der DNBS-Schutzgruppe 77

5.6 Kupplungen mit in situ gebildeten Aminosäurechloriden 77
5.6.1 In situ Aktivierung am Essigsäuremodell 77
5.6.2 In situ Aktivierung von DNBS-Val-OH 77
5.6.3 IR-Untersuchungen zum Abfangen von $SOCl_2$ mit t-BuOH 78
5.6.4 Kupplung mit in situ gebildetem DNBS-Val-Cl 79
5.6.5 Acylierungen mit in situ gebildeten, sterisch gehinderten Aminosäurechloriden 79
5.7 Festphasensynthesen 82
5.7.1 Harzsynthese von MeAib-Aib-Phe-Phe 82
5.7.2 Synthese eines Urocortin-Analoga 83
5.7.3 Harzkupplungen mit in situ gebildeten Aminosäurechloriden 84
5.7.4 Untersuchungen mit DNBS-Val-Cl/OH (Siehe Nebenreaktionen SPPS) 85
5.8 Untersuchungen zum Auftreten von Stereomutation 86

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Aib	α-Aminoisobuttersäure, α-Methylalanin
AN	Acetonitril
Boc	tert. Butyloxycarbonyl-
BSA	N, O-Bis(trimethylsilyl)acetamid
CD	Circulardichroismus
CHN	Elementaranalyse
CRF	Corticotropin Releasing Factor
DAST	Diethylaminoschwefelsäuretrifluorid
DBU	1,5-Diazabicyclo[5.4.0]undec-5-en
DCC	N,N‘-Dicyclocarbodiimid
DCl	Deuterierte Chlorwasserstoffsäure
DCM	Dichlormethan
Deg	Diethylglycin
DIEA	Diisopropylethylamin
DICPDI	N, N‘-Diisopropylcarbodiimid
Dmb	Dimethoxybenzyl-
DMF	Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfid
DNBS	Dinitrobenzensulfonyl-
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektroskopie
Fmoc	Fluorenyl-9-methyloxycarbonyl-
FT-IR	Fourier Transformations Infrarot-Spektroskopie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
HAc	Essigsäure
HBr	Bromwasserstoffsäure
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HF	Fluorwasserstoffsäure
Hmb	N-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol

HPLC	High performance liquid chromatographie
IR	Infrarot-Spektroskopie
Iva	Isovalin
KOBt	Kaliumsalz des KOBt
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
MBHA	4-Methylbenzhydrylamin-Harz
ME	β-Mercaptoethanol
MeAib	N-Methylaminoisobuttersäure
MS	Massenspektrometrie
Mtr	4-Methoxy-2, 3, 6-trimethylbenzensulfonyl-
Mts	2, 4, 6-Trimethylbenzensulfonyl-
NA	β-Naphtylamid
NCA	N-Carboxyanhydrid
NBS	Nitrobenzensulfonyl-
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OBzl	Benzylester
OEt	Ethylester
OMe	Methylester
OPfp	Pentafluorphenylester
OR‘	Ester allgemein
Pmc	2, 2‘, 5, 7, 8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-
PyBOP	(1H-Benzotriazol-1-yl-oxy)-tris(pyrrolidino)phophonium-hexafluorophphat
PyBROP	Bromo-tris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorid
RSO_2	Arensulfonylschutzgruppe
SG	Schutzgruppe; allgemein
SG_C	Carboxylschutzgruppe
S RAM	Tentagel S RAM Harz
TBTU	1 N-[(Benzotriazol-1-yl)(methylamino)methylen]-N-methylmethanaminium-tetrafluoroborat
t-$BuNH_2$	tert.-Butylamin
t-BuOH	tert.-Butanol

TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormerthansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMSO	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat(Trimethylsilyl-triflat)
Tos	Tosyl; 4-Toluolsulfonyl-
TP	Thiophenol
Trityl	Triphenylmethyl-
UV	Ultraviolett
Z	Benzyloxycarbonyl-

1 Einleitung

1.1 Bedeutung und Entwicklungstand der Peptidsynthese

Peptide, Kondensationsprodukte aus Aminosäuren, spielen im menschlichen Organismus eine große Rolle. Sie haben für viele Lebensvorgänge essentielle Bedeutung, da sie physiologische und biochemische Vorgänge im Körper steuern. Peptide fungieren unter anderem als Neurotransmitter, Neuromodulatoren und sind als Hormone an rezeptorvermittelten Prozessen beteiligt. Struktur-Wirkungs-Untersuchungen von biologisch aktiven Peptiden werden für die Erforschung der molekularen Basis solcher biochemischer und pharmakologischer Prozesse durchgeführt. Eine Voraussetzung dafür ist die erfolgreiche Synthese einer Vielzahl von Peptidanaloga, was die Entwicklung effizienter Synthesestrategien notwendig macht. Mit der Entwicklung der Festphasensynthese [1] ist es möglich geworden, in relativ kurzer Zeit eine Vielzahl von Peptiden und Peptidwirkstoffen herzustellen. Durch die Möglichkeit, überschüssige Reagenzien bei jedem Syntheseschritt einsetzen zu können, sind schnelle und vollständige Reaktionen in kurzer Zeit realisierbar. Diese Überschüsse können nach der Reaktion einfach ausgewaschen werden. Damit wurde es auch möglich, Peptidsynthesen zu automatisieren (Zykluszeiten von ca. 30 min).

In den letzten Jahren sind sowohl auf dem Gebiet der Festphasensynthese wie auch auf dem Gebiet der Lösungssynthese enorme Fortschritte erzielt worden. Ein herausragendes Beispiel ist die Synthese von GFP (Green Fluorescence Protein) bestehend aus 238 Aminosäuren [2]. In Tab. 1 sind Beispiele zur Chemosynthese großer Peptide aufgeführt. Synthesen großer Peptide bis hin zu Proteinen setzen optimierte Syntheseverfahren und Reinigungsmethoden voraus. Trotz optimierter Synthesemethodik treten bei der Herstellung selbst kleiner Peptide teilweise schwer beherrschbare Probleme auf. KENT bezeichnete Peptide, bei denen es zu Schwierigkeiten während der Kettenverlängerung kommt, als „difficult sequences“ [9]. Dabei kommt es zu unvollständigen Acylierungen bzw. unvollständigen Schutzgruppenabspaltungen während des stufenweisen Aufbaus, in deren Folge Fehl- und/oder Abbruchsequenzen auftreten, welche die Herstellung der gewünschten Peptide wesentlich erschweren.

Tab. 1: Beispiele zur Chemosynthese von langkettigen Peptiden bzw. Proteinen

Peptid	Anzahl der AS	Synthese	Referenz
Parathyroidhormon	84	SPPS	[3]
β-Lipotropin	89	Fragmentkondensation, SPPS	[4], [5]
Ribonuclease A	124	SPPS	[6], [7]
Interleukin-3	140	SPPS	[8]
Wachstumshormon	188	SPPS	[5]
Green Fluorescence Protein (GFP)	238	SPPS, Fragmentkondensation in Lösung	[2]

Die bei „difficult sequences“ auftretenden Syntheseprobleme können auf zwei verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Einerseits kann die Kupplung von sterisch

anspruchsvollen Aminosäuren (z.B. Aminosäuren mit voluminösen Seitenketten oder Seitenkettenschutzgruppen, α, α-Dialkylaminosäuren, N^{α}-Alkylaminosäuren) aufgrund der sterischen Hinderung der Amino- bzw. der angreifenden Carboxylkomponente zu sehr langsamen und damit unvollständigen Acylierungen führen. Beispielsweise war die Synthese von Peptaibolen lange Zeit problematisch, weil die Kupplung von aufeinanderfolgenden Aib-Resten (Aib = Aminoisobuttersäure) mit herkömmlichen Kupplungsmethoden zu unzureichenden Ergebnissen führte [10]. Andererseits kann es bei Verlängerung der Peptidkette durch Ausbildung intra- und/oder intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Übergang von random-coil-Strukturen zu β-Faltblatt- und α-helikalen Strukturen kommen. Infolge der Ausbildung von β-Faltblattstrukturen kommt es zu einer Schrumpfung des Harzes. Ursache hierfür ist die durch die β-sheet-Bildung verschlechterte Solvatation des Harzes und der Peptidkette, wodurch die Quellung der Harze nicht mehr in ausreichendem Maße gegeben ist. Dadurch wird auch die Diffusion der reaktiven Komponenten in die Harzmatrix erschwert. Dies führt zu Problemen bei der Kupplung und beim Nachweis unumgesetzter Aminogruppen [11], [12]. Nach Abspaltung vom Harz kann es bei derartigen Peptiden durch die Assoziation der Peptidketten zu Problemen bei der Charakterisierung und Reinigung kommen [13].

Ein Beispiel für „difficult sequences“ ist die Synthese der sogenannten REDEMANN-Sequenz, einer Teilsequenz eines von cytotoxischen T-Lymphocyten gebildeten Proteins. Dieses aus nur 26 Aminosäuren bestehende Peptid konnte mit herkömmlichen Synthesetechniken nicht bzw. in nur geringen Ausbeuten erhalten werden [14]. Erst der Einsatz der Aminosäurefluoride führte zu guten Ergebnissen. Auch für eine Teilsequenz des Acyl Carrier Proteins (65-74) sind Syntheseschwierigkeiten beschrieben worden [15]. Es wurde aus diesem Grund häufig als Modellpeptid für die Erprobung neuer Synthesestrategien genutzt.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Versuche unternommen, die Probleme der „difficult sequences“, die durch Assoziation bedingt sind, zu überwinden. Fortschritte wurden dabei im wesentlichen erzielt durch:

- optimierte Lösungsmittelgemische und Additiva zur Verbesserung der Solvatation der wachsenden Peptidkette,
- Acylierungsreaktionen bei erhöhter Temperatur,
- Entwicklung von Harzen mit besseren Solvatationseigenschaften.

Durch den Übergang zu polaren Lösungsmitteln wie DMF, N-Methylpyrrolidon oder Pyridin anstatt THF oder DCM werden die Acylierungsgeschwindigkeiten erhöht und die Ausbeuten deutlich verbessert [16], [17]. Die Entwicklung der sogenannten „magic mixture“, einer Mischung aus DMF, DCM und NMP sowie Zusätzen von Triton X-100 und Ethylencarbonat durch BAYER et al. soll zur effizienten Solvatation der wachsenden Peptidketten und des Syntheseharzes und damit zur Überwindung von Syntheseschwierigkeiten führen, was für die Synthese von Humaninsulin gezeigt wurde [18].

Durch die Anwendung sogenannter Strukturbrecher wie z. B. Trifluoressigsäure, Trifluorethanol, [19], [20] oder Hexafluorisopropanol kann durch Verhinderung der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen die Sekundärstrukturbildung gestört und so eine Weiterführung der Synthese ermöglicht werden [21], [22], [23], [24]. Auch durch die Zugabe chaotroper Salze zur Reaktionslösung, wie Lithiumsalze [25], [26], $NaClO_4$, KSCN /27/ und Harnstoffe [17], konnten höhere Kupplungsausbeuten für „difficult

sequences“ erzielt werden. Weiterhin wurden bei erhöhter Temperatur eine effizientere Schutzgruppenabspaltung und höhere Ausbeuten erreicht [28], [29], [30]. Durch Verringerung der Kapazität von Syntheseharzen wird der Abstand zwischen den aufzubauenden Peptidketten und damit auch deren Assoziationstendenz verringert. Dieser Effekt wird noch verstärkt durch Einbau von PEG-Spacer zwischen Harzmatrix und Peptidkette, wobei der PEG-Spacer auch eine erhöhte Solvatation des Peptidharzes bewirkt [31], [32], [33], [34].

Ein kürzlich entwickeltes Verfahren zur Vermeidung von Sekundärstrukturen während der Kettenverlängerung besteht im Einbau von reversiblen N-Schutzgruppen am Peptidrückgrat. Durch Substitution von Amidprotonen werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Peptidketten verhindert. Es konnte gezeigt werden, daß schon der Austausch jedes 5. bzw. 6. Amidprotons innerhalb der Peptidkette gegen eine Alkylschutzgruppe die Assoziation der Peptidketten herabsetzt [35]. Mit der Entwicklung der N-(2-Hydroxy-4-methoxybenzyl)-Schutzgruppe (Hmb) war es möglich, bisher schwer zugängliche Sequenzen effizienter zu synthetisieren [36]. Die sterische Hinderung, die durch den N-Alkylrest verursacht wird, verringert die Acylierungsgeschwindigkeit für die Aminokomponente. Dieser Nachteil wird durch die Einführung einer phenolischen Hydroxylfunktion in die ortho-Position des Aromaten der Alkylschutzgruppe kompensiert, der zu einer effektiven Kupplung an die N-alkylierte Aminokomponente durch eine Base-katalysierte O-Acylierung mit anschließender intramolekularer Acyl-Transfer-Reaktion führt. Diese Technik kann aber nur begrenzt angewendet werden, da sie schon bei der Kupplung von Valin an (Hmb)-Valin versagt [35]. Eine weitere temporäre N-Schutzgruppe ist die Dimethoxybenzylschutzgruppe (Dmb). Es wurde gezeigt, daß es mit dieser Schutzgruppe möglich ist, die bei Peptiden, die mehr als 4 aufeinanderfolgende Alaninreste enthalten, auftretenden Lösungsschwierigkeiten zu überwinden [37].

Auch wenn assoziationsbedingte Syntheseschwierigkeiten durch die Einführung temporärer Amidschutzgruppen reduziert werden können, so erwächst daraus das Problem der sterischen Hinderung bei Kupplungen an N-Alkylaminosäurereste.

In verschiedenen natürlich vorkommenden, antibakteriell wirksamen Peptiden sind sterisch anspruchsvolle Aminosäuren wie Aib, N-MeVal oder MeAib enthalten. Kürzlich wurde von verschiedenen Gruppen [38], [39], [40] beschrieben, daß der Einbau sterisch anspruchsvoller Aminosäuren in Peptide zu einer Stabilisierung ihrer Sekundärstruktur führt. Ein Beispiel hierfür sind die Peptaibole, wie z. B. das Alamethicin. Peptaibole sind natürlich vorkommende Peptide, die mehrere sterisch gehinderte Aib-Reste enthalten. Sie sind dafür bekannt, spannungsabhängige Ionenkanäle in Lipiddoppelschichten bilden zu können, die für bestimmte Kationen durchlässig sind [41]. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde in den letzten Jahren verstärkt versucht, Vertreter dieser Familie zu synthetisieren sowie durch Austausch verschiedener Aminosäurereste Analoga herzustellen.

Zusätzlich zu natürlich vorkommenden antibakteriell wirkenden Peptiden wurde gezeigt, daß Peptide, die mehrere α, α-Dialkylaminosäuren enthalten, resistent gegen enzymatische Hydrolyse sind und infolgedessen bessere Voraussetzungen für eine in vivo Anwendung besitzen.

Abb. 1 zeigt ein Beispiel eines antibakteriell wirkenden Peptides, in welches mehrere α,α-Dialkylaminosäurereste eingebaut wurden. Das Peptid zerstört selektiv bestimmte Bakterien, aber es greift keine gesunden Zellen an [39].

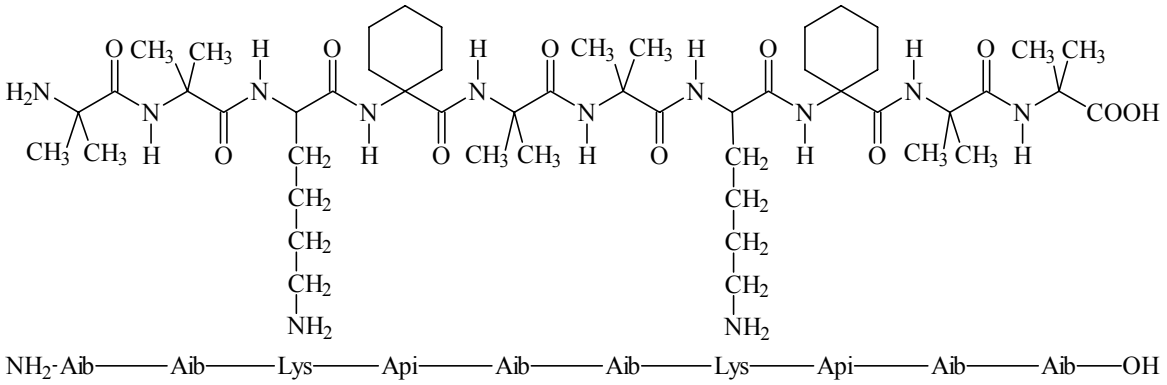


Abb. 1: Beispiel für antibakteriell wirksame, α, α-Dialkylaminosäuren enthaltende Peptide; Aib=Aminoisobuttersäure, Api= 4-Aminopiperidin-4-carbonsäure

Die chemische Synthese von Peptiden, bestehend aus sterisch anspruchsvollen Aminosäuren, ist oft schwierig, da die Acylierung solcher Aminosäuren nur unter drastischen Bedingungen möglich ist. Die Limitierungen für die Synthese dieser Peptide können nur durch sehr reaktive Acylkomponenten, die möglichst kleine Abgangsgruppen aufweisen, überwunden werden. Daraus leitet sich ein besonderes Interesse für die Verwendung von Aminosäurehalogeniden ab, die bisher wegen „Überaktivierung“, die Ursache für verschiedene Nebenreaktionen (z.B. Verlust der chiralen Integrität) ist, wenig Anwendung für Standardsynthesen fanden [42].

1.2 Aminosäurehalogenide in der Peptidchemie

1.2.1 Fmoc-Aminosäurefluoride

1990 konnten CARPINO et al. zeigen, daß sich die Fmoc-Aminosäurefluoride einfach herstellen lassen und daß sie für die Peptidsynthese gut geeignet sind [43], [44], [45], [46]. Auch von trifunktionellen Aminosäuren, die in der Seitenkette z. B. t-Butyl-, Trityl- oder Boc- geschützt sind, wurden stabile Fmoc-Aminosäurefluoride erhalten. Man kann die Aminosäurefluoride auf 2 unterschiedlichen Wegen herstellen. Einerseits gelingt die Umsetzung von Fmoc-Aminosäuren mit Cyanurfluorid in trockenen DCM (Abb. 2) linke Seite) [43]. Diese Methode ist nachteilig, da die bei der Reaktion entstehende Cyanursäure ausfällt und die Aufarbeitung erschwert. Dieses Problem kann durch Verwendung von DAST (Abb. 2 rechte Seite) beseitigt werden, wobei die bei der Reaktion entstandenen Folgeprodukte durch Extraktion leicht zu entfernen sind [47].

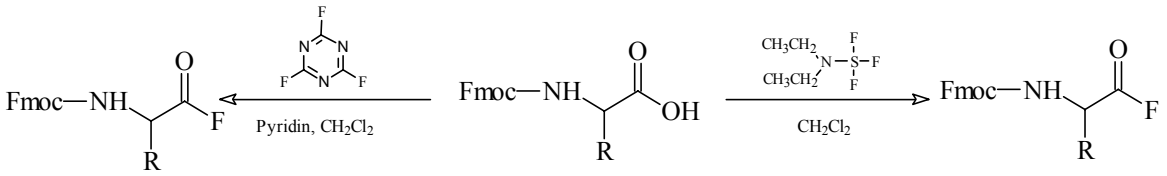


Abb. 2: Syntheseschema für geschützte Aminosäurefluoride

Die Aminosäurefluoride erwiesen sich als effiziente Kupplungsreagenzien für die Peptidsynthese. Erstmals konnten mit Hilfe der Fluoridtechnik Peptaibole (siehe S. 11) mittels Festphasensynthese hergestellt werden. Neben ihrer hohen Reaktivität haben die Aminosäurefluoride noch andere vorteilhafte Eigenschaften. Die Oxazolonbildung, eine Nebenreaktion aktivierter Acyl-geschützter Aminosäurederivate, die zu einem Verlust der chiralen Integrität führen kann (siehe Abb. 7), erfolgt bei Fmoc-geschützten, proteinogenen Aminosäurefluoriden in Gegenwart einer Base so langsam, daß Acylierungsreaktionen nicht beeinträchtigt werden [43]. Die Fmoc-Aminosäurefluoride sind in organischen Lösungsmitteln gut löslich und relativ stabil bei der Lagerung [48]. Außerdem konnte gezeigt werden, daß für die Kupplung von Fmoc-Aminosäurefluoriden ein Basenzusatz zum Abfangen der entstehenden HF nicht unbedingt notwendig ist [49].

Die Grenzen der Fmoc-Aminosäurefluorid-Technik für den Einbau sterisch stark gehinderter Aminosäurereste, wie α, α-Dialkylaminosäuren bzw. N-Methyl-Aminosäuren, in Peptide wurde für die Reaktionen der Aminosäurefluoride von Fmoc-Aib, Fmoc-Iva, Fmoc-Deg und Fmoc-MeAib an Aib-OMe gezeigt [50], [51].

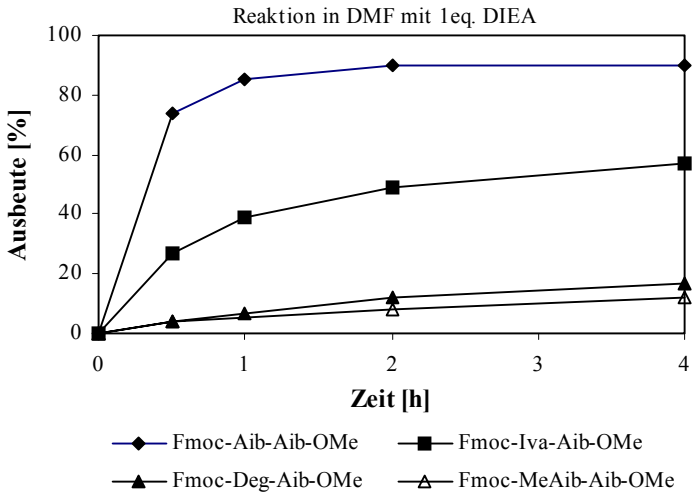


Abb. 3: Vergleich der Umsätze sterisch gehinderter Fmoc-Aminosäurefluoride an Aib-OMe [50], [51]

Während für die Kupplung von Fmoc-Aib-F und Fmoc-Iva-F an Aib-OMe gute Ergebnisse erzielt wurden, waren die Kupplungsausbeuten der stärker gehinderten Aminosäurefluoride relativ gering (Abb. 3). Als primäre Reaktion wurde die unerwünschte Base-katalysierte Fmoc-Abspaltung beobachtet (Abb. 4).

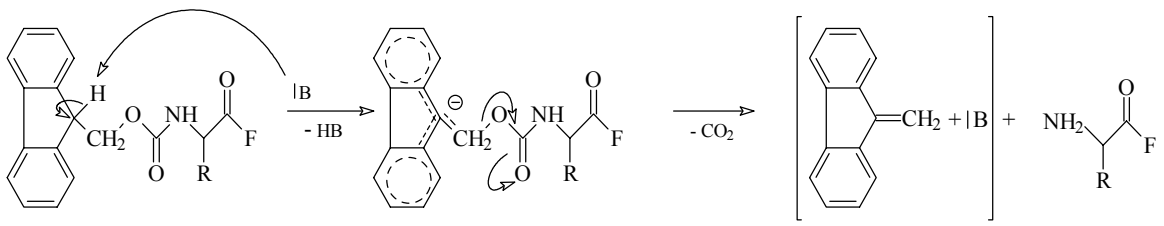


Abb. 4: Base-katalysierte Fmoc-Abspaltung

Kupplungen in einem unpolaren Lösungsmittel wie DCM ohne Zusatz einer zusätzlichen Base vermindert die Bildung von Dibenzofulven erheblich; die Kupplungsausbeuten für sterisch stark gehinderte Systeme sind aber trotzdem sehr gering [50].

Eine zusätzliche Silylierung der Aminokomponente [52], [53] führt zu einer Erhöhung der Acylierungsausbeuten sterisch anspruchsvoller Aminosäuren, wie z. B. für Fmoc-MeAib an Aib-OMe [54], [55], [56]. Bei den in DCM durchgeführten Reaktionen konnte durch Silylierung von Aib-OMe mit N, O-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) erstmals das Dipeptid Fmoc-MeAib-Aib-OMe in bemerkenswerter Ausbeute (>30%) erhalten werden (Abb. 5). Im Vergleich dazu erhielten TONIOLO et al. das Z-geschützte Dipeptid nur mit einer Ausbeute von 17% (72h, 82°C) durch Kupplung mit dem symmetrischen Anhydrid $(Z\text{-MeAib})_2O$ [57].

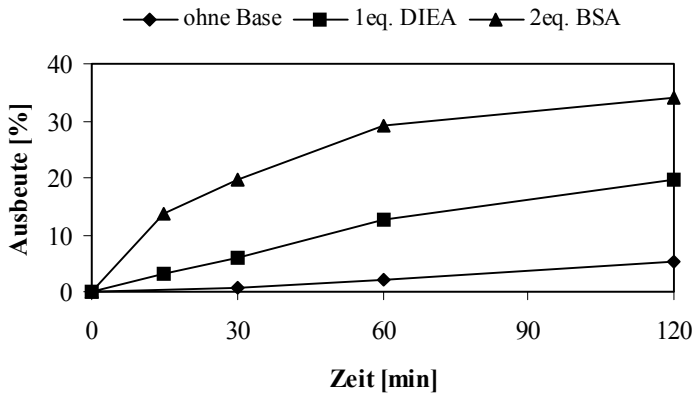


Abb. 5: Kupplung von Fmoc-MeAib-F an Aib-OMe in DMF bei Einsatz verschiedener HCl-Fänger

Der Effekt der Silylierung ist bisher ungeklärt. Einerseits spielt die temporäre Maskierung der Aminokomponente eine wesentliche Rolle. Durch die Silylierung der Aminofunktion wird die Basizität des Stickstoffes herabgesetzt und somit Base-katalysierte Nebenreaktionen Fmoc-geschützter Aminosäurefluoride verhindert. Andererseits ist die Bildung des Silylfluorides energetisch günstig und könnte die Reaktion dadurch beschleunigen.

1.2.2 Aminosäurechloride

Die Verwendung von N^{α}-geschützten Aminosäurechloriden für die Peptidsynthese wurde schon von E. FISCHER beschrieben [58]. Die Kettenverlängerung über das Dipeptid

hinaus war aber nicht möglich, da beim Versuch einer Abspaltung der von FISCHER verwendeten N-Ethoxycarbonyl-Schutzgruppe die Peptidbindung wieder zerstört wurde [59]. Erst mit der Entwicklung der leichter abspaltbaren Tosyl-Schutzgruppe durch SCHÖNHEIMER [60] bzw. der Benzyloxycarbonylschutzgruppe (Z) durch BERGMANN und ZERVAS [61] wurde eine Nutzung der Aminosäurechloride möglich. Die Kupplung der Aminosäurechloride erfolgte sowohl unter Schotten-Baumann-Bedingungen als auch in organischen Lösungsmitteln mit 2 eq. Aminosäureester. BERGMANN et al. konnten Dipeptide von Gly oder Ala mit Aminoisobuttersäureethylester in sehr guten Ausbeuten synthetisieren [62]. Razemisierungsuntersuchungen an anderen Modellpeptiden zeigten eine geringe Razemisierungstendenz bei Kupplungen mit Z-geschützten Aminosäurechloriden. Z-geschützte Aminosäurechloride neigen jedoch zum spontanen Zerfall [63], wobei es zur Bildung von Benzylchlorid und dem entsprechenden N-Carboxyanhydrid, dem sogenannten Leuchs'schen Anhydrid, kommt (Abb. 6).

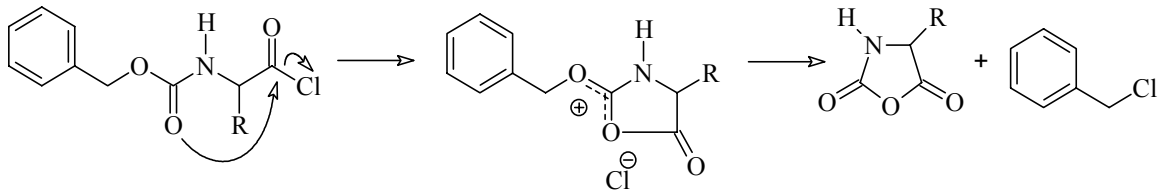


Abb. 6: Zerfall Z-geschützter Aminosäurechloride

An die Grenzen der Herstellung Z-geschützter Aminosäurechloride kommt man beim Versuch der Synthese von Z-Aib-Cl. Die Umsetzung von Z-Aib-OH mit Chlorierungsreagenzien liefert nur das entsprechende Oxazolon (Abb. 7).

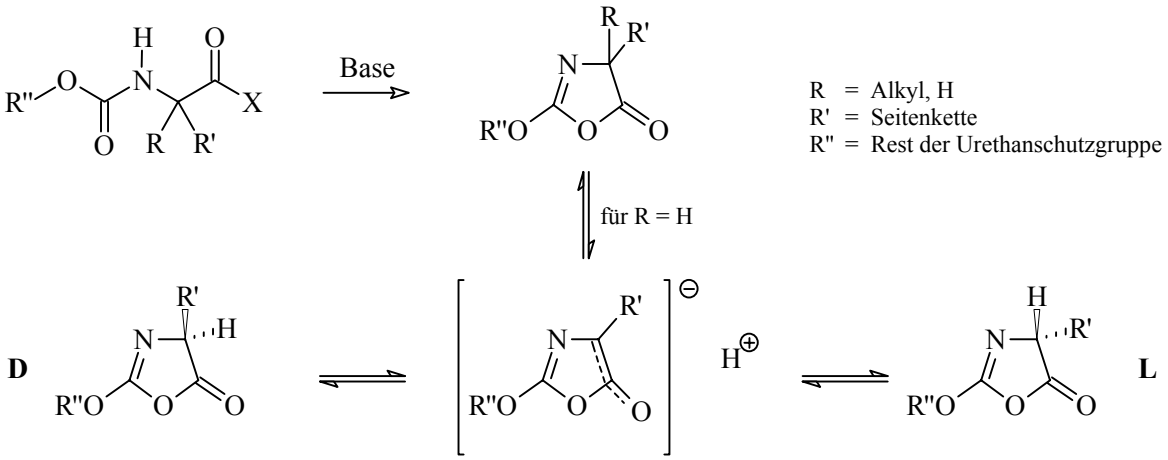


Abb. 7: Verlust der chiralen Integrität durch Oxazolonbildung

Die Oxazolonbildung urethangeschützter Aminosäurechloride, die zum Verlust der Konformation führen kann, tritt verstärkt bei Aminosäuren mit 2 geminalen C^{α}-Alkylgruppen auf [64]. Durch den Austausch des C^{α}-Protons durch sterisch anspruchsvollere Gruppen wie z.B. Alkylgruppen wird der Bindungswinkel θ geändert.

Dadurch wird die Oxazolonbildung erleichtert (Abb. 8).

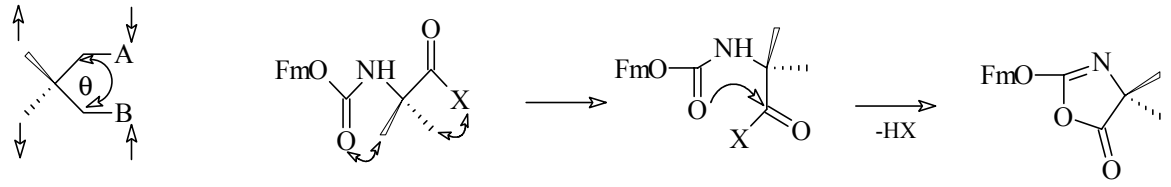


Abb. 8: Geminaler Dialkyleffekt

Tosyl-geschützte Aminosäurechloride können aufgrund ihrer Struktur keine Oxazolone bilden. Es konnte gezeigt werden, daß sterisch gehinderte Aminosäuren, die als urethangeschützte Aminosäurechloride keine effiziente Kupplung erlauben, wie z. B. zwei C^{α}-Dialkylaminosäuren, miteinander verknüpft werden können. So konnten im wasserfreien organischen Lösungsmittel das Dipeptid Tos-MeAib-Aib-OMe mit einer Ausbeute von 8% und Tos-Aib-Aib-OMe mit einer Ausbeute von 83% synthetisiert werden [65]. Die Abspaltung der Tosylgruppe erfolgt unter relativ drastischen Reaktionsbedingungen (Na/fl. NH_3; HBr/AcOH), die eine Anwendbarkeit dieser Schutzgruppe stark limitiert. Zudem wurde gezeigt, daß die Tosylaminosäurechloride im alkalischen Milieu einer Fragmentierung unterliegen können (abhängig von Aminosäure und pH-Wert) [66].

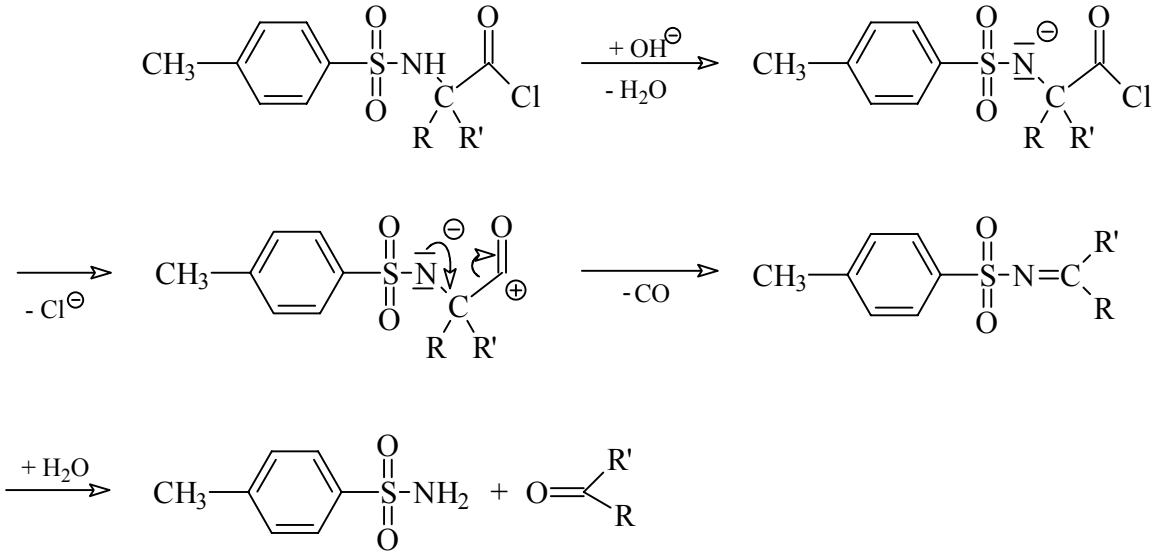


Abb. 9: Fragmentierung von Tosylaminosäurechloriden im wäßrig-alkalischen Milieu

Dabei entsteht Tosylamid, Kohlenmonoxid sowie ein Aldehyd bzw. Keton. Der genaue Mechanismus dieser Zerfallsreaktion ist nicht geklärt; vorgeschlagen wurde der in Abb. 9 dargestellte Weg.

Mit der Entwicklung der Fmoc-Schutzgruppe als säurestabile Schutzgruppe, die unter

milden Bedingungen Base-katalysiert abspaltbar ist, war es möglich, die Aminosäurechloride im biphasischen System für die Synthese kurzer Peptide zu nutzen [67], [68], [69]. Fmoc-Aminosäurechloride können für bifunktionelle Aminosäuren als kristalline Feststoffe erhalten werden und sind bei Lagerung stabil. Für die Kupplung der Fmoc-Aminosäurechloride in Lösung ist ihre Anwendung jedoch limitiert, da hier zum Abfangen des gebildeten Hydrogenchlorides eine Base zugesetzt werden muß. Dies führt zur unerwünschten Oxazolonbildung. In einigen Forschungsgruppen hat man versucht diese Limitierungen durch Reaktionszusätze zu überwinden. So konnte die Anwendbarkeit der Fmoc-Aminosäurechloride unter Zusatz einer Mischung von Base und HOBt gezeigt werden [70]. Dabei wird das Aminosäurechlorid in den korrespondierenden OBt-Ester umgewandelt, welcher dann im Acylierungsschritt reagiert. Außerdem wurden gute Kupplungsausbeuten durch den Einsatz von z. B. AgCN, KOBt oder Zinkstaub beschrieben [71], [72], [73], [74]. Der Reaktionsmechanismus dieser Zusätze ist nicht geklärt. Tabelle 2 zeigt die Ausbeuten für die Herstellung des sterisch gehinderten Systems Boc-/Fmoc-Aib-Aib-OR für verschiedene Kupplungsmethoden.

Aus den in Tab. 2 dargestellten Kupplungsausbeuten ist ersichtlich, daß nur mit den Aminosäurehalogeniden gute Ergebnisse erzielt werden konnten, wodurch vermutet werden kann, daß beim KOBt-Zusatz zu Aminosäurehalogeniden nicht ausschließlich der Aktivester als reaktive Spezies für die hohen Ausbeuten verantwortlich sein kann.

Tab. 2: Vergleich der mit verschiedenen Methoden erzielten Ausbeuten für die Synthese von SG-Aib-Aib-OR

Produkt	**Methode**	**Kuppl.-zeit**	**Ausbeute**	**Referenz**
Boc-Aib-Aib-OBzl	DCC/HOBt*	48h	63%	[75]
Boc-Aib-Aib-OMe	PyBOP*	16h	86%	[76]
Boc-Aib-Aib-OMe	PyBroP^	24h	25%	[76]
Fmoc-Aib-Aib-OMe	Fmoc-Aib-F	2h	90%	[77]
Fmoc-Aib-Aib-OBzl	Fmoc-Aib-OPfp/HOBt*	1h	42%	[71]
Fmoc-Aib-Aib-OBzl	Fmoc-Aib-NCA^	1h	35%	[71]
Fmoc-Aib-Aib-OBzl	Fmoc-$(Aib)^2$-O^	1h	40%	[71]
Fmoc-Aib-Aib-OBzl	Fmoc-Aib-F/DIEA	1h	69%	[71]
Fmoc-Aib-Aib-OBzl	Fmoc-Aib-Cl/KOBt	1h	83%	[71]

* Die angeführten Reagenzien bilden als reaktive Spezies einen Aktivester aus.
^ Als reaktive Spezies reagiert ein Anhydrid.

1.3 Ziele der eigenen Arbeiten

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß sich Fmoc-Aminosäurefluoride für die Synthese von Peptiden, die α, α-Dialkylaminosäuren enthalten (z.B. Peptaibole), sehr viel besser eignen als Aktivesterderivate. Allerdings werden die Grenzen der Acylierung mit Aminosäurefluoriden für sterisch stark gehinderte N-Alkylaminosäuren erreicht, wobei sich die N-Methylierung der Aminokomponente auf die Kupplung deutlich negativer als

die entsprechende Substitution der Carboxylkomponente auswirkt [29]. Bei Verwendung der Fmoc-Aminosäurechloride kann der Vorteil der höheren Reaktivität der Säurechloride bisher nicht genutzt werden, da hier die Nebenreaktionen (z.B. Oxazolonbildung, Schutzgruppenabspaltung) schneller verlaufen als die eigentliche Acylierungsreaktion. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, einen Lösungsweg für die Synthese von Peptiden mit sterisch anspruchsvollen, teilweise extrem gehinderten Aminosäuren, wie Aib und MeAib auf der Basis der Aminosäurechloride unter Verwendung geeigneter N^{α}-Schutzgruppen zu finden.

- Ziel der Arbeit ist es, die bisher in der Literatur bekannten Nachteile der Säurechloridaktivierung zu überwinden. Die Untersuchungen beinhalteten folgende Schwerpunkte:
- Vergleich der Reaktivitäten von Aminosäurefluoriden und –chloriden bei Kupplung sterisch gehinderter Aminosäuren
- Untersuchung substituierter Arensulfonyl-geschützter N^{α}-Schutzgruppen für die Säurechloridaktivierung
- Anwendung substituierter Arensulfonyl-geschützter Aminosäurechloride in der Festphasensynthese
- Einbau sterisch extrem gehinderter Aminosäuren in biologisch aktive Peptide

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Vergleich der Reaktivität von Fmoc-Aminosäurefluorid und -chlorid

Obwohl die Reaktivität vom Säurefluorid zum Säurejodid in der Reihe der Halogenide steigt, werden unter bestimmten Voraussetzungen in einigen Fällen für Fmoc-Aminosäurefluoride, in anderen Fällen für Fmoc-Aminosäurechloride bessere Ergebnisse für die Kupplung sterisch anspruchsvoller Aminosäuren erzielt.

Ein Vergleich der Umsetzungen von Fmoc-geschützten Alaninhalogeniden (Chlorid, Fluorid) mit MeAib-OMe in Anwesenheit von BSA zeigt, daß die Reaktion des Aminosäurechlorides zu höheren Kupplungsausbeuten führt [78], [79]. Für die Umsetzungen von α, α-Dialkylaminosäurehalogeniden wie Fmoc-Aib-F/Cl mit MeAib-OMe läßt sich dieser Befund nicht bestätigen. Hier erhält man für das Fmoc-geschützte Aminosäurefluorid deutlich höhere Kupplungsausbeuten als für das entsprechende Aminosäurechlorid (Abb. 10).

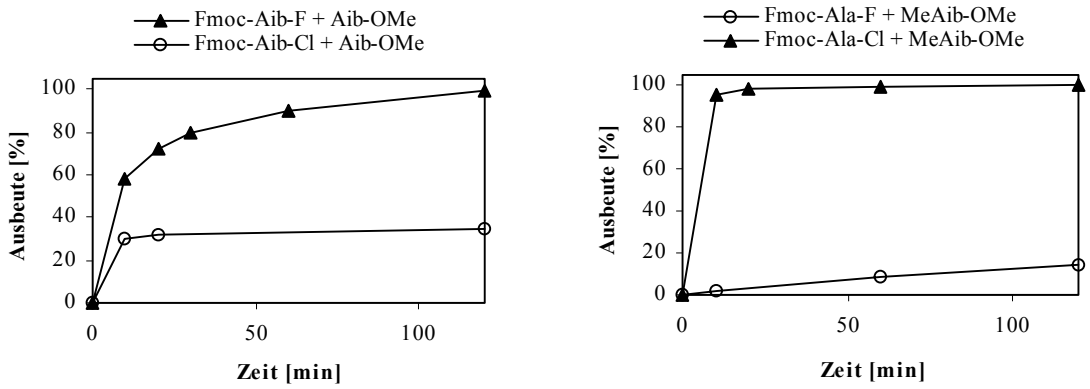


Abb. 10: Kupplung von **a)** Fmoc-Aib-X an Aib-OMe und **b)** Fmoc-Ala-X an MeAib-OMe in DCM mit BSA als HCl-Fänger

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Kupplungsergebnisse könnte darin liegen, daß die Reaktion des Aminosäurechlorids nur zu höheren Umsetzungen führt, solange die Acylierungsreaktion schneller als die Oxazolonbildung des Aminosäurechlorides verläuft. Dies ist bei Fmoc-Ala-Cl gegeben. (Es können auch Oxazolone als Acylierungsmittel verwendet werden, aber sie besitzen im Vergleich zu Aminosäurehalogeniden eine geringere Reaktivität.) Da aber für Fmoc-Aib-Cl (siehe auch geminaler Dialkyleffekt 1.2.2) die Oxazolonbildung so schnell erfolgt, daß nur ein Teil (ca. 30%) Säurechlorid für die Acylierung zur Verfügung steht, ist ein echter Vergleich der Säurechlorid- und Säurefluoridaktivierung hinsichtlich der Acylierungseffizienz in diesem Fall nicht möglich.

Es ist deshalb notwendig, den Vergleich der Reaktivität von Aminosäurefluorid und Aminosäurechlorid mit solchen Schutzgruppen durchzuführen, mit denen eine als Konkurrenzreaktion ablaufende Oxazolonbildung ausgeschlossen werden kann.

2.2 Eigenschaften Arensulfonyl-geschützter Aminosäurehalogenide

Im Rahmen der Arbeit wurden mehrere Arensulfonylschutzgruppen auf ihre Anwendbarkeit für die Säurechloridaktivierung und weitere Nutzung in der Peptidchemie

überprüft. In diesem Kapitel wird auf die verschiedenen Schutzgruppen eingegangen, die während der Untersuchungen verwendet wurden. Neben der Tosylschutzgruppe wurde die Pbf-Schutzgruppe (2, 2‘, 4, 6, 7-Pentamethyldihydro-benzofuran-5-sulfonyl-) und sowohl o-, bzw. p- wie auch o, p-nitrosubstituierte Arensulfonylschutzgruppen eingesetzt (Abb. 11).

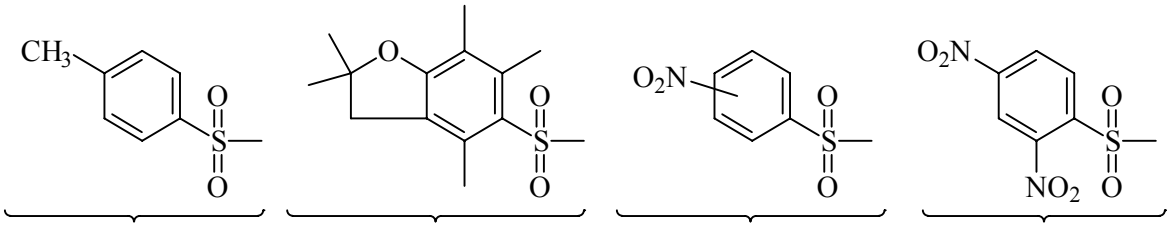


Abb. 11: Im Rahmen der Arbeiten verwendete Arensulfonylschutzgruppen

Im Verlauf der Arbeit zeigte sich, daß die verschiedenen Arensulfonyl-geschützten Aminosäurechloride in ihren Reaktivitäten voneinander abweichen. Neben der Säurechloridaktivierung scheinen für die unterschiedlich hohe Reaktivität auch elektronische Effekte der entsprechenden Arensulfonyl-N-Schutzgruppe verantwortlich zu sein. Während es sich beim Tosyl- und Pbf-Schutz mit der Methyl- bzw. Methoxygruppe um Substituenten mit positiven Induktionseffekt handelt, liegen bei der NBS- bzw. DNBS-Gruppe Substituenten mit negativen Induktionseffekt am Aromaten vor. Die unterschiedlich starken elektronischen Effekte der Schutzgruppen haben eine zusätzliche Veränderung der Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffes zur Folge. Dies führt zu einer unterschiedlich hohen Empfindlichkeit der Aminosäurechloride gegenüber Basen (siehe Nebenreaktionen 2.3.5.). Die verschiedenenen Substituenten am Benzenrest bedingen auch eine unterschiedliche Stabilität (siehe Deblockierungen Kap.2.4.).

2.2.1 Tosyl-geschützte Aminosäuren

Um die bereits in der Einleitung aufgeführten Nebenreaktionen (Oxazolonbildung) bei der Überführung von urethangeschützten Aminosäuren in das Säurechlorid zu vermeiden, war ein Wechsel zu einer Schutzgruppe ohne einen reaktionsfähigen Carbonylsauerstoff notwendig.

Mit der Tosylschutzgruppe wurden Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt, die für Säurehalogenide bekannte höhere Reaktivität der Säurechloride im Vergleich zu den Säurefluoriden speziell für α-Aminosäurehalogenide nachzuweisen.

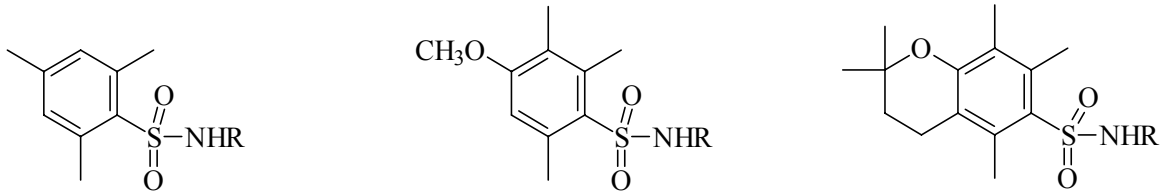
Die Eignung der Tosylschutzgruppe für die Herstellung von geschützten Aminosäurechloriden ist aus früheren Untersuchungen bekannt. SHEPPARD et al. beschrieben erstmals die erfolgreiche Kupplung von Tos-Aib-Cl an Aib-OMe im inerten organischen Lösungsmittel [65].

2.2.2 Pbf-geschützte Aminosäuren

Der Nachteil der Tosylschutzgruppe, der ihre Anwendung begrenzt, sind die relativ

drastischen Bedingungen bei der Entfernung des Tosylschutzes [80], [81]. Für eine Peptidsynthese ist deshalb ein Wechsel zu solchen Arensulfonylschutzgruppen notwendig, die unter milderen Bedingungen abspaltbar sind.

Es konnte gezeigt werden [82], daß durch Substitutionen am Phenylring die Abspaltbarkeit der Schutzgruppe verändert werden kann. So wurden in den letzten Jahren neue, von der Arensulfonylgruppierung ausgehende Schutzgruppen entwickelt (Abb. 12). Die meisten dieser Schutzgruppen (Mts, Mtr, Pmc) kommen heute für den Schutz der Guanidinfunktion des Arginins zur Anwendung.



Mts = 2, 4, 6-Trimethyl-benzensulfonyl-

Mtr = 4-Methoxy-2, 3, 6-Trimethyl-benzensulfonyl-

Pmc = 2, 2', 5, 7, 8-Pentamethyl-chroman-6-sulfonyl-

Abb. 12: Verschiedene Arensulfonylschutzgruppen

Die kürzlich entwickelte Mts-Schutzgruppe kann nur durch Methansulfonsäure bzw. Trifluormethansulfonsäure abgespalten werden [83]. Dagegen läßt sich die Mtr-Schutzgruppe, die eine Methoxygruppe mehr besitzt, schon durch Trifluoressigsäure abspalten [83]. RAMAGE und Mitarbeiter berichteten, daß die von ihnen vorgestellte Pmc-Schutzgruppe schneller und effizienter als die Mtr-Gruppe abspaltbar ist [84]. Vor kurzem wurde die Anwendbarkeit der Pmc-Schutzgruppe für den N^{α}-Schutz beschrieben [85]. Die Abspaltung vom α-Stickstoff ist aber nur durch Verwendung von HBr/Eisessig möglich.

Für die vorliegende Arbeit wurde die Pbf-Schutzgruppe (siehe Abb. 11) genutzt. Da diese Schutzgruppe aufgrund ihrer rigideren Struktur im Ether-5-Ring noch säurelabiler ist als die Pmc-Schutzgruppe [86], sollte auch ihre Abspaltung vom α-Stickstoff der Aminosäure leichter erfolgen.

2.2.3 2- und 4-Nitrobenzensulfonylaminosäuren

Die in der Literatur beschriebenen 2- bzw. 4-Nitrobenzensulfonylschutzgruppen (NBS) sollten eine gute Alternative zur Pbf-Schutzgruppe sein, da sie durch nucleophile Substitution abgespalten werden können [87]. Diese ursprünglich für Alkylierungen von Sulfonamiden entwickelten Schutzgruppen lassen sich mittels Thiolat über einen Additions-Eliminierungs-Mechanismus am Aromaten entfernen. Die Reaktion verläuft über den sogenannten Meisenheimer-Komplex, welcher unter Freisetzung von SO_2 zerfällt, wobei das gewünschte Amin und ein Thioether entstehen (Abb. 13). Als Nucleophil wurden sowohl Thiophenol als auch Mercaptoessigsäure genutzt.

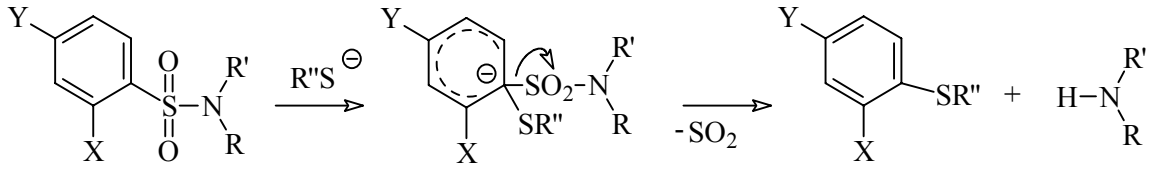
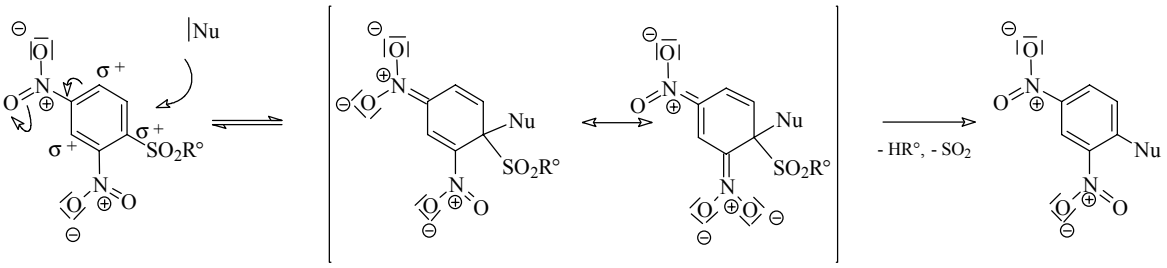


Abb. 13: Schema der Schutzgruppenabspaltung durch nucleophile Substitution

Die bisher von verschiedenen Gruppen durchgeführten Untersuchungen wurden nur an N-Alkylaminosäuren durchgeführt, bei denen die Abspaltung der NBS-Schutzgruppe ohne Probleme verlief. Unser Ziel war es, die Anwendbarkeit dieser Schutzgruppe auch für nicht alkylierte Aminosäuren zu testen.

2.2.4 Dinitrobenzensulfonylaminosäuren

Da die Abspaltung der o- bzw. p-NBS-Schutzgruppe von primären Aminosäuren sehr viel langsamer erfolgt als für N-alkylierte Aminosäuren, suchten wir nach einer alternativen Schutzgruppe, die schneller von primären Aminosäuren abgespalten werden kann. FUKUYAMA et al. berichteten kürzlich von der Verwendung des o-, p-Dinitroanalogen der NBS-Schutzgruppe, der DNBS-Gruppe [88].



R° = Aminosäurerest

Abb. 14: Abspaltung der DNBS-Schutzgruppe

Durch die zweite Nitrogruppe wird die Basizität des Aromaten noch weiter herabgesetzt, das Reaktionszentrum wird positiviert und die negative Ladung des bei der Reaktion als Zwischenprodukt entstehenden Anions kann besonders gut delokalisiert werden (Abb. 14). Die DNBS-Schutzgruppe sollte sich somit leichter von Stickstoff der α-Aminofunktion abspalten lassen.

2.2.5 Synthese Arensulfonyl-geschützter Aminosäuren und ihrer Halogenide

Man kann Arensulfonyl-geschützte Aminosäuren grundsätzlich auf 2 Wegen erhalten. Am

bekanntesten ist die Sulfonierung nach dem Schotten-Baumann-Prinzip. Im Verlauf der Arbeit zeigte sich jedoch, daß mit dieser Methode nicht immer optimale Ausbeuten möglich sind, da bei der Aufarbeitung Schwierigkeiten auftraten. Die Isolierung der Produkte war problematisch, da die Fällung selten vollständig verlief (Ausbeuten < 20%). Wir verwendeten deshalb eine Sulfonierungsmethode im nicht wäßrigen Lösungsmittelsystem. Bei dieser Methode wird als Lösungsmittel Acetonitril verwendet. Die Löslichkeit der zu sulfonierenden Aminosäure wird dabei durch Zugabe von BSA zur Reaktionslösung erhöht (siehe auch 5.3.3).

Sowohl die Tosyl- als auch die Pbf-Aminosäuren wurden nach dem Schotten-Baumann-Prinzip hergestellt (Tab. 3). Für die NBS- und die DNBS-Aminosäuren nutzten wir die neu entwickelte Synthesemethode (siehe 5.3.4). Die erhaltenen Arensulfonyl-geschützten Aminosäuren wurden mittels bekannter analytischer Methoden charakterisiert (IR, MS, HPLC, CHN und ^{1}H-NMR).

Tab. 3: Überblick über die während der Arbeit synthetisierten Arensulfonyl-geschützten Aminosäuren

Aminosäure	Ausbeute	Aminosäure	Ausbeute	Aminosäure	Ausbeute
Tos-Ala-OH*	47%	o-NBS-Aib-OH	93%	p-NBS-MeAib-OH	58%
Tos-Aib-OH*	31%	o-NBS-MeAib-OH	73%	DNBS-Val-OH	93,6%
Pbf-Aib-OH*	30%	o-NBS-Ala-OH	91%	DNBS-Aib-OH	89,7%
Pbf-MeAib-OH*	31,7%	o-NBS-Val-OH	91%	DNBS-MeAib-OH	50,6%
		p-NBS-Aib-OH	93%		

* Die Aminosäuren wurden nach der Schotten-Baumann-Methode synthetisiert.

Die Fluoride der Tosyl- und Pbf-Aminosäuren wurde mittels Cyanurfluorid und Pyridin hergestellt. Versuche, das Fluorid mit DAST herzustellen, führten zu öligen Produkten.

Der Gehalt an Fluorid wurde mittels HPLC nach Umwandlung in den entsprechenden Methylester ermittelt. Die Fluoride konnten mit einer Ausbeute von 75-80% erhalten werden. Die Charakterisierung der Aminosäurefluoride erfolgte mittels IR-Spektroskopie. Es wurde die für Aminosäurefluoride charakteristische Bande bei 1840-1850cm^{-1} (siehe Abb. 15) gefunden.

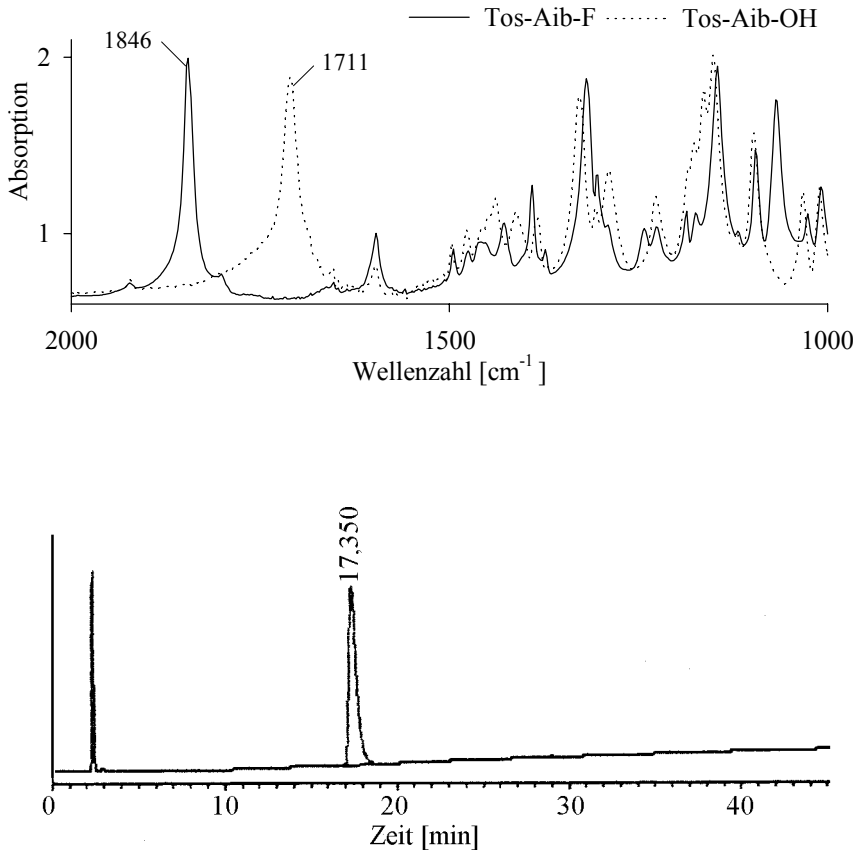


Abb. 15: Arensulfonyl-geschützte Aminosäurefluoride am Beispiel von Tos-Aib-F **a)** IR-Spektrum; **b)** HPLC-Profil

Alle synthetisierten Arensulfonyl-geschützten Aminosäurechloride wurden durch Umsetzung mit Thionylchlorid ($SOCl_2$) in trockenem DCM hergestellt. In der Literatur wurden bisher lediglich Synthese und Anwendung von Tosylaminosäurechloriden [65] sowie einmalig die Synthese eines o-NBS-geschützten Aminosäurechlorides [89] beschrieben.

Die Aminosäurechloride wurden mittels IR-Spektroskopie charakterisiert und zeigten die für Säurechloride charakteristische Bande bei 1795-1805cm^{-1} (Abb. 16). In einigen Fällen wurden NMR-Spektren aufgenommen.

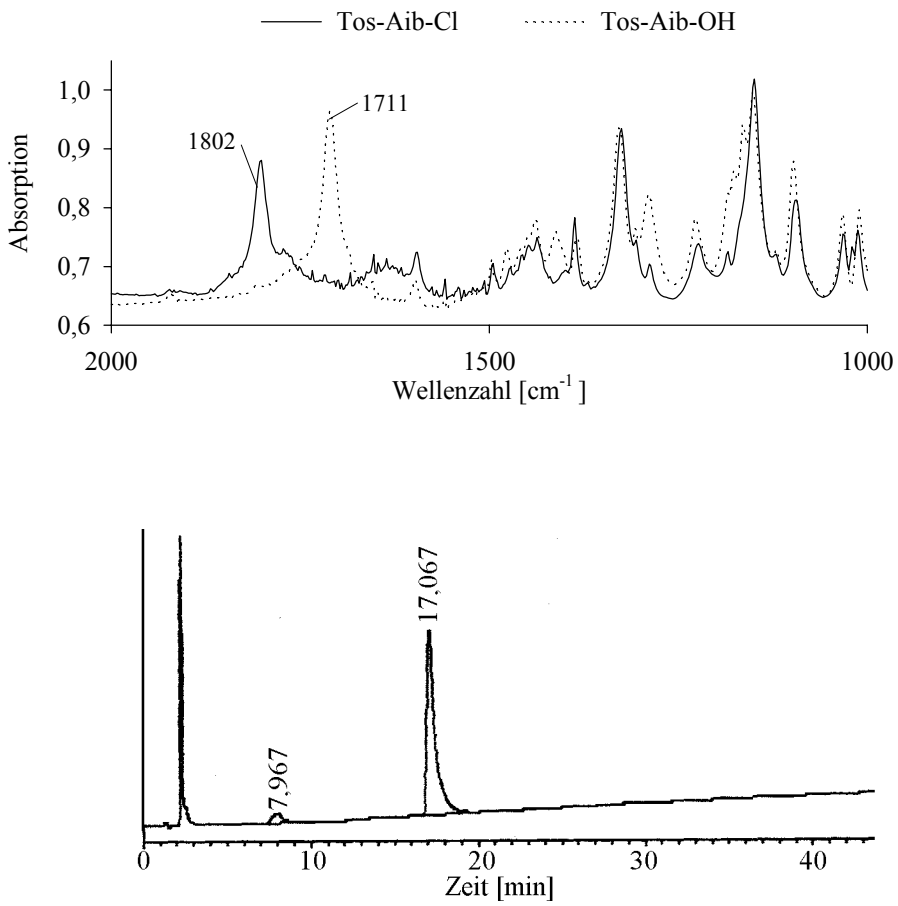


Abb. 16: Arensulfonyl-geschützte Aminosäurechloride am Beispiel von Tos-Aib-Cl **a)** IR-Spektrum; **b)** HPLC-Profil

2.3 Kupplungen mit Arensulfonyl-geschützten Aminosäurehalogeniden

2.3.1 Tosylaminosäurehalogenide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kupplungen sterisch anspruchsvoller Aminosäuren untersucht. Dazu zählen vor allem die Kupplungen von α, α-Dialkylaminosäuren an N-methylierte α, α-Dialkylaminosäuren. Die Tosylschutzgruppe sollte einen nebenreaktionsfreien Vergleich von Aminosäurefluorid und -chlorid gestatten. Die Kupplung von Tos-Aib-F/Cl an Aib-OMe und MeAib-OMe wurde dazu als Modellkupplung untersucht. Die Umsetzungen mit Aib-OMe wurden in DCM und die Reaktion mit MeAib-OMe in Toluen durchgeführt. Im letzteren Fall kam es bei der Freisetzung des MeAib-Methylesters mit DIEA in DCM zu einer teilweisen Hydrolyse des Esters. Ein Wechsel zu Toluen führte zu einer Unterdrückung der Nebenreaktion, wobei durch einen einfachen Filtrationsschritt Hydrolyseprodukte entfernt werden konnten. Die durch RAJESWARI [52] eingeführte und durch WENSCHUH et al. [90] für die Kupplung sterisch gehinderter Aminosäurefluoride beschriebene Umsatzverbesserung durch Silylierung der Aminokomponente mit BSA wurde für das Tosylaminosäurechlorid nicht bestätigt. Die Kupplungsausbeuten der Tosylaminosäurechloride mit DIEA bzw. BSA als Fänger des entstehenden Hydrochlorides waren vergleichbar. Die Maskierung der

basischen Aminofunktion ist demnach für Tosylaminosäuren überflüssig, da die Oxazolonbildung durch die Struktur der Schutzgruppe ausgeschlossen ist. Diese Ergebnisse legen nahe, daß die früher erwähnte Bildung von Silylfluorid als Ursache für die Umsatzverbesserung im Falle der Fmoc-Aminosäurefluoride eher unwahrscheinlich ist.

Für die Kupplung von Tos-Aib-X (X=Cl, F) an Aib-OMe wurden sowohl für das Aminosäurefluorid als auch für das Aminosäurechlorid gute Ausbeuten erhalten. Aus Abb. 17 ist ersichtlich, daß das Aminosäurechlorid wesentlich schneller reagiert. Dies wird beim Übergang zum N-methylierten, sterisch stärker gehinderten MeAib-OMe noch deutlicher.

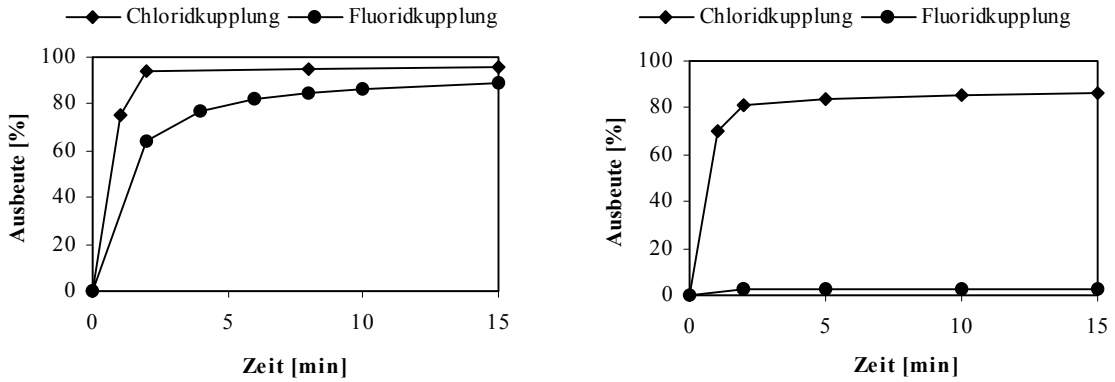


Abb. 17: Kupplungseffizienz von Tos-Aib-X an **a**) Aib-OMe (DCM) und **b**) MeAib-OMe (Toluen); unter Verwendung von DIEA

In vergleichbarer Zeit zeigt das Aminosäurefluorid kaum nennenswerte Reaktion, währenddessen durch Säurechloridaktivierung das Modellpeptid Tos-Aib-MeAib-OMe (Abb. 18) mit einer Ausbeute von über 80% erhalten werden konnte. Bisher gelang die Synthese dieses Dipeptides bei Reaktionszeiten von 2 Wochen nur mit Ausbeuten von ca. 3% [57].

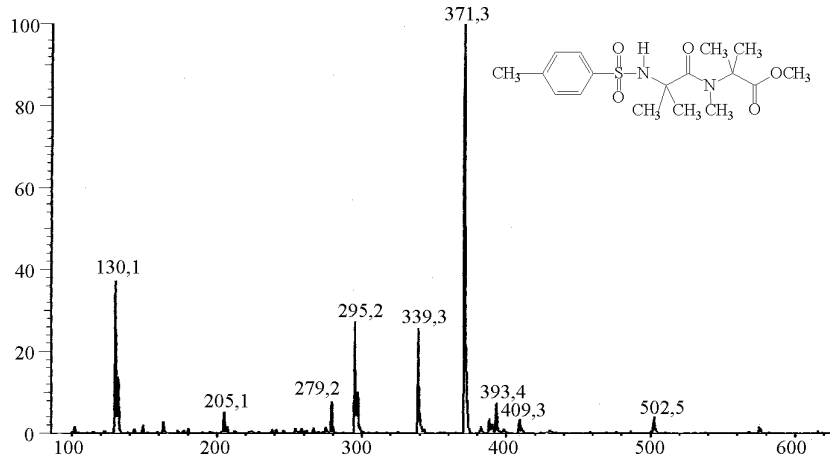


Abb. 18: Massenspektrum des Rohpeptides Tos-Aib-MeAib-OMe

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß mit der Tosylschutzgruppe im Gegensatz zu den Fmoc-Derivaten die höhere Reaktivität des Aminosäurechlorides im Vergleich zum entsprechenden Aminosäurefluorid voll zur Wirkung kommt.

2.3.2 Pbf-Aminosäurehalogenide

Ein Vergleich der Pbf- mit der Tosylschutzgruppe ergab keine Unterschiede in den Ausbeuten für die Kupplung von Pbf-Aib-X (X = Cl, F) an Aib-OMe×HCl (Abb. 19a). Die Reaktionen mit Aib-OMe×HCl wurden in DCM durchgeführt, als HCl-Fänger wurde DIEA verwendet.

Die Umsetzungen von Pbf-Aib-X mit MeAib-OMe×HCl wurden wie schon für Tos-Aib-Cl beschrieben in Toluen durchgeführt. Das Hydrochlorid wurde mit DIEA freigesetzt (siehe 5.4.1). Für die Kupplung wurde einerseits mit einem Überschuß an Aminokomponente gearbeitet, so daß ein Basenzusatz für das Abfangen der entstehenden HCl entfiel. Andererseits wurden auch DIEA und BSA als HCl-Fänger getestet. Der Einsatz dieser HCl-Fänger führte aber zu keiner Umsatzerhöhung.

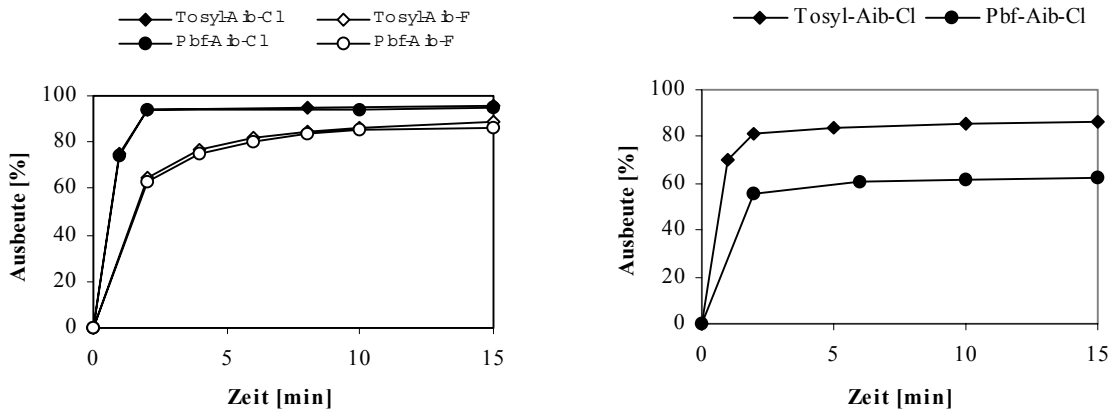


Abb. 19: Kupplungseffizienz von RSO_2-Aib-X an **a**) Aib-OMe (DCM) und **b**) MeAib-OMe (Toluen); als Base wurde DIEA verwendet

Die Reaktion des Aminosäurefluorides mit MeAib-OMe führte, wie auch schon im Fall der Tosyl-geschützten Verbindung, zu Ausbeuten < 2%. Damit wird die Grenze der Anwendbarkeit der Aminosäurefluoride bei sterischer Hinderung der Kupplungskomponenten nochmals belegt.

Kupplungen von Pbf-MeAib-Cl an Aib-OMe×HCl wurden im Vergleich zu den Fmoc-geschützten Aminosäurefluoriden untersucht. Während mit Fmoc-MeAib-F und BSA in DCM nach 2 Stunden nur 35% des gewünschten Dipeptides gebildet wurden [91], [92], reagierte das Pbf-MeAib-Cl wesentlich schneller (Abb. 20). In DCM erhielten wir nach 15 Minuten das gewünschte Produkt mit einer Ausbeute von 95%.

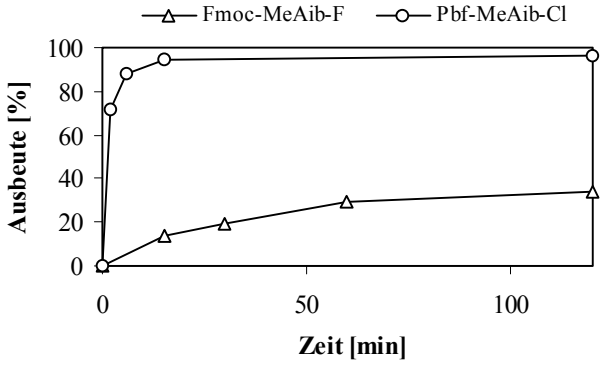


Abb. 20: Vergleich der Kupplungsausbeuten für das Dipeptid Fmoc/Pbf-MeAib-Aib-OMe in DCM mit BSA (Fmoc) bzw. DIEA (Pbf) als HCl-Fänger

Durch die Kombination von Pbf-Schutzgruppe und Säurechloridaktivierung konnte ein Durchbruch bei der Kupplung sterisch stark gehinderter Aminosäuren erzielt werden. Erstmalig konnte durch Säurechloridaktivierung der Pbf-geschützten Aminosäure auch Pbf-MeAib an MeAib-OMe gekuppelt werden. Abb. 21 stellt ein Modell des Raumbedarfes dar, welche die 4 zusätzlichen Methylgruppen im MeAib-Dipeptid im Vergleich zum Alanylalanin verursachen.

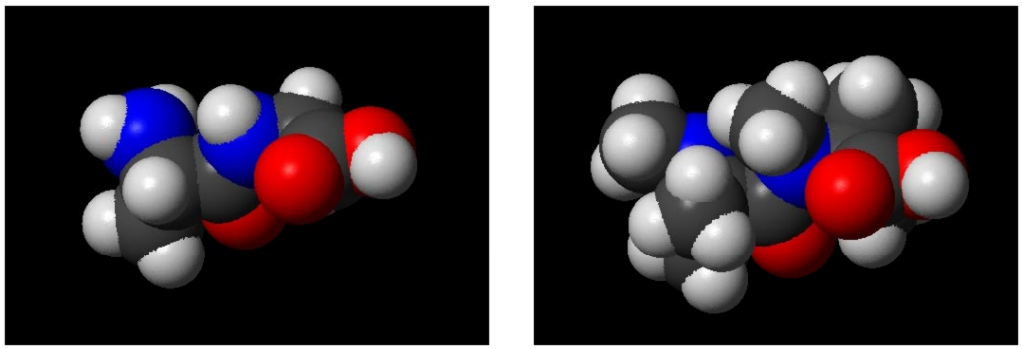


Abb. 21: Vergleich des Raumbedarfes von Ala-Ala-OH und MeAib-MeAib-OH

Die Bildung des Dipeptides erfolgte unter moderaten Bedingungen in relativ kurzer Zeit (2,5h). Durch HPLC-Analyse konnte eine Ausbeute von 62% nachgewiesen werden. Um Nebenreaktionen zu vermeiden, wurde, wie schon bei der Reaktion von Pbf-Aib-Cl mit MeAib-OMe, mit einem Überschuß an Aminokomponente gekuppelt, so daß keine zusätzliche Base zum Abfangen der während der Reaktion freiwerdenden HCl benötigt wurde.

Das Dipeptid Pbf-MeAib-MeAib-OMe konnte nach HPLC-Reinigung in 52%iger Ausbeute erhalten werden. Die Struktur wurde mittels ^{1}H-NMR, MS und CHN-Analyse bestätigt (Abb. 22).

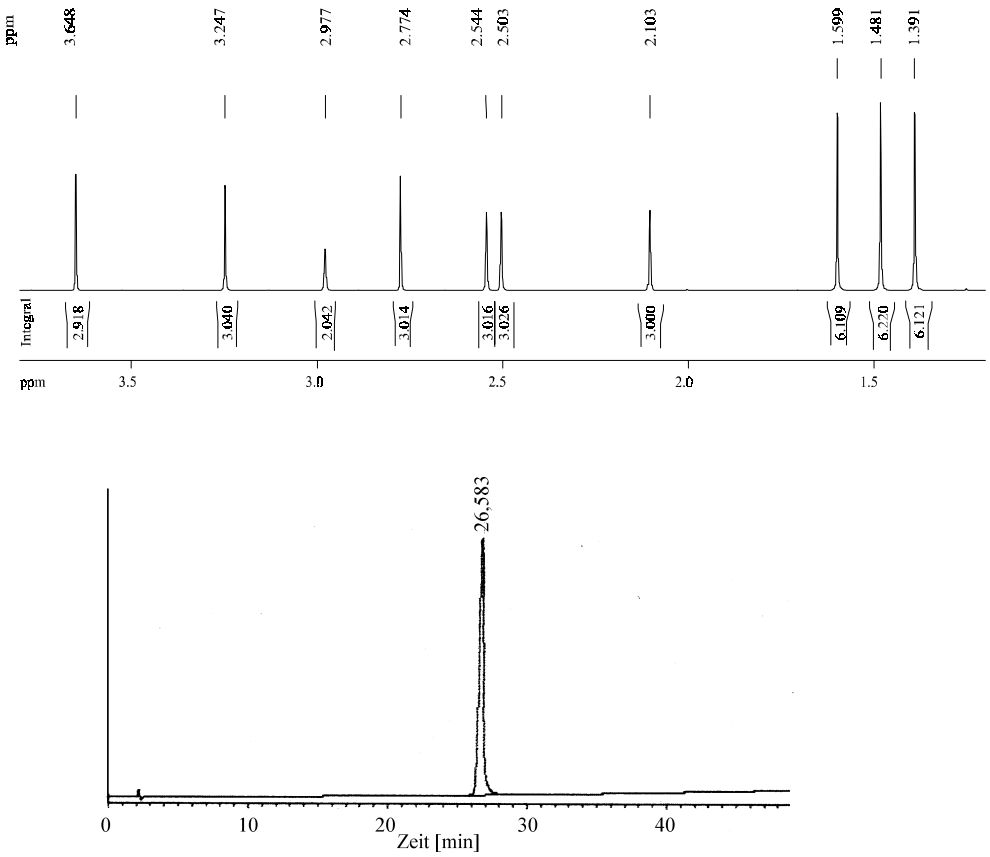


Abb. 22: Pbf-MeAib-MeAib-OMe **a)** ^{1}H-NMR-Spektrum **b)** HPLC-Profil des gereinigten Peptides

2.3.3 NBS-Aminosäurehalogenide

Wie schon für Pbf-MeAib-Cl gezeigt, gelingt auch mit NBS-geschützten Aminosäurechloriden eine Acylierung von MeAib-OMe (Abb. 23).

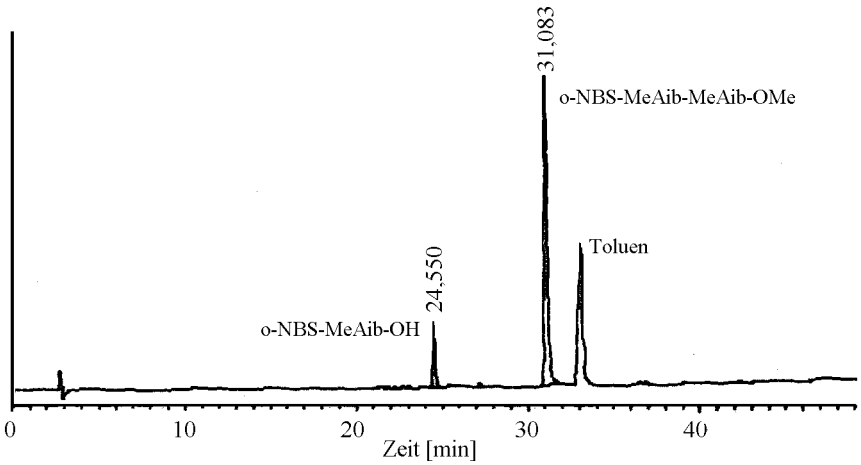


Abb. 23: Kupplungslösung o-NBS-MeAib-Cl + MeAib-OMe nach 2h

Überraschenderweise verlief die Umsetzung unter Verwendung von NBS-Schutz schneller als mit Pbf-Schutz (Abb. 25).

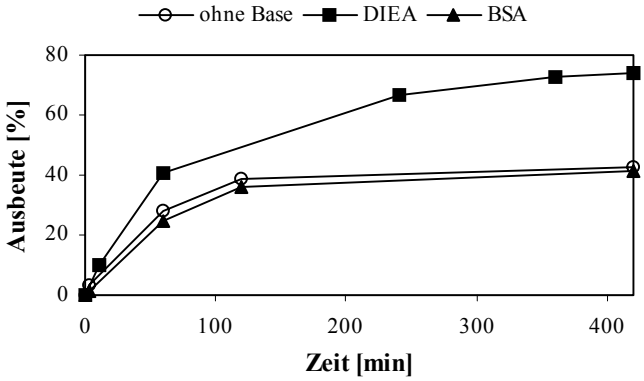


Abb. 24: Kupplung von o-NBS-MeAib-Cl an MeAib-OMe in Abhängigkeit vom jeweiligen HCl-Fänger in DCM/Toluen

Die Versuche mit o-NBS-Aminosäurechloriden wurden in Toluen durchgeführt. Dabei wurden die besten Kupplungsausbeuten mit DIEA als Base erhalten (Abb. 24). Da die NBS-Aminosäurechloride schlecht in Toluen löslich sind, wurden die Reaktionen in einem Gemisch von DCM/Toluen durchgeführt. Dies führte zu einer Steigerung der Umsätze.

Erwartungsgemäß zeigte ein Vergleich der Schutzgruppen, daß die Reaktivitäten des o-NBS-Aminosäurechlorides und des p-NBS-Aminosäurechlorides ähnlich sind. Die Acylierungsreaktion mit Pbf-Aminosäurechlorid verlief im gleichen Zeitraum langsamer. (siehe Abb. 25).

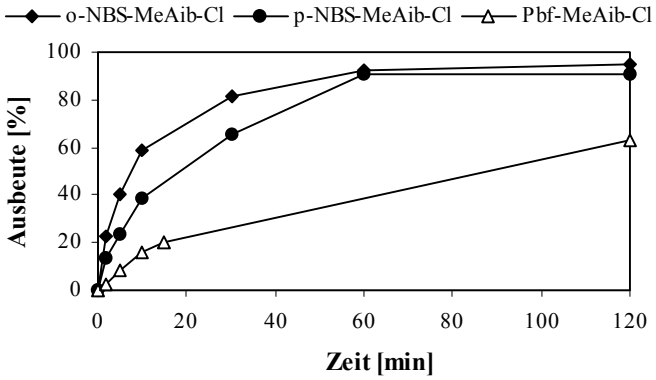


Abb. 25: Einfluß der N^{α}-Schutzgruppe auf die Reaktion von RSO_2-MeAib-Cl mit MeAib-OMe; die Reaktionen wurden in Toluen bzw. Toluen/DCM mit DIEA durchgeführt

2.3.4 DNBS-Aminosäurehalogenide

Anhand der Kupplung von DNBS-Val-Cl an Val-OEt×HCl wurden unterschiedliche Bedingungen für die Reaktion der DNBS-Aminosäurechloride getestet. Die Umsetzungen wurden in Toluen, DMF und DCM durchgeführt. Als Fänger der entstehenden HCl wurden BSA bzw. DIEA verwendet.

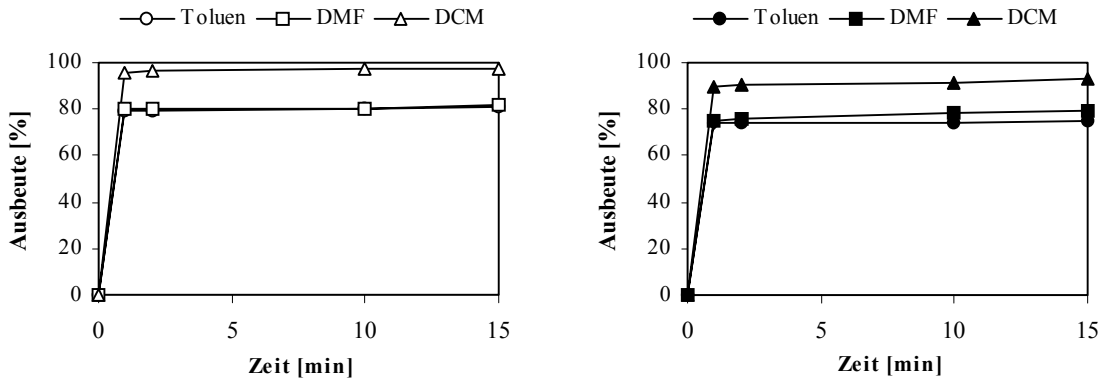


Abb. 26: Kupplungsausbeuten für das Dipeptid DNBS-Val-Val-OR **a)** mit BSA und **b)** mit DIEA

Wie aus Abb. 26 ersichtlich ist, lieferten die Kupplungen Ausbeuten von über 75%, wobei die Reaktionen schon nach 1 Minute abgeschlossen waren. DCM erwies sich als Lösungsmittel der Wahl.

Die Kupplung von DNBS-Aib-Cl an MeAib-OMe×HCl wurde in getrocknetem Toluen durchgeführt (siehe Kap. 2.3.1.). Es wurde eine teilweise Zersetzung des Aminosäurechlorides beobachtet (siehe auch Kap. 2.3.5.). In Abb. 27 sind die für die verschiedenen Schutzgruppen erhaltenen Umsätze der Acylierung von RSO_2-Aib-Cl mit MeAib-OMe dargestellt.

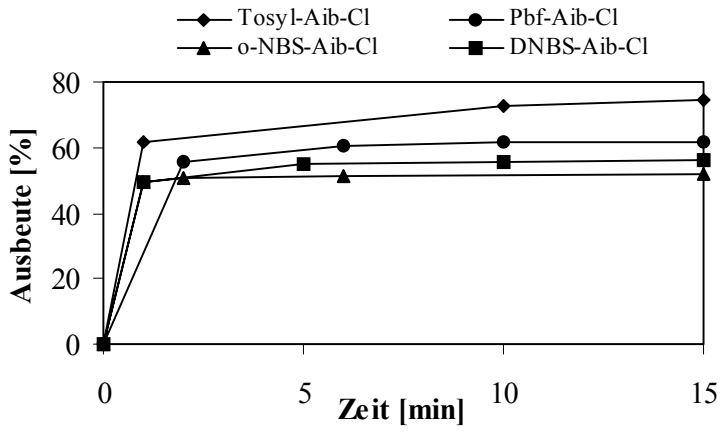


Abb. 27: Vergleich der Umsätze für die Synthese von RSO_2-Aib-MeAib-OMe mit DIEA (Tos) bzw. mit BSA (Pbf, o-NBS, DNBS) in Toluen

Durch Verwendung des später auch für die Razemisierungs- und in situ Aktivierung genutzten β-Naphthylamides (NA) als Carboxylschutz konnte die in DCM auftretende Zersetzung des Aminosäuremethylesters zur Säure (siehe Kap. 2.3.1.) umgangen werden.

Untersucht wurden neben den Acylierungen von MeAib-OMe auch die Acylierungen von Aib-Ala-NA, sowie die Kupplungen von DNBS-MeAib-Cl und DNBS-Aib-Cl an das Tripeptid MeAib-Aib-Ala-NA.

Die Bildung von DNBS-MeAib-Aib-Ala-NA war nach 10 Minuten beendet. Die Umsetzung verlief bei Einsatz von 1,5 Äquivalenten Aminosäurechlorid quantitativ.

Die Umsetzung von MeAib-Aib-Ala-NA mit DNBS-MeAib-Cl wurde in DCM/Toluen oder in DCM durchgeführt. Als HCl-Fänger wurden sowohl DIEA als auch BSA verwendet. Wir konnten beobachten, daß – wie bei der entsprechenden Reaktion der o-NBS-Derivate – die Umsetzungen mit BSA langsamer verlaufen als mit DIEA, was durch eine partielle Silylierung erklärbar ist.

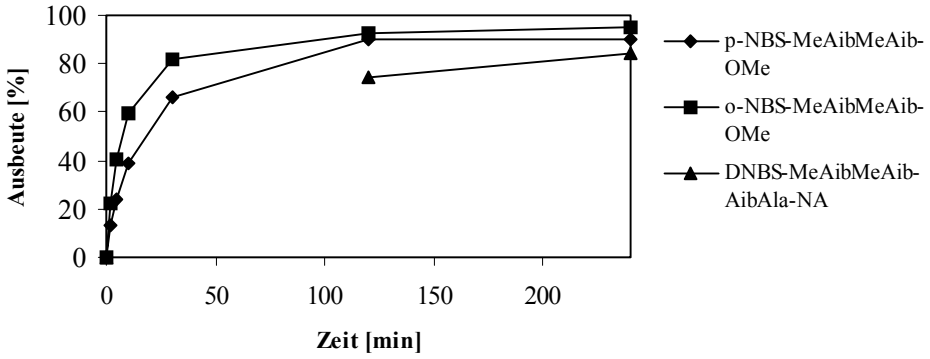


Abb. 28: Kupplungseffizienz von RSO_2-MeAib-Cl an MeAib-SG_C mit der o-/p-NBS-Gruppe und der DNBS-Gruppe

Abb. 28 zeigt einen Umsatzvergleich für die Reaktion von RSO_2-MeAib-X mit MeAib-SG_C (SG_C=Carboxylschutzgruppe) unter Verwendung verschiedener NBS-Schutzgruppen. Für die Kupplung mit DNBS-MeAib-Cl konnten Ausbeuten erhalten werden, die mit denen der Kupplung von NBS-MeAib-Cl an MeAib-OMe vergleichbar sind.

2.3.5 Nebenreaktionen bei Synthesen mit Arensulfonyl-geschützten Aminosäurechloriden

Bei Verwendung von Arensufonyl-geschützten Aminosäurechloriden wurden 2 Nebenreaktionen beobachtet, die einen Einfluß auf die Synthesen von Peptiden, die sterisch gehinderte Aminosäuren enthalten, haben.

Obwohl gezeigt wurde, daß die Reaktivität NBS-geschützter Aminosäurechloride größer ist als die der Pbf- bzw. Tosyl-geschützten Aminosäurechloride (siehe 2.3.3.), nahmen die Umsätze für die Kupplung von RSO_2-Aib-Cl an MeAib-OMe×HCl von der Tosyl- über die Pbf- zu den NBS-Schutzgruppen ab. Verlief die Reaktion des Tosyl-Aib-Cl noch zu 80%, konnte mit DNBS-Aib-Cl nur noch eine Ausbeute von 62% erhalten werden (siehe auch Abb. 27). Ursache für die geringeren Ausbeuten kann die erhöhte Instabilität durch Wechsel des Substituenteneffektes der verschiedenen Reste am Benzylring des entsprechenden Aminosäurechlorides gegenüber Basen sein. Wir haben beobachtet, daß Arensulfonyl-geschütztes Aib-Cl generell empfindlicher gegen alkalische Fragmentierung als andere Aminosäuren wie z.B. proteinogene Aminosäuren ist. Zugabe von einem Äquivalent DIEA zu RSO_2-Aib-Cl führte innerhalb von Sekunden zum Zerfall des

Aminosäurechlorides. Mit BSA bzw. Collidin verlief die Zersetzung des Aminosäurechlorides wesentlich langsamer bzw. es erfolgte eine Hydrolyse des Chlorides. Deshalb findet man in der Reaktionslösung neben dem Benzensulfonamid auch RSO_2-Aib-OH, da bei längeren Reaktionszeiten auch die Hydrolyse eine Rolle spielt.

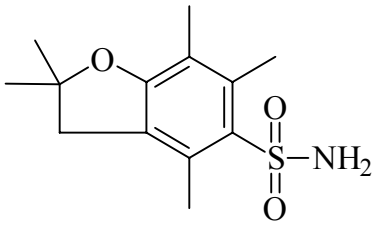


Abb. 29: Pbf-Amid

Durch HPLC-, NMR- und IR-Charakterisierung des gebildeten Produktes konnten wir zeigen, daß es sich bei dem Zerfallsprodukt um ein Benzensulfonamid handelt (Abb. 29).

Zu Vergleichszwecken wurde das o-NBS-Amid durch Umsetzung von o-NBS-Cl mit Ammoniak hergestellt. In Abb. 30sind die IR-Spektren von synthetisch hergestellten und aus der Reaktionslösung gewonnenem Amid dargestellt, die in den charakteristischen Banden identisch sind.

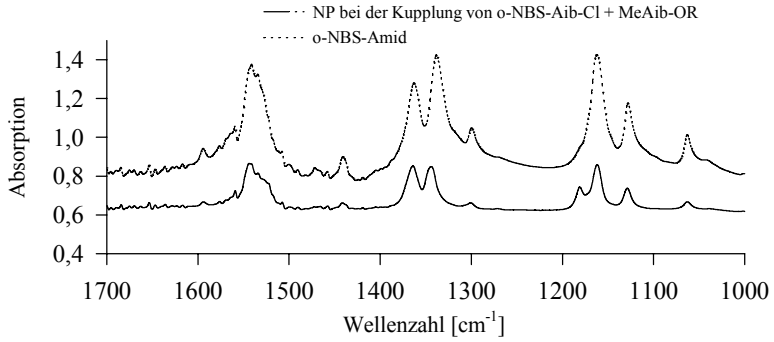


Abb. 30: IR-Spektrum des bei der Reaktion gebildeten Nebenproduktes (NP) im Vergleich zu o-NBS-Amid

HPLC-Untersuchungen von o-NBS-Aib-Cl zeigten, daß es schon bei der Herstellung des Aminosäurechlorides zur Bildung von geringen Mengen des Amides kommt, welches aber durch Umkristallisation entfernt werden kann. Durch die beschriebene Fragmentierung wird die Ausbeute der Acylierungen von RSO_2-Aib-Cl mit sterisch stark gehinderten Systemen limitiert. Es werden aber gute Kupplungsausbeuten erzielt, wenn die

Acylierungsreaktion schneller verläuft als die Fragmentierung. Eine weitere Nebenreaktion wurde während der Acylierung vom MeAib-SG_C mit RSO_2-MeAib-Cl beobachtet. Hier kam es zur Bildung eines Nebenproduktes, dessen Retentionszeit größer war als die des Dipeptides. Das isolierte Produkt zeigte im IR-Spektrum die für Säureanhydride typischen Banden bei 1830 und 1750 cm^{-1} (Abb. 31). ESI-MS-Untersuchungen der isolierten Fraktion bestätigten die Vermutung, daß es sich bei dem Nebenprodukt um das symmetrische Anhydrid $(RSO_2\text{-MeAib})_2O$ handelt. Dieses Anhydrid ist offensichtlich nicht mehr zur Acylierung von MeAib-OMe in der Lage, da die Verlängerung der Reaktionszeit nicht zur Erhöhung der Ausbeute an Dipeptid führte. Erstaunlich ist die Stabilität des Anhydrides im wäßrig-organischen Lösungsmittelsystem der HPLC, was auf eine starke Abschirmung des Anhydrides selbst gegen Wasser deutet.

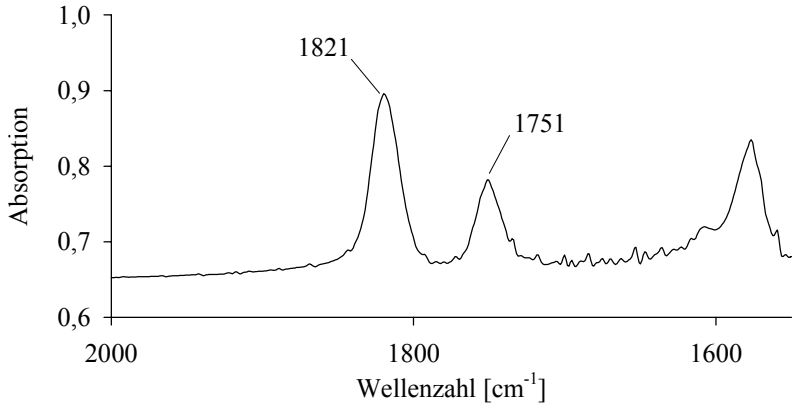


Abb. 31: IR-Spektrum des bei der Synthese von Pbf-MeAib-MeAib-OMe isolierten symmetr. Anhydrides

Ein Vergleich mit synthetisch hergestelltem symmetrischem RSO_2-MeAib-Anhydrid ergab identische Retentionszeiten. Durch die Anhydridbildung im Verlauf der Reaktion kommt es zu Ausbeuteverlusten, da Aminosäurechlorid für die gewünschte Acylierung verloren geht. Durch Erhöhung des Säurechloridüberschusses sollte es möglich sein, bessere Ausbeuten zu erhalten.

2.4 Abspaltung der Arensulfonylschutzgruppen

Die Deblockierung der untersuchten Arensulfonylschutzgruppen erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Substituenten am Aromaten mit verschiedenen Abspaltreagenzien. Während die Pbf-Schutzgruppe acidolytisch entfernt wird, lassen sich die NBS-Schutzgruppen mittels Thiolaten abspalten. Dabei ist die DNBS-Schutzgruppe leichter spaltbar als die monosubstituierten Nitrobenzensulfonylschutzgruppen.

2.4.1 Abspaltung der Pbf-Schutzgruppe

Die gute Abspaltbarkeit der Pbf-Gruppe von der Guanidinofunktion des Arginins mit TFA wurde in der Literatur beschrieben [93]. Überraschenderweise läßt sich die Pbf-Schutzgruppe unter diesen Bedingungen nicht von der N^{α}-Position der Aminosäure abspalten [97].

Erste Versuche der Schutzgruppenabspaltung führten wir mit einer Lösung von Trimethylsilyl-trifluormethansulfonat (TMSO) in Trifluoressigsäure (TFA) durch. Für unsere Untersuchungen nutzten wir das Dipeptid Pbf-MeAib-MeAib-OMe. Durch Monitoring mittels HPLC konnten wir feststellen, daß die Schutzgruppe abgespalten wurde. MS-Untersuchungen zeigten jedoch, daß im entstandenen Produkt auch MeAib-OH enthalten war. Um auszuschließen, daß das Ergebnis durch Zerfall des Dipeptides während der Aufnahme des Massenspektrums bedingt ist, wurde der durch Etherfällung erhaltene Niederschlag mit Fmoc-Chlorid umgesetzt und die dabei gewonnenen Produkte mittels HPLC analysiert. Durch diese Untersuchung konnte gezeigt werden, daß es schon während der Abspaltung der Schutzgruppe zu einer Spaltung der Dipeptidbindung kommt. Ein Zerfall während der MS-Untersuchungen kann also ausgeschlossen werden. Die Verwendung von Trifluormethansulfonsäure (TFMSA) in TFA erbrachte ähnliche Ergebnisse wie die von TMSO. Die Schutzgruppe konnte zwar entfernt werden, während der Abspaltung kam es aber ebenfalls zu einer Spaltung der Peptidbindung. Als vorteilhaft erwies sich die Verwendung von TFA/Dimethylsulfid (DMS) als Abspaltungsreagenz. Es konnte der freie Dipeptidester MeAib-MeAib-OMe mit einer Ausbeute von 87% erhalten werden. Die Abspaltdauer betrug eine Stunde. Der erhaltene Ester wurde durch IR- und MS-Untersuchungen charakterisiert (Abb. 32).

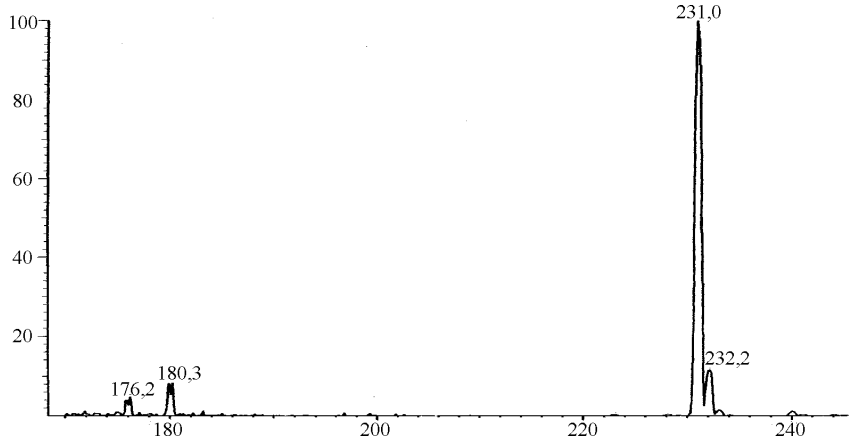


Abb. 32: Massenspektrum des Dipeptides MeAib-MeAib-OMe

Erstaunlicherweise konnte der Aib-enthaltende Dipeptidester Pbf-Aib-MeAib-OMe mit identischen Abspaltbedingungen nicht freigesetzt werden. Die offensichtlich säurelabilere Aib-MeAib-Bindung wurde schon durch reine TFA ohne weitere Zusätze gespalten.

In diesem Zusammenhang soll auf die durch Untersuchung verschiedener Gruppen [94], [95], [96], [97] gefundenen Ergebnisse hingewiesen werden, die bei Synthesen von Peptaibolen wie Alamethicin und Emerimicin nachwiesen, daß Aib-Pro-Bindungen säurelabil sind. So beobachteten JUNG et al., daß die Aib-Pro-Bindung im Alamethicin und Trichotoxin A 40 mit TFA in nur 3 Stunden gespalten wird. Vergleichende

Untersuchungen am Modellpeptid Ac-Aib-Pro-NH_2 zeigten, daß hier eine Spaltung der Aib-Pro-Bindung schon nach 15 Minuten abgeschlossen ist [94]. Warum Aib-MeAib-Bindungen instabiler als MeAib-MeAib-Bindungen sind, ist nach dem heutigen Erkentnisstand schwer erklärbar.

Die von uns beobachtete Spaltung des Dipeptides erfolgt möglicherweise über die Ausbildung eines Misch-Anhydrides mit TFA (Abb. 33). Während der HPLC-Untersuchungen der Schutzgruppenabspaltung konnten wir ein Zwischenprodukt detektieren, das bei längerer Lagerung unter HPLC-Bedingungen zur Pbf-Aminosäure umgewandelt wird.

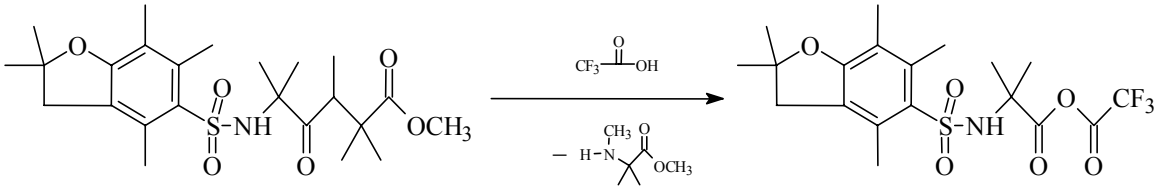
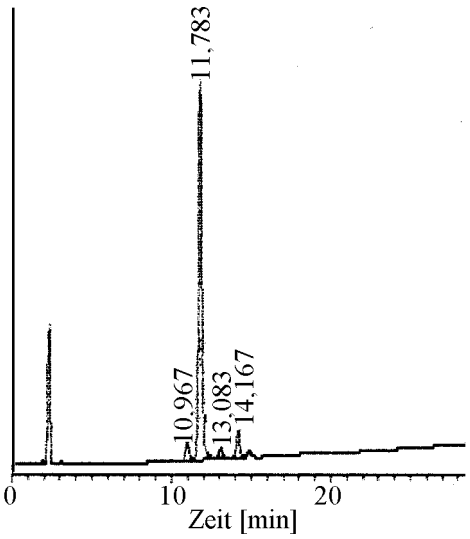


Abb. 33: Spaltung von Pbf-Aib-MeAib-OMe durch TFA

Diese Hypothese wird dadurch erhärtet, daß beim Versetzen von Pbf-Aib-Cl mit TFA ein Produkt entsteht, welches einen Peak mit einer Retentionszeit lieferte, die mit der des Zwischenproduktes identisch war.

ohne Inkubation



Probe 24h in AN/H_2O

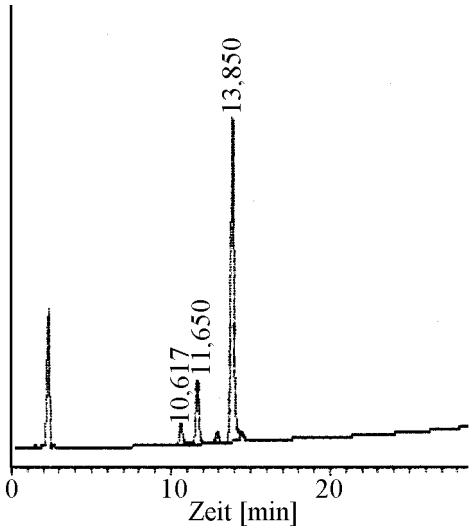


Abb. 34: HPLC-Profile **a)** TFA + Pbf-Aib-MeAib-OMe sofort vermessen; R_T (Pbf-Aib-O-TFA): 11,7min **b)** TFA + Pbf-Aib-MeAib-OMe, 24h in AN/H_2O gelagert; R_T (Pbf-Aib): 13,8min

Die Behandlung des Dipeptides mit TFA führte zu einem Produkt, das chromatographisch mit Pbf-Aib-OH identisch ist (Abb. 34). Die ausbleibende analoge Spaltung für MeAib-MeAib-OMe könnte durch die starke sterische Hinderung für eine Anhydridbildung erklärt werden.

Versuche, der Zersetzung des Dipeptides durch Verwendung von verdünnter TFA entgegenzuwirken, zeigten keinen Erfolg. Auch hier entstand wieder das gemischte Anhydrid, welches in wäßrigem Milieu zur Säure weiter reagierte.

Die hohe Säurelabilität der Aib-MeAib-Peptidbindung machte die Verwendung von Schutzgruppen notwendig, die entweder säurelabiler sind bzw. sich auf anderem Wege abspalten lassen.

2.4.2 Abspaltung der NBS-Schutzgruppe

MILLER et al. haben kürzlich beschrieben, daß sich die o-NBS-Schutzgruppe von Aminogruppen leichter abspalten läßt als die p-NBS-Schutzgruppe [89]. Vermutlich spielen dabei sterische Effekte eine Rolle.

Die Abspaltung der o-NBS-Schutzgruppe vom o-NBS-MeAib-MeAib-Dipeptid gelang bereits innerhalb von 10 Minuten. Als Nucleophil verwendeten wir eine in der Literatur beschriebene Lösung von β-Mercaptoethanol (ME) und DBU in DMF [98]. Bei Synthesen in Lösung erwies sich die Aufarbeitung der Reaktionslösung als umständlich, da sich das verwendete ME nur unvollständig abtrennen ließ und das MeAib-Dipeptid durch die sekundäre Aminogruppe schwer detektierbar ist.

Mit der von MILLER beschriebenen Methode war die o-NBS-Schutzgruppe von nicht alkylierten Aminosäuren jedoch nicht abspaltbar. Auch nach 7h Reaktionszeit konnten wir chromatographisch noch NBS-geschütztes Aib-MeAib-Dipeptid nachweisen. Versuche, das entstandene Produkt massenspektrometrisch ohne Isolierung aus der Reaktionslösung nachzuweisen, scheiterten am schwer abzutrennenden DBU, welches alle Signale überdeckte.

FUKUYAMA verwendete für die NBS-Schutzgruppenabspaltung von N-Alkylaminosäuren Thiophenol/K_2CO_3 [87]. Wir testeten dieses Reagenz am Beispiel von o-NBS-Val-OH. Innerhalb von 30 Minuten erfolgte eine vollständige Deblockierung. Da die verwendete Abspaltlösung sehr oxydationsempfindlich und damit ihre Anwendung zeitlich begrenzt ist, muß mit hohen Überschüssen an Thiolat gearbeitet werden.

2.4.3 Abspaltung der DNBS-Schutzgruppe

Verwendung von Thiophenol/K_2CO_3

Die in der Literatur beschriebene Abspaltung der o-NBS-Gruppe von primären Aminosäuren mit 5% Thiophenol (TP) in DMF wurde von uns für die DNBS-Gruppe getestet [87], [89]. Das für die Abspaltung der Schutzgruppe notwendige Thiophenolat wurde mit K_2CO_3 gebildet. Durch HPLC-Untersuchungen konnten wir zeigen, daß schon nach 10 Minuten kein geschütztes Dipeptid mehr vorhanden ist.

Verwendung von Mercaptoethanol/Base

Die bereits beschriebene Abspaltmethode für die o-NBS-Schutzgruppe mit ME:DBU (2:1) war auf die DNBS-Schutzguppe nicht anwendbar [98]. Unsere Versuche, auf diese Weise die DNBS-Gruppe vom DNBS-Valin abzuspalten, waren unbefriedigend. Nach 10 Minuten waren erst 10% der Schutzgruppe abgespalten. Eine Erhöhung der DBU-Menge verringerte die Ausbeute; nach 10 Minuten waren erst 2% der Schutzgruppe abgespalten. Der Übergang zum weniger basischen Triethylamin (TEA) erhöhte die

Reaktionsgeschwindigkeit der Abspaltung erheblich. Für die Abspaltung wurden 2 Äquivalente TEA (bezogen auf ME) verwendet. Nach 10 Minuten konnte kein Ausgangsstoff mehr bestimmt werden (HPLC). Die Abspaltung mit ME/TEA konnte erfolgreich auf DCM als Lösungsmittel übertragen werden, wodurch das aufwendige Entfernen von DMF vor der Aufarbeitung vermieden werden konnte. Weitere Untersuchungen zeigten, daß es in DMF –im Gegensatz zu DCM– zu Nebenreaktionen während der Abspaltung kommt (siehe Nebenreaktionen Kap. 2.6.4.).

Durch die Verwendung von ME/TEA (2:1) konnten erstmals Peptide erhalten werden, die Aib-MeAib- bzw. MeAib-Aib-Sequenzen enthalten. Dafür wurde das N^{α}-DNBS-geschützte Peptid bei Raumtemperatur mit der Abspaltlösung (10facher Überschuß an Mercaptoethanolat) versetzt und 30 Minuten gerührt. Bei Versetzen des Peptides mit dem Thiolat tritt eine intensive Rotfärbung auf, die im Verlauf der Reaktion verschwindet. Dies ist durch zwischenzeitliche Bildung eines Anions (siehe Abb. 14) zu erklären, welches dann zum Thioether weiterreagiert. Vom erhaltenen, ungeschützten Peptid wurden Mercaptoethanol und der entstandene Thioether durch präparative Säulenchromatographie entfernt.

2.5 Synthesen mit in situ gebildeten Arensulfonyl-geschützten Aminosäurehalogeniden

Eine attraktive Alternative zur Verwendung preformierter Aminosäurechloride besteht in einer in situ Aktivierung der geschützten Aminosäuren mittels $SOCl_2$. Der Vorteil der in situ Säurechloridbildung besteht u. a. darin, daß die Aminosäurechloride nicht gelagert werden müssen und so auch Aminosäuren mit labilen Schutzgruppen einsetzbar sind. In der Literatur findet man verschiedene Methoden für die in situ Bildung von Aminosäurechloriden. Einerseits wird die Herstellung Fmoc-geschützter Aminosäurechloride unter Wärmezufuhr in Toluen als mehrstündiger Prozeß beschrieben [99]. Andererseits wurden Z-geschützte Aminosäurechloride schon nach wenigen Minuten unter Verwendung von Pyridin als Katalysator erhalten [100], [101]. Kürzlich wurde auch die Verwendung von Triphosgen für eine in situ Aktivierung von Fmoc-Aminosäuren beschrieben [102].

2.5.1 Modelluntersuchungen zur in situ Säurechloridbildung

Um eine Vorstellung von Reaktionszeiten sowie der Effektivität verschiedener Basenzusätze zu erhalten, untersuchten wir die in situ Aktivierung mittels $SOCl_2$ am Modell der Bildung des Essigsäurechlorides. Dazu wurde eine 0,1M Essigsäurelösung in DCM mit $SOCl_2$ und einer Base versetzt und die Bildung des Chlorides IR-spektroskopisch bei Raumtemperatur verfolgt. Als Basen verwendeten wir Collidin, DIEA oder Pyridin.

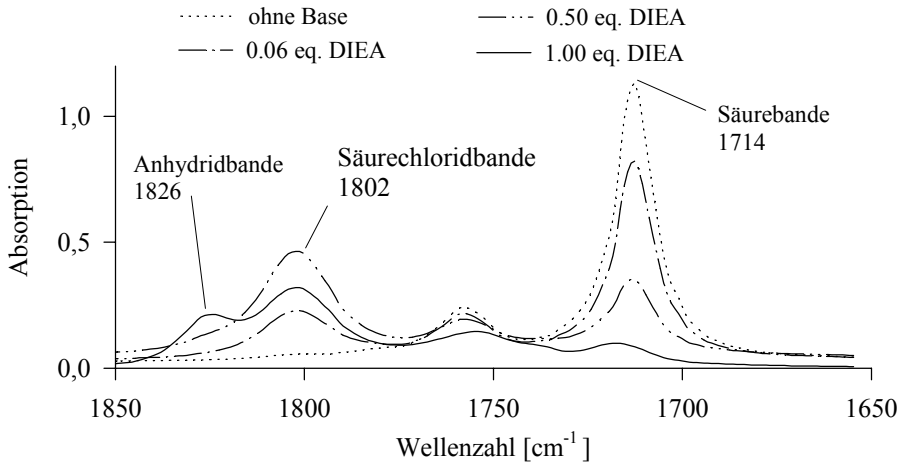


Abb. 35: In situ Herstellung von Essigsäurchlorid; 1eq. HAc+1eq. $SOCl_2$+xeq. DIEA; 0.1M in DCM

In Abb. 35 ist die Abhängigkeit der Säurechloridbildung von der Basenmenge am Beispiel von DIEA dargestellt. Die dargestellten Spektren wurden nach 10 Minuten Reaktionszeit aufgenommen. Bei Verwendung von 1eq. Base kam es in allen Fällen zur Bildung von Anhydrid. Den größten Anteil an Anhydridbildung konnten wir beim Vergleich der 3 Basen für DIEA beobachten. Dies läßt sich aufgrund der Basizität erklären, die für DIEA am größten ist. Dadurch ist bei Verwendung von DIEA die Carboxylatbildung am stärksten und die Anhydridbildung tritt als Konkurrenzreaktion auf.

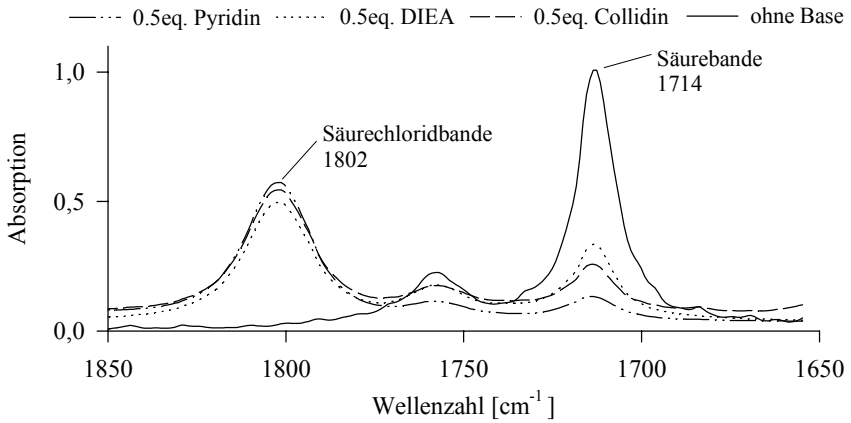


Abb. 36: In situ Herstellung von Essigsäurechlorid; 1eq. HAc + 1eq. $SOCl_2$ + 0,5eq. Base, 0,1M in DCM; t=10‘

Abb. 36 stellt die Effizienz der eingesetzten Basen dar. Alle Untersuchungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Während die Spektren der Umsetzungen mit Collidin und DIEA nach 10 Minuten noch deutliche Säurebanden zeigen, ist beim Ansatz mit Pyridin die Carbonylbande für die Carbonsäure bei 1714 cm^{-1} fast vollständig verschwunden.

2.5.2 In situ Aktivierung von DNBS-Aminosäuren

Für die Anwendung der in situ Technik auf DNBS-geschützte Aminosäuren untersuchten wir zuerst die Bildung von DNBS-Val-Cl (Abb. 37). Dazu wurden die Reaktionsbedingungen in Hinblick auf Reaktionszeit, Konzentration und Temperatur geändert.

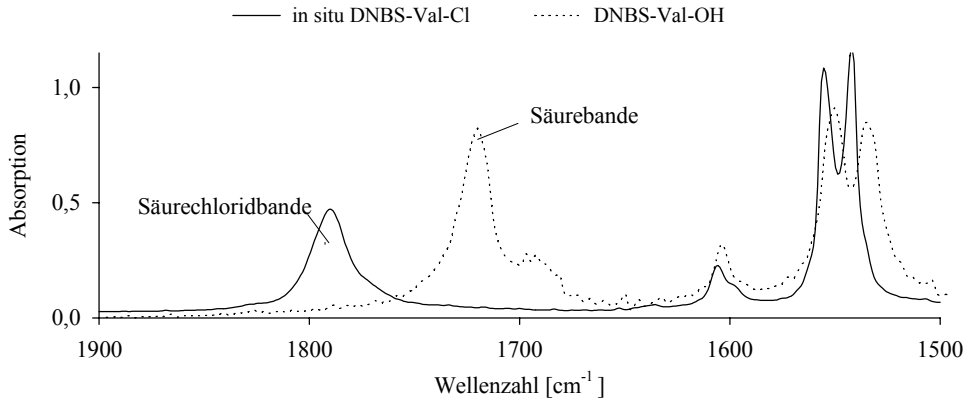


Abb. 37: In situ Aktivierung von DNBS-Val-Cl

Das entstandene Aminosäurechlorid wurde indirekt durch Überführung in den Methylester mittels HPLC nachgewiesen. Dazu wurde ein Aliquot des Reaktionsansatzes in eine 5%ige Pyridin/Methanol-Lösung überführt und dann chromatographisch untersucht.

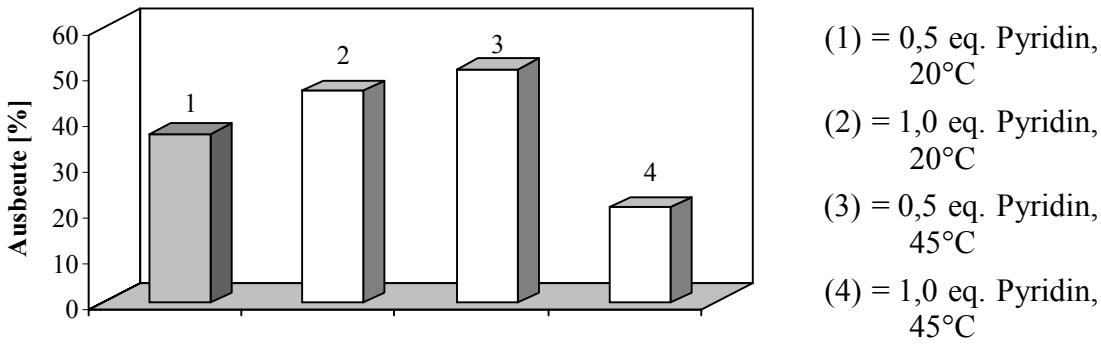


Abb. 38: Säurechloridbildung mit 1eq. $SOCl_2$, 30min

Erwartungsgemäß steigt die Ausbeute an Aminosäurechlorid durch Erhöhung der Temperatur (Abb. 38).

Die besten Ausbeuten an DNBS-Val-Cl wurden unter Verwendung von zwei Äquivalenten $SOCl_2$ und einem Äquivalent Pyridin in DCM als Lösungsmittel erhalten. Die Konzentration der Lösung betrug 0.8M. Die Aminosäurechloridausbeuten betrugen nach 30 Minuten Rühren bei 45°C max. 90-95%. Versuche mit einem 1:1 Gemisch von DCM/DMF führten zu keiner Verbesserung der Ausbeute an Chlorid (Abb. 39).

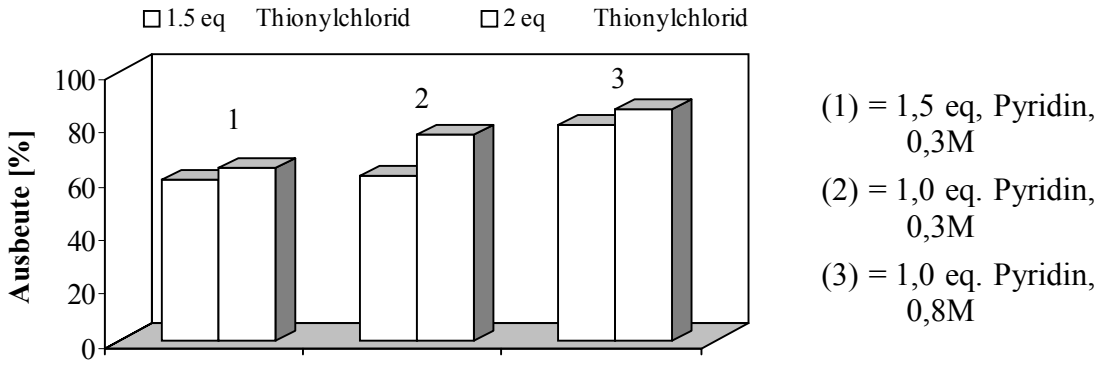


Abb. 39: Ausbeuten der Säurechloridbildung mit Xeq. $SOCl_2$, 10min, 45°C

2.5.3 Kupplung von in situ gebildetem DNBS-Val-Cl

Nachdem die Bedingungen für die in situ Aminosäurechloridbildung optimiert wurden, konnte die Anwendbarkeit der in situ Technik am schon für preformierte DNBS-Aminosäurechloride genutzten Modell der Kupplung von DNBS-Val an Val-OBzl/Val-OEt untersucht werden. Dabei zeigte sich, daß trotz identischer Reaktionsbedingungen die Ausbeuten der Umsetzung nur noch bei ca. 10% lagen.

Der eingesetzte Überschuß an $SOCl_2$ führt zur Freisetzung von HCl in der Reaktionslösung, welche ihrerseits zu Protonierung der Aminokomponente führt. Es ist deswegen notwendig, sowohl die entstandene HCl als auch das noch vorhandene $SOCl_2$ abzufangen, ohne dabei das entstandene Aminosäurechlorid zu beeinträchtigen. Wir setzten deshalb t-Butanol als $SOCl_2$-Fänger ein. Mittels IR-Untersuchungen konnten wir zeigen, daß das Thionylchlorid mit 3eq. t-Butanol abgefangen werden kann, ohne das es zu einem nennenswerten Abfall der Säurechloridbande kommt. Abb. 40 zeigt eine Verschiebung der Chloridbande des Thionylchlorides zu höheren Wellenzahlen. Es wurden deshalb vor Kupplungsbeginn 3eq. t-Butanol zum in situ gebildeten Säurechlorid gegeben.

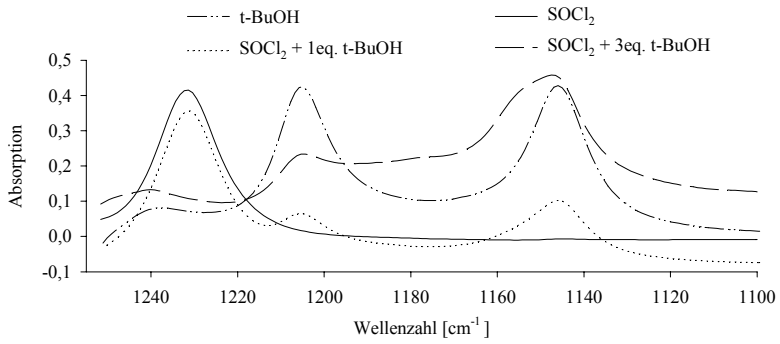


Abb. 40: : IR-spektroskopische Untersuchung der Reaktion von $SOCl_2$ mit t-BuOH

Für eine vollständige Umsetzung von DNBS-Val mit $SOCl_2$ waren 2 Äquivalente Base notwendig. Dabei konnten mit DIEA die besten Ergebnisse erzielt werden. In Abb. 41 sind die Reaktionsbedingungen noch einmal schematisch dargestellt.

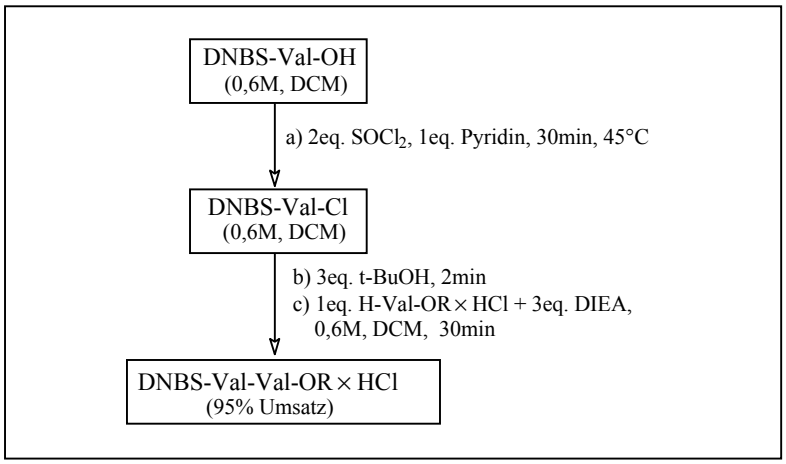


Abb. 41: Schematische Darstellung der Synthese von DNBS-Val-Val-OR durch in situ Aktivierung

Der Übergang zu einem polareren Lösungsmittelgemisch (DCM/DMF) führte nicht zu einer Umsatzsteigerung. Es wurden die in Abb. 42 dargestellten Kupplungsausbeuten erhalten.

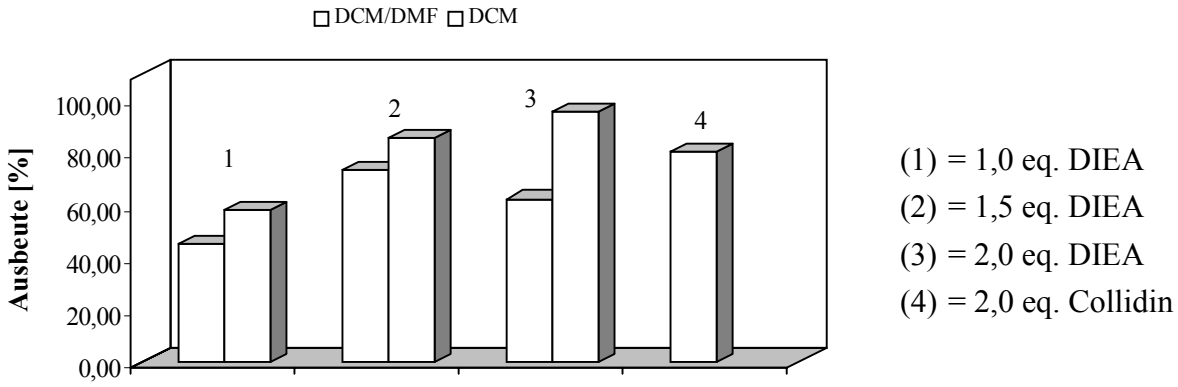


Abb. 42: Vergleich der Ausbeuten für die Synthese von DNBS-Val-Val-OR in DCM bzw. DCM/DMF, t=10min, c=0.3M

2.5.4 Synthesen mit in situ gebildeten sterisch gehinderten DNBS-Aminosäurehalogeniden

Nachdem wir nachgewiesen haben, daß die in situ Aktivierung für die Synthese des Modellsystems DNBS-Val-Val-OR anwendbar ist, wandten wir uns sterisch anspruchsvolleren Modellen zu; MeAib-MeAib-Aib-Ala-NA bzw. Aib-MeAib-Aib-Ala-NA. Die Synthese der Modellpeptide, deren Synthetisierbarkeit wir schon mit preformierten Aminosäurechloriden gezeigt haben (siehe Kap. 2.3.4.), wurde in Lösung durchgeführt. Um die anfallenden Reinigungsoperationen zwischen den einzelnen Syntheseschritten chromatographisch gut verfolgen zu können, wählten wir auch hier als Startaminosäure Alanin-β-naphthylamid. Dadurch war es möglich, die säulenchromatographischen Reinigungen mittels Fluoreszenzdetektion zu verfolgen. Ein allgemeines Schema des Reaktionsablaufes ist in Abb. 43 dargestellt.

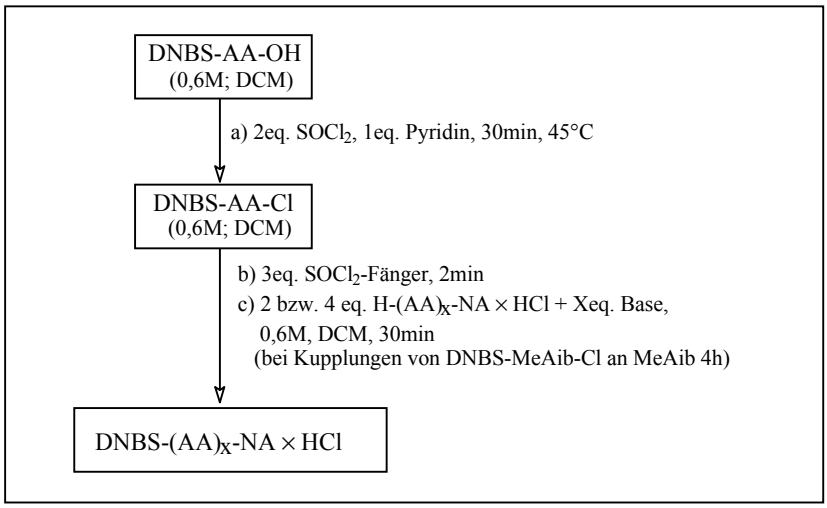
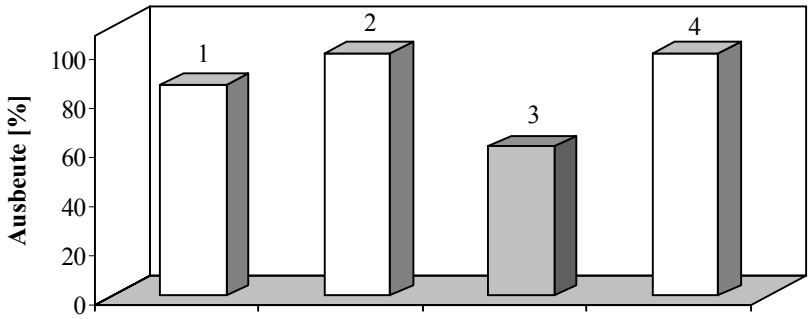


Abb. 43: Allgemeines Syntheseschema für die Kupplung in situ gebildeter, sterisch anspruchsvoller Aminosäureschloride

Bei der Synthese der Tetrapeptide stellten wir fest, daß die Kupplungsausbeuten stark von

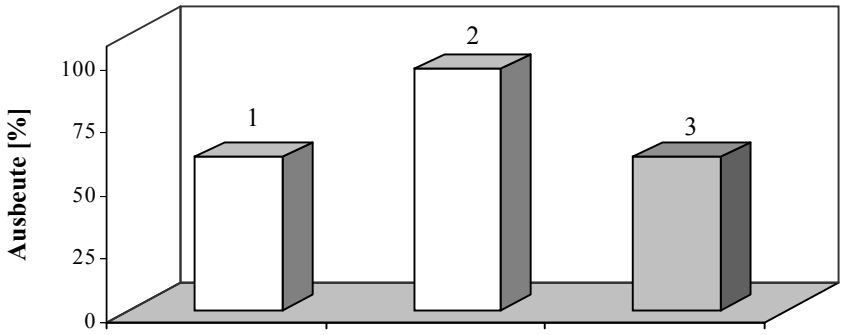
der Effizienz des zugegebenen $SOCl_2$-Fängers sowie von der eingesetzten Menge der Base abhängen. Bei vergleichbaren Reaktionsbedingungen korrelierten die Ausbeuten der Kupplung von in situ gebildetem Säurechlorid mit der sterischen Hinderung der eingesetzten Aminokomponente. Während man für die Umsetzung von DNBS-Aib mit Ala-NA noch einen Umsatz von ca. 85% erhält, liegt die Ausbeute für DNBS-MeAib an Ala-NA nur bei 61%, obwohl die analoge Dipeptidbildung mit den preformierten Aminosäurechloriden beider Aminosäuren quantitativ verläuft (Abb. 44).



(1) DNBS-Aib-Ala-NA in situ Aktivierung
(2) preformiertes Chlorid
(3) DNBS-MeAib-Ala-NA in situ Aktivierung
(4) preformiertes Chlorid

Abb. 44: Kupplungseffizienz von in situ gebildeten und preformierten DNBS-MeAib-Cl bzw. DNBS-Aib-Cl an Ala-NA

Wie Abb. 45 zeigt, konnten die Umsätze für die Kupplung von DNBS-MeAib an Ala-NA durch Variation der eingesetzten Basenmenge optimiert werden. Wir konnten so die Ausbeuten auf 96% steigern.



(1) = 2 eq. DIEA
(2) = 3 eq. DIEA
(3) = 3 eq. BSA

Abb. 45: Umsatzvergleich für die Kupplung von DNBS-MeAib-Cl an Ala-NA mit X eq. Base

Für die Reaktion von in situ gebildeten DNBS-MeAib-Cl mit Aib-Ala-NA bzw. mit MeAib-Aib-Ala-NA konnten selbst bei Variation der Basenmenge keine hohen Ausbeuten erreicht werden, da in zunehmenden Maße die Bildung von symmetrischem Anhydrid von DNBS-MeAib als Nebenreaktion auftrat. Die Charakterisierung dieses Nebenproduktes erfolgte durch chromatographischen Vergleich mit synthetisch hergestelltem Anhydrid (Kap. 2.3.5.).

Wir versuchten durch den Einsatz anderer $SOCl_2$-Fänger die Nebenreaktionen einzuschränken. Geeignete Fänger sollten tertiäre Amine bzw. Alkohole sein. Für die Kupplung testeten wir neben t-BuOH auch t-$BuNH_2$, Triphenylmethanol und Tritylamin. In Abb. 46 sind die für die Kupplungen mit den verschiedenen Fängern erhaltenen Ausbeuten dargestellt.

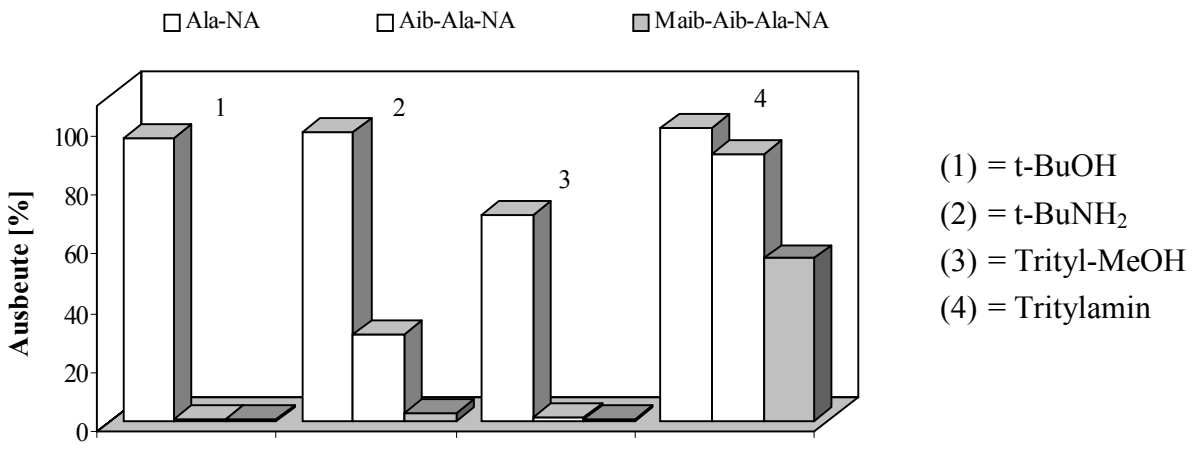


Abb. 46: Kupplung von in situ gebildeten DBS-MeAib-Cl an Ala-NA, Aib-Ala-NA (30 min) bzw. an MeAib-Aib-Ala-NA (t = 4h)

Beim Einsatz von t-$BuNH_2$ als Scavenger bei der Reaktion von DNBS-MeAib-Cl mit Aib-Ala-NA bzw. MeAib-Aib-Ala-NA konnte bereits nach 2 Minuten chromatographisch die Bildung von 17% des entsprechenden t-Butylamides nachgewiesen werden.

Verwendet man dagegen das sterisch stärker gehinderte Tritylamin, so wird innerhalb von 2 Minuten nur 1,7% des entsprechenden Amids gebildet. Will man umgekehrt sterisch weniger anspruchsvolle Carboxylkomponenten mittels in situ gebildeten Aminosäurechloriden umsetzen, ist die Nutzung des Tritylamins als Fänger für $SOCl_2$ erwartungsgemäß nicht möglich, da hier die Amidbildung mit dem Scavenger schneller verläuft als mit der Aminokomponente. Dies konnten wir durch Zugabe von Tritylamin zu in situ gebildeten DNBS-Val-Cl chromatographisch nachweisen. Für einfache, nicht gehinderte Aminosäuren ist t-BuOH (siehe Kap. 2.5.3.) als Fänger besser geeignet.

Für die sterisch anspruchsvolle Reaktion von DNBS-MeAib-Cl mit MeAib-Aib-Ala-NA konnten durch in situ Aminosäurechloridbildung mit Tritylamin als $SOCl_2$-Fänger Umsätze von ca. 55% in 2h erreicht werden (im Vergleich dazu reagiert preformiertes DBS-MeAib-Cl mit MeAib-Aib-Ala-NA in gleicher Zeit zu 74%). Die Reaktionszeiten für die Bildung der MeAib-MeAib-Peptidbindung verlängerten sich von 10 Minuten auf 4 Stunden. Es gelang damit erstmals ein Tetrapeptid herzustellen, welches mehrere Aib- und MeAib-Reste enthält.

Das Tetrapeptid MeAib-MeAib-Aib-Ala-NA wurde vollständig durch in situ aktivierte Aminosäurechloride hergestellt. Das vergleichbare Tetrapeptid mit einem N-terminalen Aib-Rest war nur bis zur Tripeptidstufe durch in situ gebildete Aminosäurechloride herstellbar, da bei der Kupplung von in situ hergestellten DNBS-Aib-Cl die Nebenreaktionen, wie Anhydridbildung und Fragmentierung, überwogen.

Tab. 4 zeigt die für die einzelnen Reaktionsschritte erhaltenen Ausbeuten. Bei den Kupplungen mit in situ gebildeten Aminosäurechloriden wurden bis auf die Umsetzung von DNBS-MeAib-Cl mit MeAib-Peptid Ausbeuten von über 85% erhalten. Zum Vergleich wurden auch die Ausbeuten, die für die Acylierung mit preformierten Aminosäurechloriden erhalten wurden, dargestellt.

Tab. 4: Ausbeuten von Acylierungen mit in situ gebildeten bzw. preformierten Aminosäurechloriden

Peptid	Kupplungsschritt	Ausbeute [%] (in situ Aktivierung)	Ausbeute [%] (preformiertes Chlorid)
MeAib-MeAib-Aib-Ala-NA	DNBS-Aib-Cl an Ala-NA	86	99
	DNBS-MeAib-Cl an Aib-Ala-NA	90	97
	DNBS-MeAib-Cl an MeAib-Aib-Ala-NA	55*, (4eq. Cl)	86*
Aib-MeAib-Aib-Ala-NA	DNBS-Aib-Cl an Ala-NA	86	99
	DNBS-MeAib-Cl an Aib-Ala-NA	90	97
	DNBS-Aib-Cl an MeAib-Aib-Ala-NA	___	52

* die Reaktionszeit betrug 4h, ansonsten 30 min

Die erhaltenen Tetrapeptide wurden mittels MS, HPLC und ^{1}H-NMR charakterisiert. Dabei zeigte sich in den NMR-Spektren der Tetrapeptide eine Aufspaltung der Methylgruppen-Signale sowohl der MeAib- wie auch der Methylgruppen der Aib-Reste (Tab. 17). Diese Aufspaltung war in den Dipeptiden Pbf-MeAib-MeAib-OMe bzw. Pbf-Aib-MeAib-OMe noch nicht zu beobachten. Dies läßt darauf schließen, daß die Methylgruppen stereochemisch nicht äquivalent sind.

Unsere Untersuchungen zur in situ Aktivierung von DNBS-Aminosäuren zeigten die prinzipielle Anwendbarkeit dieser Methode für die Synthese. Allerdings war für eine erfolgreiche Säurechloridbildung, anders als in der Literatur [100], [101] beschrieben, mehr als ein Äquivalent $SOCl_2$ erforderlich. Dies machte die Zugabe eines Reaktionszusatzes zum Abfangen von überschüssigen $SOCl_2$ nötig. Unsere Untersuchungen zeigten, daß dieser Reaktionszusatz in Abhängigkeit der jeweiligen Reaktionspartner zu wählen ist.

Ein Vergleich mit Ausbeuten, die mit preformierten Aminosäurechloriden erhalten wurden, zeigt, daß Synthesen mit preformierten Aminosäurechloriden vorzuziehen sind, da man mit ihnen bessere Kupplungsausbeuten erhalten kann. Die Nutzung der in situ-Technik bietet sich dagegen in Fällen an, wo säurelabile Seitenketten eine Lagerung der Aminosäurechloride verbieten.

2.6 Anwendung der Arensulfonyl-geschützten Aminosäurechloride in der Festphasensynthese

2.6.1 Synthesen mit o-NBS-MeAib-Cl

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl die NBS- als auch die DNBS-Schutzgruppe auf ihre Anwendbarkeit für die Festphasensynthese untersucht.

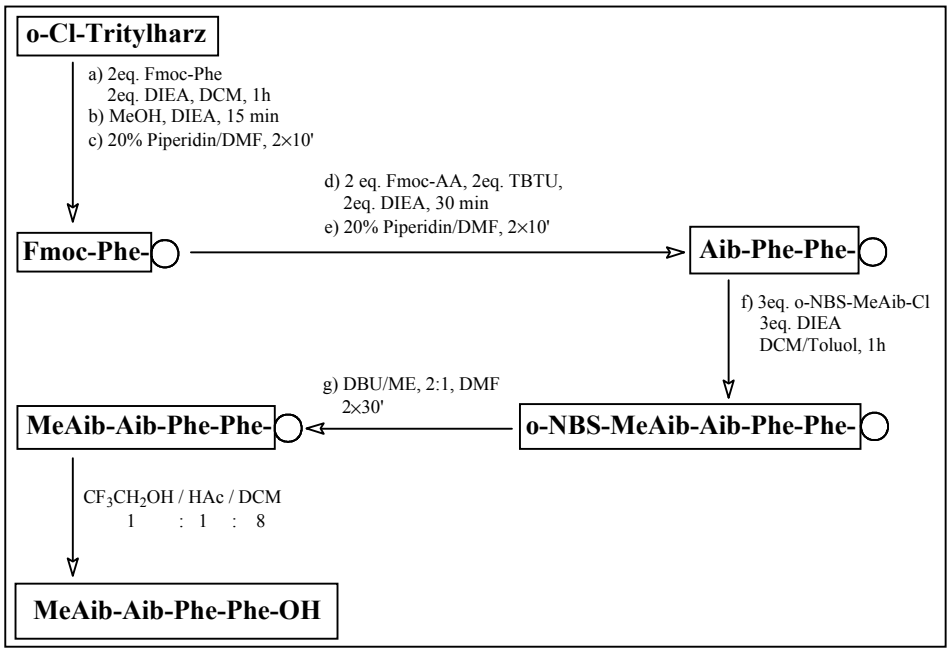


Abb. 47: Syntheseschema des Tetrapeptides

Als Modell für o-NBS-Aminosäurechloride wurde die Kupplung von o-NBS-MeAib-Cl an ein Tripeptidharz untersucht. Die Synthese wurde am o-Chlortrityl-Harz durchgeführt; in Abb. 47 ist das allgemeine Schema der Kupplung dargestellt.

Die erfolgreiche Abspaltung der Schutzgruppe war an der Bildung des gelben Thioethers erkennbar. Das Tetrapeptid wurde nach präparativer HPLC-Reinigung mit 33%iger Ausbeute erhalten (Abb. 48).

Durch die Synthese des Tetrapeptides konnte gezeigt werden, daß ein Einbau o-NBS-geschützter, sterisch gehinderter Aminosäurechloride an der festen Phase möglich ist.

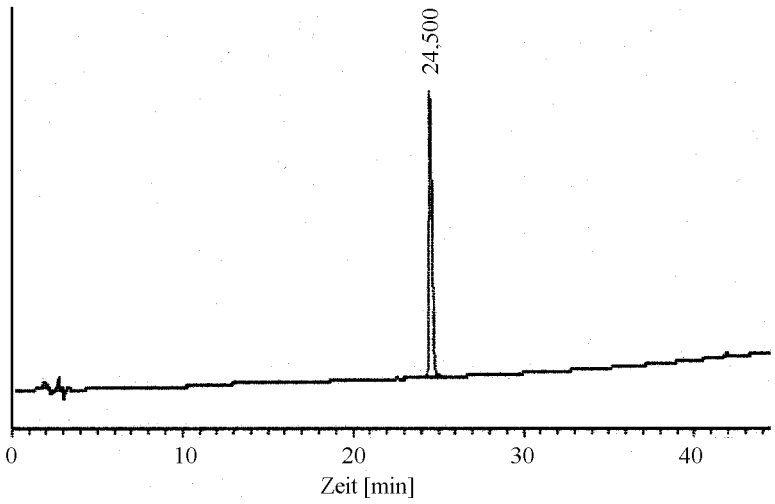


Abb. 48: HPLC-Profil des gereinigten Tetrapeptides

2.6.2 Beladungsbestimmungen

Bei der Abspaltung der DNBS-Gruppe mittels Thiolen entsteht der entsprechende Thioether, für den bei Verwendung von ME/DCM bei 332 nm ein Extinktionskoeffizient ε von 11500 $cm^2 \times mol^{-1}$ und bei Verwendung von ME/DMF bei 342 nm ein Extinktionskoeffizient ε von 8950 $cm^2 \times mol^{-1}$ bestimmt wurde.

Für die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten des bei der Abspaltung der DNBS-Schutzgruppe mit β-Mercaptoethanol entstehenden Thioethers wurden UV-Spektren der Abspaltlösungen bei unterschiedlichen Konzentrationen aufgenommen[1]. Die durchgeführten Beladungsbestimmungen lieferten Werte, die mit vorher für Fmoc-gekuppelte Aminosäuren ermittelten Werten übereinstimmten.

Für die Abspaltung der DNBS-Schutzgruppe mit Thiophenol konnte kein Extinktionskoeffizient ermittelt werden. Da die Lösung sehr oxydationsanfällig ist, wurden keine reproduzierbaren Werte erhalten.

---

[1] Durch Messung der UV-Absorptionsspektren des Thioethers kann eine Quantifizierung Harz-gebundener DNBS-Gruppen in der Abspaltlösung nach folgender Gleichung vorgenommen werden:

$$\text{Beladung} = \frac{A \cdot V \cdot X}{\varepsilon \cdot d \cdot W}$$

A = Extinktion

V = Volumen der Abspaltlösung [l]

X = Verdünnung der Meßlösung

ε = Extinktionskoeffizient [l·mol-1·cm-1]

d = Schichtdicke [cm]

W = Einwaage an Harz [g]

2.6.3 Synthese eines Urocortin-Analogons

Ein sehr interessanter Aspekt für die Anwendung der DNBS-Aminosäurechloride sollte in der Kompatibilität mit der in der Peptidchemie vorrangig angewandten Fmoc-Chemie bestehen. Um diese Anwendung für spezielle Syntheseprobleme an der festen Phase unter Einbeziehung der Fmoc-Strategie zu demonstrieren, wählten wir den Einbau mehrerer Aib- bzw. MeAib-Reste zwischen die beiden Bindungsdomänen des Urocortins, eines Vertreters der CRF-Familie (Corticotropin releasing factor). Dadurch sollte der konformationelle Einfluß sterisch stark gehinderter Aminosäurereste auf die biologische Aktivität des entsprechenden Analogons untersucht werden.

CRF ist ein aus 41 Aminosäuren bestehendes Peptid, welches im Körper zahlreiche Funktionen ausübt. So fungiert es als Neuroregulator für die streßinduzierte Ausschüttung von ACTH und β-Endorphinen und beeinflußt außerdem viele physiologische Prozesse wie die Catecholaminfreisetzung, die Nahrungsaufnahme oder die Regulierung der Körpertemperatur. Zur Familie der CRF-Peptide gehören neben dem CRF noch Urotensin sowie Urocortin und Sauvagine (nur aus 40 Aminosäuren bestehend), die ebenfalls CRF-Rezeptoren aktivieren[103].

Primärstruktur des Urocortins:

DDPPLSIDLTFHCLRTLLELA – RTQSQRERAE – QNRIIFDSV–NH_2

Als Ergebnis von Struktur-Wirkungs-Untersuchungen konnten BEYERMANN und Mitarbeiter zeigen [104], [105], [106], daß in den Peptiden der CRF-Familie zwei separate Bindungsstellen für die Rezeptorbindung existieren, wobei eine Bindungsstelle im N- und die andere im C-Terminus liegen. Durch die hohe Flexibilität der Peptide in wäßriger Lösung ist es schwierig, deren biologische Konformation nachzuweisen. Einbau einer α-Helix (bestehend aus Lysin- und Glutaminsäureresten) zwischen die beiden Rezeptorbindungsstellen des Urocortins führte zu einem hochaktiven Analogon (UEK), dessen biologische Aktivität auch durch den Austausch verschiedener Aminosäuren dieser „Connector"-Helix durch Alanin nicht verringert wird. Diese Untersuchungen führten zu der Annahme, daß die biologische Aktivität der CRF-Peptide hauptsächlich vom Abstand und der relativen Orientierung der beiden Rezeptor-Bindungsstellen und damit durch die Connector-Struktur bestimmt wird. Diese Vermutung wird auch durch die Synthese von Analoga gestützt, die als Spacer ε-Aminocapronsäureeinheiten besitzen. Diese Analoga besitzen trotz des Einbaus der flexiblen Aminocapronsäurereste noch volle intrinsische Aktivität, aber wegen der hohen Flexibilität eine relativ geringe biologische Aktivität. Der Einbau mehrerer aufeinanderfolgender MeAib-Reste sollte zu einer im Vergleich zu Aminocapronsäure stabilen Connectorkonformation führen, weshalb interessante Erkenntnisse für Struktur-Wirkungs-Untersuchungen erwartet wurden. Nach TONIOLO ist für Peptide bestehend aus MeAib-Aib- bzw. Aib-MeAib-Einheiten die Bildung einer helikalen Konformation zu erwarten [57].

Für unsere Untersuchungen gingen wir vom hochaktiven Modellagonisten UEK aus.

DDPPLSIDLTFHLLRTLLEIE	–	KEEKEKKRKE	–	QNRKLLDEV
↓		↓		↓
UEK(1-21)		EK-Einheit		UEK(32-40)
(Bindungsdomäne 1)		(Connector-Sequenz)		(Bindungsdomäne 2)

Anstelle der EK-Linkersequenz sollte die Sequenz -Ala-MeAib-MeAib-Aib- in das Urocortin-Analogon eingebaut werden:

DDPPLSIDLTFHLLRTLLEI – A(MeAib)$_2$Aib – QNRKLLDEV

Die C- und N-terminalen Sequenzen Aib-UEK (32-40) bzw. UEK (1-20) wurden mittels Fmoc-Chemie am Tentagel S RAM-Harz hergestellt. Die Linkersequenz wurde mittels Arensulfonyl-geschützten Aminosäurechloriden eingebaut. Ein Syntheseschema ist in Abb. 49 dargestellt.

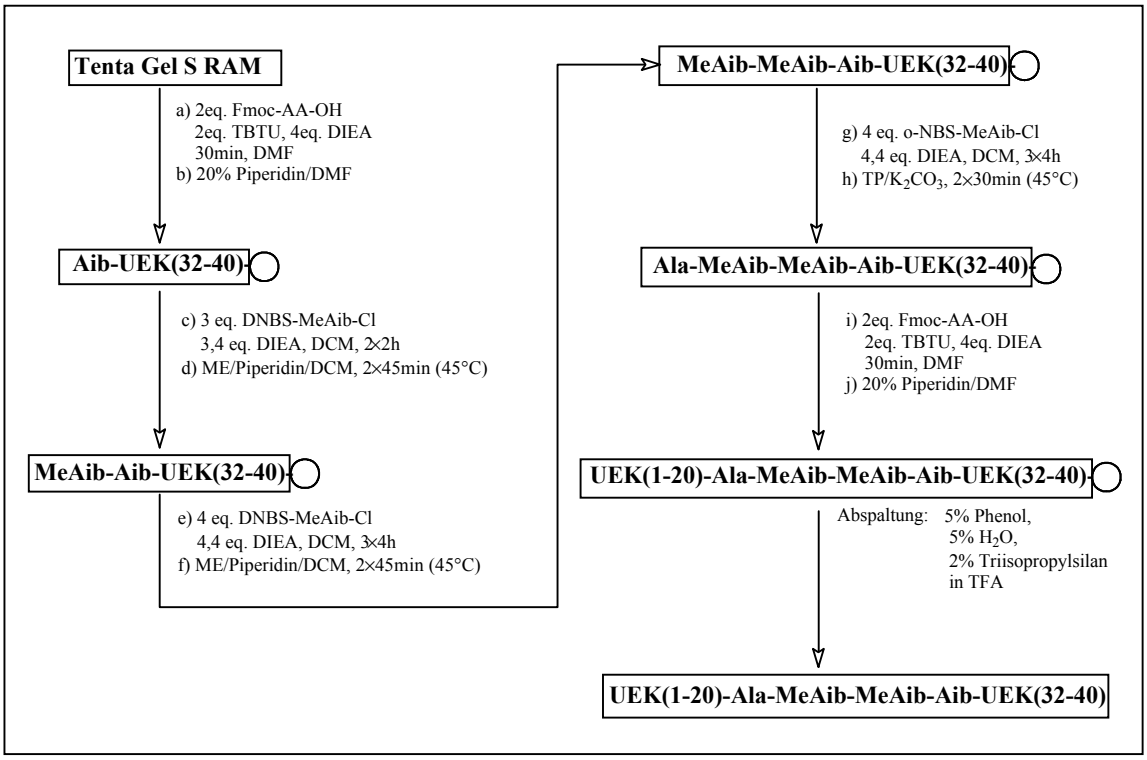


Abb. 49: Syntheseschema des Urocortinanalogons

Nach Abspaltung vom Harz wurde ein Produktgemisch erhalten. Die massenspektrometrische Untersuchung des erhaltenen Gemisches ergab neben dem Zielpeptid als wesentliche Bestandteile Fragmente mit der Masse 2392 und 1396. Aus den gefundenen Massen kann geschlossen werden, daß es sich bei den beiden Fragmenten um UEK-(1-20)-Ala-OH (M = 2392 g/mol) und MeAib-MeAib-Aib-UEK-(32-40) (M = 1396 g/mol) handelt. Offenbar wird nicht nur die Aib-MeAib-Bindung durch TFA gespalten (siehe Kap. 2.4.1.), sondern es kommt auch bei der Ala-MeAib-Bindung während der acidolytischen Abspaltung vom Harz zu einer unerwünschten Peptidspaltung. MeAib-enthaltende Peptide sollten deshalb besser an Träger-Harzen synthetisiert werden, deren Abspaltung unter weniger sauren Bedingungen erfolgen kann (Cl-Trityl-Harz).

Die chromatographische Reinigung des erhaltenen Produktgemisches ergab das gewünschte Peptid.

Mit dieser erfolgreichen Synthese eines bisher nicht synthetisierbaren Peptides mit zwei benachbarten MeAib-Resten konnte gezeigt werden, daß der Einbau sterisch extrem gehinderter Aminosäuren mittels DNBS-geschützter Aminosäurechloride sehr gut im

Rahmen der konventionellen Fmoc-Strategie am Harz möglich ist.

2.6.3.1 CD-spektroskopische Untersuchungen

Zur Untersuchung der Konformationseigenschaften des erhaltenen Peptides wurden CD-spektroskopische Messungen durchgeführt. Zur Diskussion der Ergebnisse wurden außerdem CD-Spektren vom UEK, Des(23-29)UEK, Acp1, Acp2 und vom $(Ala)_4$-UEK gemacht. Beim Acp1 bzw. Acp2 sind die beiden aktiven Zentren des Urocortins durch ein bzw. zwei ε-Aminocapronsäurereste verbunden, beim $(Ala)_4$-UEK besteht die Connector-Einheit aus 4 Alaninen (Tab. 5).

Tab. 5: Darstellung der für die CD-Untersuchungen verwendeten Peptide

Name	Struktur		
UEK	DDPPLSIDLTFHLLRTLLEIE	–KEEKEKKRKE–	QNRKLLDEV
des(23-29)UEK	DDPPLSIDLTFHLLRTLLEIE	–KKE–	QNRKLLDEV
Acp1	DDPPLSIDLTFHLLRTLLEIE	–acp–	QNRKLLDEV
Acp2	DDPPLSIDLTFHLLRTLLEIE	$–(acp)_2–$	QNRKLLDEV
(Ala)4-UEK	DDPPLSIDLTFHLLRTLLEI	$–(Ala)_4–$	QNRKLLDEV
MeAib–UEK	DDPPLSIDLTFHLLRTLLEI	$–A(MeAib)_2Aib–$	QNRKLLDEV

Die Untersuchung der Peptide wurde in wäßriger Lösung durchgeführt. Die Konzentration der gemessenen Peptide war 10^{-4}M. In Abb. 50 sind diese Spektren dargestellt.

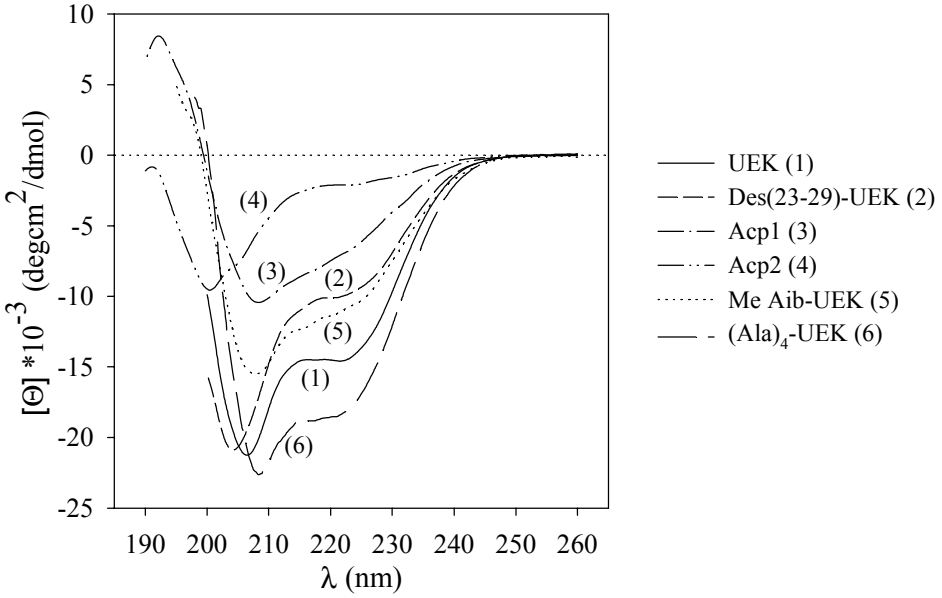
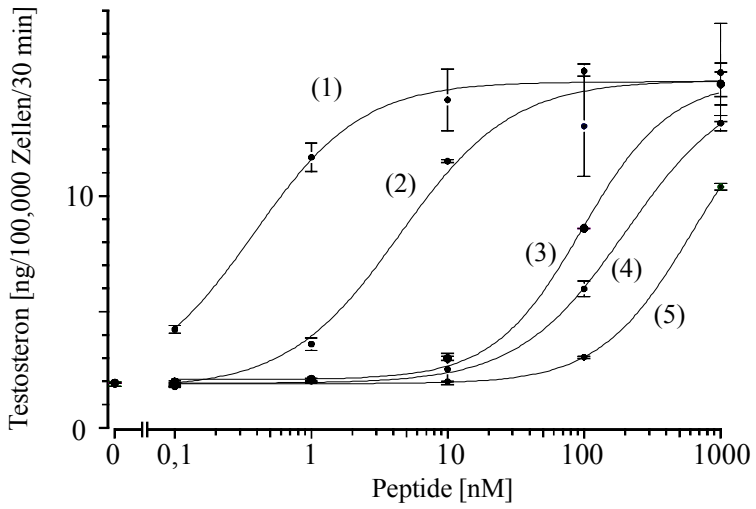


Abb. 50: CD-Spektren der untersuchten Peptide

Es wird deutlich, daß sowohl das Analogon mit dem Ala-MeAib-MeAib-Aib-Connector als auch das mit den 4 Alaninresten, wie das UEK, einen hohen helikalen Anteil besitzen. Dabei ist der helikale Anteil des $(Ala)_4$-UEK höher als der des MeAib-UEK. Im Gegensatz dazu zeigen die Acp-enthaltenden Analoga keine stabile Konformation, das heißt, der Einbau von MeAib und Aib führt zu einer bevorzugten Sekundärstruktur des Analogons.

2.6.3.2 Untersuchungen zur biologischen Aktivität

Zur Charakterisierung der biologischen Aktivität des von uns synthetisierten Peptides UEK (1-20)-Ala-MeAib-MeAib-Aib-UEK (32-40) wurden Untersuchungen an Leydigzellen der Maus durchgeführt [103]. Die Bestimmung der biologischen Aktivität beruht auf der Messung der CRF-induzierten Testosteronproduktion der Leydigzelle.



	EC_{50}-Wert [nM]
(1) = Urocortin	0,6
(2) = Des(23-29)UEK	5,5
(3) = Acp-1	71,4
(4) = Acp-2	115
(5) = MeAib-UEK	464

Abb. 51: Darstellung der biologischen Aktivität anhand der gemessenen EC_{50}-Werte der Testosteronproduktion

Zum Vergleich wurden auch hier UEK, Des(23-29)UEK, Acp1, Acp2 und $(Ala)_4$-UEK getestet (siehe Tab. 5). Abb. 51 stellt die erhaltenen EC_{50}-Werte dar, das heißt die Konzentration, bei der 50% des maximal möglichen Effektes erzielt wurden. Dabei wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit das $(Ala)_4$-UEK nicht mit dargestellt, da es einen EC_{50}-Wert besitzt, der dem UEK vergleichbar ist (1,8 nM).

Es wird deutlich, daß dem Peptid durch den Einbau der MeAib-Reste keine ideale Anpassung an den Rezeptor ermöglicht wird, so daß die biologische Aktivität nur noch ca. 1/1000 der des nativen und des helikalen Peptides, 1/100 des gleich großen Des(23-29)UEK und ca.1/6 bzw. 1/4 der Aktivität der Acp-enthaltenden Peptide beträgt.

Das legt die Vermutung nahe, daß die Orientierung der beiden Rezeptorbindungsstellen durch die Strukturinduktion der MeAib-Reste anders ist als beim Des(23-29)UEK und daß dadurch eine Wechselwirkung mit dem Rezeptor nicht mehr im gleichem Maß gegeben ist. Es wird außerdem deutlich, daß die zu vermutenden Konformationsunterschiede zwischen den untersuchten Analoga mittels CD-Spektroskopie der Peptide in wäßriger Lösung nicht erfaßt werden können. Möglicherweise wird am Rezeptor auch eine andere Konformation als in Wasser angenommen, das heißt, die Konformation in Wasser reflektiert möglicherweise nicht die biologisch aktive Konformation. Um eine eindeutige Aussage dazu machen zu können, ist die dreidimensionale Strukturbestimmung dieser Peptidanaloga notwendig.

2.6.4 Nebenreaktionen Arensulfonyl-geschützter Aminosäurehalogenide im Verlauf der SPPS

Beim schrittweisen Aufbau von Peptiden an der festen Phase führen unvollständige Acylierungsreaktionen zu Nebenprodukten, die entsprechende Aminosäureauslassungen (Fehlsequenzen) aufweisen. Derartige Fehlsequenzen können durch Acetylierungen der nicht umgesetzten Aminogruppen nach einem Kupplungsschritt vermieden werden, wobei die acetylierten Nebenprodukte vom Endprodukt zumeist problemlos chromatographisch abgetrennt werden können. Wir haben bei der Verwendung von DNBS-Aminosäurechloriden für die Synthese von Peptiden mit Acetylierung nach jedem

Kupplungsschritt jedoch festgestellt, daß eine Base-katalysierte Nebenreaktion auftritt, die zu einer irreversiblen Modifizierung der N-terminalen Aminogruppe führt. Bei der Synthese von Val_x-Lys(Boc)-Harz (x=4) haben wir beobachtet, daß schon nach Einbau des 2. Valinrestes eine Verminderung in der Kupplungsausbeute auftritt. Es konnte durch Synthese von entsprechenden Referenzsubstanzen ausgeschlossen werden, daß der Kettenabbruch durch N-Acetylierung des DNBS-Val-Lys(Boc)-Harzes am Sulfonamidstickstoff während des Capping-Schrittes mit Ac_2O erfolgte. Tatsächlich kommt es während der Acetylierung der unumgesetzten Aminogruppen zu einer Nebenreaktion an der DNBS-Schutzgruppe unter Abspaltung von SO_2 (Abb. 52).

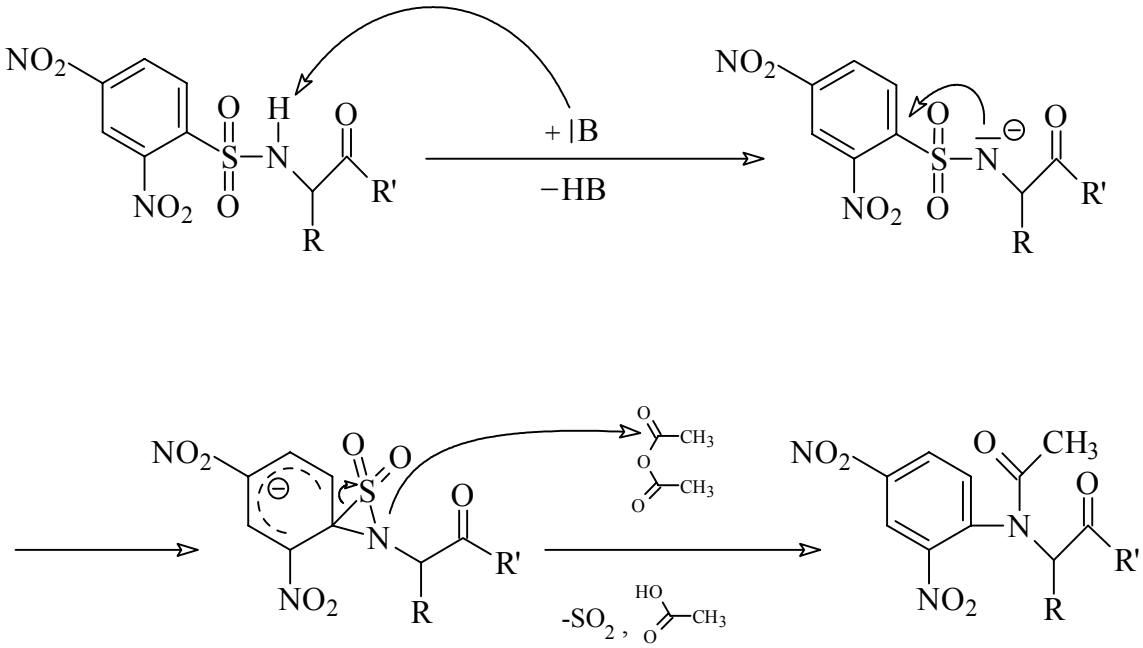


Abb. 52: Nebenreaktion während der Acetylierung; R = Aminosäureseitenkettenrest, R‘ = Restpeptid am Harz

Das Auftreten dieser Nebenreaktion war an einer starken Braunfärbung der Reaktionslösung zu erkennen. Auch die Anwendung schwächerer Basen (TEA anstelle DIEA) verhinderte den Verlust des SO_2 nicht.

Für die Synthese einer „difficult sequence“, dem Homo-oligo-Valin am Lys(Boc)-Tentagel-Harz, haben wir deshalb auf einen Acetylierungsschritt verzichtet. Die Ausbeuten beim schrittweisen Aufbau mit DNBS-Val waren jedoch niedriger als für die entsprechenden Umsetzungen mit Fmoc-Val. Während die erste Kupplung von DNBS-Valin an Lysin(Boc)-Harz noch mit guten Ausbeuten verlief, nahm die Kupplungsausbeute mit steigender Kettenlänge des Peptides ab. DNBS-Valin wurde mit Standardmethoden (Diisopropylcarbodiimid (DIPCDI) und dem Additiv 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) in DCM/DMF) gekuppelt. Die Beladung nahm mit jedem Kupplungsschritt trotz negativem Kaisertest ab (Abb. 53) [107].

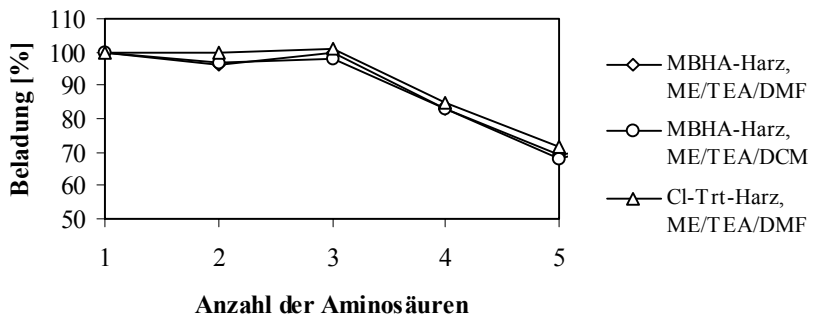


Abb. 53: Abnahme der Beladung für die DNBS-Valin-Kupplung an verschiedenen Harzen

Um untersuchen zu können, warum es zu diesem Abfall der Kupplungsausbeuten kommt, wurden am o-Chlortrityl- und am MBHA-Harz (Amidharz) jeweils Val_4-Lys-OH bzw. Val_5-Lys-NH_2 synthetisiert und die Rohpeptide anschließend mittels LC-MS analysiert. Beide Rohpeptide zeigten neben dem gewünschten Val_4-Lys-OH bzw. Val_5-Lys-NH_2 Produkte, die auf eine Nebenreaktion bei der Abspaltung der DNBS-Schutzgruppe zurückzuführen sind (Abb. 55).

Dabei wird, wie kürzlich für p-NBS-Aminosäuren beschrieben [108], unter Baseneinfluß die Nitrogruppe durch das Nucleophil Thiolat ausgetauscht. Die so modifizierte Schutzgruppe (Thioether) läßt sich nicht mehr unter den selben Bedingungen abspalten und verbleibt am Peptid (Abb. 54).

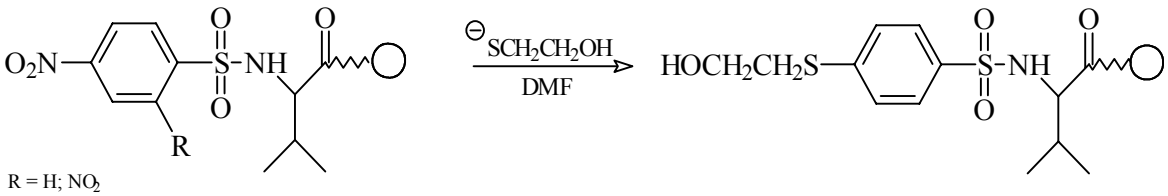


Abb. 54: Austausch einer Nitrogruppe durch das angreifende Nucleophil

Die beobachteten Massendifferenzen bestätigten die Vermutung, daß es auch bei DNBS-geschützten Aminosäuren zu dieser Nebenreaktion kommen kann (Tab. 6). Für die o-NBS-Gruppe als N^{α}-Schutzgruppe wurde diese Nebenreaktion nicht beobachtet, so daß man davon ausgehen kann, daß bei der DNBS-Schutzgruppe die Nitrogruppe in p-Position ausgetauscht wurde.

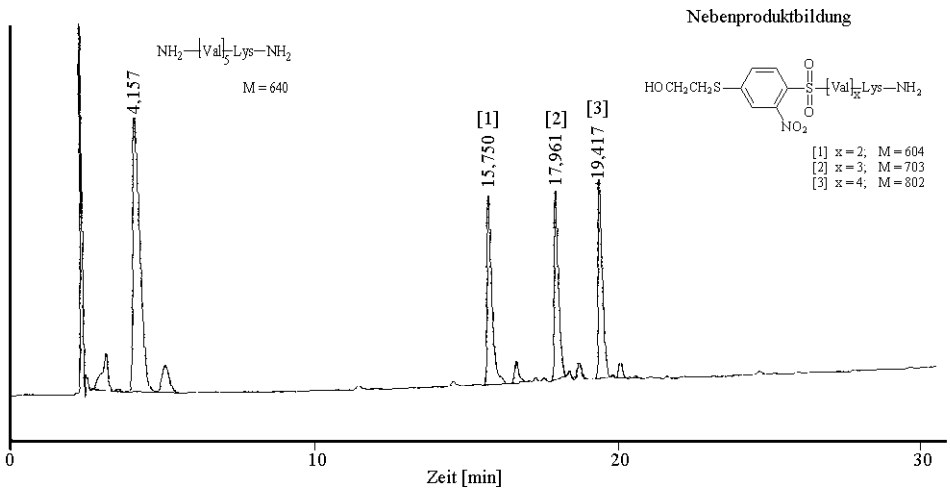


Abb. 55: HPLC-Profil des vom Harz abgespaltenen Rohpeptides NH_2-$(Val)_5$-Lys-NH_2

Versuche, die DNBS-Schutzgruppe in DCM abzuspalten (bei den Synthesen in Lösung erfolgreich durchgeführt), ergaben für die Poly-Val-Sequenz am Harz nur eine unvollständige Freisetzung der Aminofunktion. Möglicherweise reicht hier die Solvatation mit DCM nicht aus, da im Falle assoziierender Peptidsequenzen stärker polare Lösungsmittel, wie z.B. DMF, notwendig sind.

Tab. 6: Durch LC-MS-Untersuchungen gefundene Nebenprodukte bei der Harzsynthese

Peptid	Harz	Abspaltung der SG	berechnete Masse	gefundene Massen
Val_4-Lys-OH	Chlortrityl	ME/TEA/DMF	542	443, 542, 704, 803
Val_5-Lys-NH_2	MBHA	ME/TEA/DMF	640	442, 541, 640, 604, 703, 802
Val_5-Lys-NH_2	MBHA	TP/K_2CO_3/DMF	640	541, 640, 627, 726
Val_4-Lys-OH	Chlortrityl	TP/K_2CO_3/DMF	542	443, 542, 628, 727

MILLER et al. beschrieben kürzlich eine erste Peptidsynthese am Harz unter Verwendung von o-NBS-Aminosäuren. Sie benutzten zur Entfernung der Schutzgruppe TP/K_2CO_3 in DMF [89]. Um zu überprüfen, ob die Abspaltung der Schutzgruppe unter diesen Bedingungen auch für das Modell Val_x-Lys möglich ist, synthetisierten wir am Chlortrityl- bzw. am MBHA-Harz Val_4-Lys-OH bzw. Val_5-Lys-NH_2. Durch LC-MS-Untersuchungen konnten wir neben dem gewünschten Val_4-Lys-OH auch o-NBS-Val_3-Lys-OH und o-NBS-Val_4-Lys-OH nachweisen. Dies führt zu der Vermutung, daß sich die o-NBS-Schutzgruppe mit zunehmender Kettenlänge immer schlechter abspalten läßt (Abb. 56).

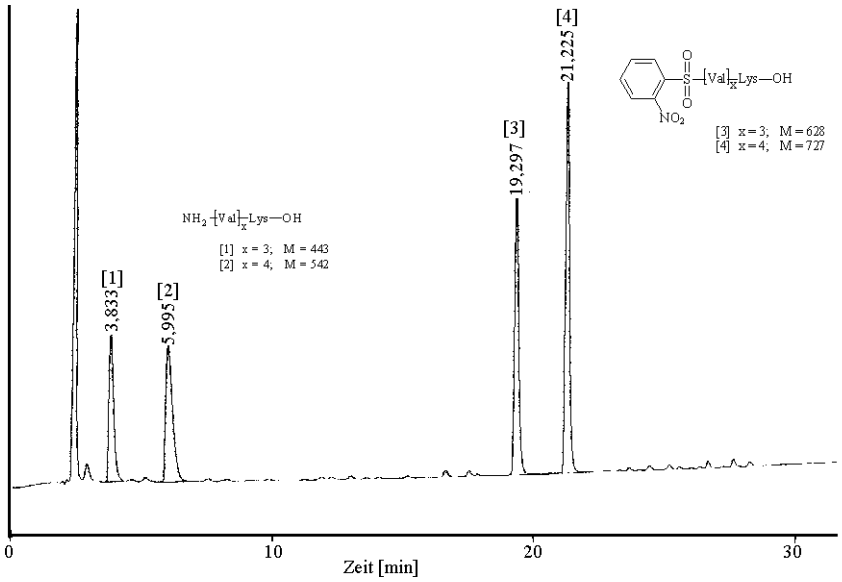


Abb. 56: HPLC-Profil des Rohpeptides NH_2-$(Val)_4$-Lys-OH, synthetisiert mit o-NBS-Val-Cl

Wir vermuten, daß es mit Zunahme der Kettenlänge zwischen den aromatischen Systemen der Schutzgruppen zu intermolekularen Wechselwirkungen kommt, die zur Peptidassoziation und damit zur erschwerten Abspaltung führt, wie es bereits von LARSEN für die Fmoc-Gruppe beschrieben wurde [109]. LARSEN und Mitarbeiter konnten durch Nutzung der Nahen FTIR-Spektroskopie anhand der Synthese von $(Ala)_6$-Lys(Boc)-OH nachweisen, daß das am Harz gebundene Fmoc-geschützte Peptid zur Ausbildung von β-Strukturen neigt, während beim ungeschützten Peptid meist random coil, das heißt ungeordnete Strukturen vorlagen. Ihre Untersuchungen mit Boc-geschützten Peptiden zeigten, daß die Fmoc-Schutzgruppe einen starken Einfluß auf die Konformation der Peptidkette hat, da mit der Boc-Schutzgruppe synthetisierte Peptide nur random coil Strukturen aufwiesen.

Die Ergebnisse zeigen, daß die DNBS-Schutzgruppe in Kombination mit Aminosäurechloriden hinsichtlich der Überwindung assoziationsbedingter Syntheseschwierigkeiten beim Aufbau von Peptiden im Vergleich mit der Fmoc-Gruppe eher von Nachteil ist.

2.7 Untersuchungen zur Stereomutation von DNBS-Aminosäurehalogeniden

2.7.1 Einfluß der Abspaltbedingungen auf die Stereomutation

Um ausschließen zu können, daß es beim Abspalten der Schutzgruppe zu einem Verlust an chiraler Integrität kommt, wurde das Dipeptid Val-Lys-NH_2 am Tentagel S RAM-Harz synthetisiert. Dabei wurde DNBS-Valin mittels Diisopropylcarbodiimid (DIPCDI) und dem Additiv 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) an Lysin gekuppelt. Das so erhaltene Dipeptid wurde mit verschieden konzentrierten Thiophenolatlösungen versetzt. Weitere Abspaltversuche erfolgten mit Mercaptoethanol/Triethylamin. Dabei wurde mit verschiedenen Mengen ME gearbeitet. Die Abspaltung der DNBS-Schutzgruppe kann

visuell an einer anfänglichen tiefen Rotfärbung der Lösung, die später verschwindet, verfolgt werden.

Die Untersuchungen der Stereomutation wurden nach einer Methode von KUSUMOTO durchgeführt [110]. Bei dieser Methode hydrolysiert man die zu untersuchenden Peptide 24h bei 120°C in DCl. Anschließend werden die so erhaltenen Aminosäuren mit iso-Propanol/HCl und Trifluormethylsilylamin (TFMSA) derivatisiert [111] und mittels GC-MS analysiert. Durch die Verwendung von DCl kann man die während der Peptidhydrolyse auftretende Racemisierung bestimmen, da bei einer Veränderung der Konfiguration während der Hydrolyse der Wasserstoff durch Deuterium ausgetauscht wird.

Tab. 7: Ergebnisse der Untersuchungen zum Auftreten von Stereomutation bei Abspaltung der DNBS-Gruppe

	6 Äquivalente ME	**10 Äquivalente ME**	**20 Äquivalente ME**
% D-Val	0,031 (±0,014%)	0,049 (±0,018)	0,025 (±0,020)
	2% Thiophenol	**5% Thiophenol**	
% D-Val	0,037 (±0,017)	0,021 (±0,005)	

Die Ergebnisse in Tab. 7 zeigen, daß zumindest für unser Modellpeptid kein signifikanter Verlust chiraler Integrität unter den Deblockierungsbedingungen auftritt.

2.7.2 Untersuchungen zur Stereomutation bei der Kupplung von DNBS-Val-Cl

Obwohl für Sulfonylschutzgruppen am N^{α}-Stickstoff der Verlust der chiralen Integrität von α-Aminosäuren über Oxazolonbildung ausgeschlossen werden kann, könnte die Dinitrosubstitution an der Arensulfonyl-Gruppe durch elektronische Effekte die Polarisierung der C^{α}-H-Bindung und damit eine Base-katalysierte Stereomutation durch Protonenabstraktion befördern. Deshalb untersuchten wir die Kupplung von DNBS-Val-Cl an Alanin. Um das synthetisierte Dipeptid auch nach Abspaltung der DNBS-Schutzgruppe mittels UV-Detektion chromatographisch nachweisen zu können, wurde Alanin als β-Naphthylamid eingesetzt. Mit diesem Carboxylschutz war es möglich, zusätzlich zum UV- auch mit einem Fluoreszenzdetektor zu arbeiten. Da hierbei die zu untersuchenden Substanzen bei einer Wellenlänge angeregt werden und deren emittierte Strahlung bei einer anderen gemessen wird, steigt die Empfindlichkeit der Nachweismethode erheblich.

Untersuchungen mit DNBS-D, L-Val-Ala-NA zeigten, daß sich sowohl die geschützten als auch die freigesetzten Dipeptiddiastereomere chromatographisch gut trennen ließen (Abb. 57).

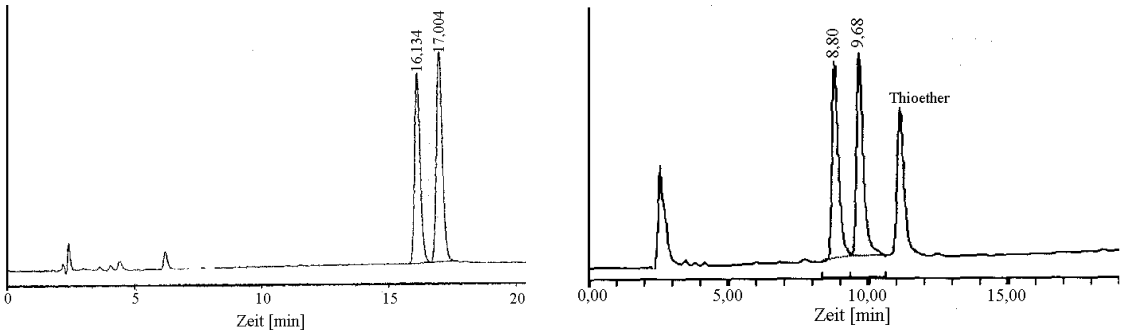


Abb. 57: HPLC-Profile von **a)** DNBS-D,L-Val-Ala-NA und **b)** D, L-Val-Ala-NA

Die Stereomutation wurde für unter in situ Aktivierungsbedingungen hergestelltes und für preformiertes DNBS-Val-Cl untersucht. Die Kupplungen mit in situ gebildetem Säurechlorid wurden mit 2 bzw. 4 Äquivalenten Base bezogen auf das Aminosäurechlorid durchgeführt. Als Lösungsmittel diente sowohl DCM als auch ein 1:1 Gemisch aus DCM/DMF. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgte mit der 10fachen Menge an β-Mercaptoethanol in DCM. Als $SOCl_2$-Fänger wurde t-Butanol benutzt.

Tab. 8: Stereomutation für die Kupplung von DNBS-Val-Cl an Ala-NA

Aktivierung	Base	Menge	LM	% Stereomutation (UV-220nm*)
in situ gebildetes AS-Chlorid	DIEA	2eq.	DCM	0,061
in situ gebildetes AS-Chlorid	Collidin	2eq.	DCM	0,058
in situ gebildetes AS-Chlorid	DIEA	4eq.	DCM	0,056
in situ gebildetes AS-Chlorid	Collidin	4eq.	DCM	0,058
in situ gebildetes AS-Chlorid	DIEA	2eq.	DCM/DMF	0,041
in situ gebildetes AS-Chlorid	Collidin	2eq.	DCM/DMF	0,054
preformiertes AS-Chlorid	DIEA	1eq.	DCM	0,042
preformiertes AS-Chlorid	Collidin	1eq.	DCM	0,039

* Die bei 250nm erhaltenen Werte weichen nicht von den bei 220nm erhaltenen Werten ab

Die chromatographischen Untersuchungen wurden mit einem UV-Detektor (220nm bzw. 250nm) und mit einem Fluoreszenzdetektor (ex. 250nm, em. 350nm) durchgeführt. Das erhaltene Dipeptid wurde massenspektrometrisch analysiert. Die Ausbeuten der Kupplungen lagen zwischen 70% und 98% (Reaktionen nicht optimiert).

Aus den in Tab. 8 aufgeführten Daten geht hervor, daß für die Kupplung mit in situ gebildeten und mit preformierten DNBS-Aminosäurechloriden kein nennenswerter Verlust an optischer Integrität zu beobachten ist.

3 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Anwendung geeigneter N^{α}-Schutzgruppen die hohe Reaktivität der Säurechloride für die Peptidsynthese nutzen zu können und so bisher nicht zugängliche, sterisch extrem gehinderte Aminosäurereste enthaltende Peptide zu synthetisieren. Arensulfonylschutzgruppen, die im Gegensatz zu den gebräuchlichen N-Schutzgruppen vom Urethantyp keine reaktionsfähige Carbonylgruppierung enthalten und damit nicht zur Bildung von Oxazolonen befähigt sind, erlauben einen ersten Vergleich der Reaktivitäten von α-Aminosäurefluoriden und -chloriden für N-Acylierungen. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit substituierte Arensulfonylschutzgruppen bezüglich ihrer Eignung als N^{α}-Schutzgruppe von Aminosäurechloriden für den stufenweisen Aufbau von Peptiden und die Möglichkeit einer in situ Aktivierung mit Thionylchlorid untersucht. Die erarbeiteten Methoden fanden Anwendung beim Einbau extrem gehinderter Aminosäurereste in ein biologisch aktives CRF-Analogon.

- Reaktivitätsvergleich von Aminosäurechlorid und –fluorid

Bei Verwendung der Tosylschutzgruppe zeigt der Reaktivitätsvergleich von α-Aminosäurefluorid und -chlorid, daß die Aminosäurechloride deutlich reaktiver als die Aminosäurefluoride sind. Dieser Vorteil kommt allerdings nur in Systemen zum Tragen, in denen ein Verlust des Aminosäurechlorides durch Nebenreaktionen wie z. B. der Oxazolonbildung ausgeschlossen ist. Im Fall der Fmoc-Aminosäure-halogenide erzielt man mit den Säurechloriden im Vergleich zu den entsprechenden Säurefluoriden dann höhere Kupplungsausbeuten, wenn die Acylierung schneller als die konkurrierende Oxazolonbildung erfolgt. Für Synthesen unter Verwendung der Fmoc-Chemie sind die Aminosäurefluoride in der Regel die effizienteren Acylierungsreagenzien, da die Fmoc-Aminosäurechloride eine viel schnellere Oxazolonbildung in Gegenwart von Basen zeigen.

- Synthesen mit Arensulfonyl-geschützten Aminosäurechloriden

Bei Acylierungen mit den verschiedenen Arensulfonyl-geschützten Aminosäurechloriden zeigten sich Unterschiede in den Reaktivitäten entsprechend der elektronischen Effekte der Substituenten der Arensulfonylschutzgruppe.

Unter Verwendung der Arensulfonyl-geschützten Aminosäurechloride gelang erstmalig die effiziente Kupplung von RSO_2-Aib/MeAib-Cl an MeAib-SG_C. Die zum Vergleich durchgeführte Synthese mit Aminosäurefluoriden führte nicht zum gewünschten Produkt. Grund dafür ist die zu geringe Reaktivität der Aminosäurefluoride.

Hinsichtlich der Stabilität stellten wir fest, daß sowohl das NBS-Aib-Cl als auch das DNBS-Aib-Cl im Vergleich zu den Tosyl und Pbf-Analoga instabiler in Gegenwart von Basen sind, was sich mit den unterschiedlichen induktiven Effekten der verschiedenen Benzensubstituenten erklären läßt. Diese Instabilität führt zu Umsatzeinbußen für die Kupplung von RSO_2-Aib-Cl an MeAib-SG_c in der Reihenfolge RSO_2-: DNBS = NBS>Pbf>Tosyl.

- Abspaltung der unterschiedlichen Sulfonylschutzgruppen

Durch den unterschiedlichen elektronischen Einfluß der verschiedenen Substituenten am Benzenrest ergeben sich abgestufte Abspaltbedingungen für die einzelnen Schutzgruppen. Während sich die Tosyl-Schutzgruppe nur unter drastischen Bedingungen vom Peptid entfernen läßt (Na/fl. NH_3), kann die Pbf-Schutzgruppe unter relativ milden Bedingungen mit einem Gemisch aus TFA/DMS abgespalten werden. Im Gegensatz dazu lassen sich die

Nitro-substituierten Arensulfonylschutzgruppen relativ problemlos mittels Thiolaten abspalten.

Während die Abspaltung der Pbf-Schutzgruppe vom Pbf-MeAib-MeAib-OMe ohne Probleme verlief, erhält man unter analogen Bedingungen für Pbf-Aib-MeAib-OMe nicht den gewünschten Dipeptidester, sondern es wird eine Spaltung der Peptidbindung beobachtet. Auch gegenüber 50% TFA erwies sich die Aib-MeAib-Bindung als instabil. In der Literatur wurde bisher nur die Aib-Pro-Bindung als besonders säurelabil beschrieben. Diese Säurelabilität der Aib-MeAib-Bindung erforderte für entsprechende Synthesen eine alternative Schutzgruppe, wie sie durch nucleophil abspaltbare Schutzgruppen, vom Arensulfonyltyp beschrieben ist. So gelang es unter Verwendung der DNBS-Schutzgruppe erstmals Peptide herzustellen, die säurelabile Aib-MeAib-Bindungen enthalten. Die Abspaltung der DNBS-Schutzgruppe gelingt in relativ kurzer Zeit (30 min) mit ME/TEA in DCM.

- in situ Säurechloridbildung

Untersuchungen zur in situ Säurechloridbildung von DNBS-Aminosäuren zeigten eine prinzipielle Anwendbarkeit dieser Technik für die Peptidsynthese. Allerdings war für eine erfolgreiche Chloridaktivierung, anders als in der Literatur beschrieben, mehr als ein Äquivalent $SOCl_2$ erforderlich. Dies machte die Zugabe eines Reaktionszusatzes zum Abfangen des überschüssigen $SOCl_2$ nötig. Unsere Untersuchungen zeigten, daß dieser Reaktionszusatz in Abhängigkeit von der Reaktivität der jeweiligen Komponenten zu wählen ist.

- Festphasensynthesen

Mit Hilfe der o-NBS-Schutzgruppe war es möglich, an der festen Phase MeAib-OH an Aib zu kuppeln. Dies konnten wir mit der erfolgreichen Synthese des Tetrapeptides MeAib-Aib-Phe-Phe-OH, in welches die N-alkylierte Aminosäure via Säurechlorid eingebaut wurde, zeigen.

Da die Abspaltbedingungen für die DNBS-Gruppe mit der Fmoc-Strategie kompatibel sind, kann man den Einbau sterisch stark gehinderter Aminosäuren über DNBS-Aminosäurechloride unter Nutzung der vorrangig verwendeten Fmoc-Strategie durchführen. Wir demonstrierten diese Kombination anhand der Synthese eines biologisch aktiven Peptides, in welches wir im Rahmen von Struktur-Wirkungs-Untersuchungen die Sequenz Ala-MeAib-MeAib-Aib einbauten. Während der TFA-Abspaltung des Peptides vom Harz kam es zu einer partiellen Spaltung der Peptidbindung zwischen Ala und MeAib, was auf eine prinzipielle Labilität von AA-MeAib-Bindungen hinweist (AA = nicht N-alkyliert). Als eine weitere Nebenreaktion bei der Abspaltung der DNBS-Schutzgruppe an der festen Phase wurde ein Austausch der Nitrogruppe in para-Position des Benzenrestes durch das angreifende Thiolat beobachtet. Diese Reaktion tritt insbesondere in polaren Lösungsmitteln wie DMF auf, wird aber in unpolaren Lösungsmitteln wie DCM weitgehend unterdrückt. Weiterhin haben unsere Untersuchungen gezeigt, daß die DNBS-Schutzgruppe für eine durchgängige Anwendung in der Festphasensynthese nicht vorteilhaft ist, da für Peptide, die zur Selbstassoziation neigen, dieser Assoziationseffekt und damit Syntheseprobleme verstärkt werden.

- Untersuchungen der Stereomutation

Von uns durchgeführte Untersuchungen zum Erhalt der chiralen Integrität zeigten, daß die Kupplungen von DNBS-Val-Cl an Ala-NA ohne Stereomutation verliefen.

4 Ausblick

Trotz der Leistungsfähigkeit der modernen Peptidchemie bestehen für die Herstellung von Peptiden, die sterisch stark gehinderte Aminosäurereste enthalten oder zu sequenzabhängiger Assoziation neigen, erhebliche Syntheseprobleme. Auch wenn die Verwendung der untersuchten Sulfonylschutzgruppen für Aminosäurechloride wegen der Instabilität gegenüber notwendigen Hilfsbasen und dem beobachteten Assoziationseffekten während der Festphasensynthese mit Einschränkungen behaftet ist, gelang es die Kupplungsprobleme extrem gehinderter, bisher nicht zugänglicher Systeme zu überwinden.

Die aufgezeigte Möglichkeit für den Einbau von Aminosäuren, welche die konformationelle Freiheit in Peptidsequenzen stark einschränken, eröffnet neue Perspektiven beim Design von Wirkstoffen und für Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Weiterführende Untersuchungen zum Einfluß von Aib-MeAib bzw. AA-MeAib-Sequenzen auf die Konformation von Peptiden und zur beobachteten Säurelabilität von AA-MeAib-Sequenzen sind erforderlich.

5 Experimenteller Teil

5.1 Geräte

Die analytischen HPLC-Untersuchungen aller synthetisierten Peptide und Aminosäuren wurden an einer Shimatzu SPD-6A (Anlage bestehend aus: LC-6A Pumpeinheit, SCL-6A Systemcontroller, UC-6A Autoinjektor, CBM Communication Bus Modul) bzw. an einer Anlage der Firma Jasko (Anlage bestehend aus: PU-980 Pumpanlage, AS 950 Autoinjektor, Detektor UV 975 und einem Waters 474 Fluoreszenzdetektor) durchgeführt. Als Säulenmaterial benutzten wir eine Polyencap A300, 250×4 mm Säule (Bischoff Analysentechnik GmbH) sowie eine Eurosphere C-18, 5µm. Die Flußrate betrug in allen Fällen 1ml/min, λ=220 , 250nm.

Die präparative Reinigung und Isolierung der Peptide erfolgte mittels HPLC unter Verwendung einer 20µm Polyencap A300-Säule (Bischoff Analysentechnik GmbH) an einem Shimatzu LC-8A-System (Anlage bestehend aus: LC-8A-Pumpen, SCLC-8A-Kontrolleinheit, SPD-6A-UV Detektor, Injektionseinheit und einer C-R4A Aufnahmeeinheit) bei einer Flußrate von 10 ml/min. Die Detektion der Peptide erfolgte bei 220nm.

Zur Aufnahme der IR-Spektren der synthetisierten geschützten Aminosäuren und den aus diesen hergestellten Aminosäurefluoriden und -chloriden stand ein Impact 400 (Nicolet) zur Verfügung.

Für die massenspektrometrischen Untersuchungen der Peptide und geschützten Aminosäuren wurde ein TSQ 700, Finnigan MAT 95 Gerät (sample flow 1µl/min Methanol/Wasser 1:1, 3-5 kV, 80°C) bzw. ein MALDI-TOF Instrument (Kratos) verwendet. Für die LC-MS-Untersuchungen wurde zusätzlich ein Applied Biosystem mit einem 785A Detektor und einer 140B Pumpeinheit genutzt. Als Ssäulenmaterial wurde eine Vydag C18 300A, 150×1, 5µm genutzt. Die Flußrate betrug 30µl/min, λ=220nm.

Die Kupplungsausbeuten bei den manuellen Peptidsynthesen wurden mit einem UV-Spektrometer LKB Ultrospec II bestimmt.

Die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten erfolgte an einem Perkin Elmer UV/VIS Spektrometer Lambda 9.

Die NMR-Untersuchungen wurden an einem Varian Gemini 200 Instrument bzw. an einem Bruker DMX 600 durchgeführt.

Die Untersuchungen zur chiralen Integrität der Aminosäuren mittels GC-MS wurden an einem Gerät der Firma Fisons Instruments (TRIO 1000) durchgeführt. Dabei wurde eine Chirasil-Val-Säule (50 m, 0,25 µm, Machery Nagel) verwendet.

Die CD-Messungen wurden an einem J720 Spektrometer (Jasco, Japan) durchgeführt.

Für die Bestimmung der Schmelzpunkte kam ein MEL-TEMP II (Laboratory Devices, USA) zum Einsatz (Schmelzpunkte nicht korrigiert).

Elementaranalysen wurden an einem Elemental Analyser 1106 der Firma Carlo Erba, Mailand durchgeführt.

Für dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurde mit Kieselgel beschichtetes Glas der Firma Merck verwendet. Meistgenutztes Laufmittel war

Chloroform/Methanol/Eisessig (9/1/0,1).

5.2 Chemikalien

Fluka: Piperidin, DIEA, Cyanurfluorid, (Diethylamino)schwefeltrifluorid (DAST), n-Hexan, DMF, Pyridin (getrocknet über Molekularsieb Baker 3A), Collidin, $SOCl_2$, TFE, BSA, Mercaptopropionsäure, Trityl-MeOH, Tritylamin, DNBS-Cl

Baker: DCM (Destillation über P_4O_{10} und Na_2CO_3), Essigsäureanhydrid, Trifluoressigsäure, Ethanol, Methanol (getrocknet durch Reaktion mit Magnesium und anschließender Destillation), Diethylether, Chloroform (getrocknet über Molekularsieb Baker 3A), Toluen, Acetonitril

Novabiochem: o-Cl-Tritylharz; TMSO, H-Val-OBzl, TFMSA

Merck: Magnesiumsulfat, Natriumchlorid, Kieselgel 60, 0,04-0,06 µm Korngröße

Bachem: MeAib-OH, β-Ala-Naphthylamid

Aldrich: o- und p-NBS-Cl, AIB-OH, Dimethoxybenzaldehyd

Ferak Berlin: β-Mercaptoethanol

Pbf-Chlorid wurde freundlicherweise von Prof. L. A. Carpino zur Verfügung gestellt.

5.3 Synthesen der Aminosäurederivate

5.3.1 Synthese der Aminosäuremethylester

Zu 7,5 ml Methanol (-40°C) wurde vorsichtig unter Rühren 10 mmol Thionylchlorid getropft. Nach Erwärmung auf Raumtemperatur wurden 5 mmol Aminosäure zum Reaktionsgemisch gegeben und über Nacht gerührt. Das überschüssige Thionylchlorid wurde durch mehrmaliges Abrotieren mit Methanol entfernt. Der Ester wurde anschließend in wenig Methanol gelöst und mit trockenem n-Hexan versetzt. Nach Aufbewahrung im Tiefkühlschrank bildete sich ein weißer Feststoff.

HCl×Aib-OMe:

weißer Feststoff

Ausbeute: 88,78%

Fp.: 188-190°C

IR (KBr): ν(C=O): 1754 cm^{-1}

HCl×MeAib-OMe:

weißer Feststoff

Ausbeute: 71,2%

Fp.: Zersetzung zwischen 130-150°C

IR (KBr): ν(C=O): 1746 cm^{-1}

MS: [M+H]: 132; ber.: 131

5.3.2 Synthese von Referenzsubstanzen

Tosylamid [112]

0,01 mmol Arensulfonylchlorid (2 g) wurden mit einem Überschuß einer konzentrierten wäßrigen Ammoniaklösung versetzt. Die Lösung wurde nach 10 Minuten in 550 ml Wasser gegeben und mit verdünnter Salzsäure angesäuert. Das erhaltene Reaktionsprodukt wurde abgesaugt und mit Wasser neutral gewaschen. Umkristallisation erfolgte aus Ethanol.

Tosylamid:

weißer Feststoff

Ausbeute: 74%

Fp.: 132°C

IR (KBr): $\nu(NH_2\text{-}SO_2)$ 1576 cm^{-1}; $\nu(SO_2)$ 1332, 1159 cm^{-1}

MS: [M+H]: 172; ber.:171

o-NBS-Amid:

gelber Feststoff

Ausbeute: 62%

Fp.: 182-185°C

IR (KBr): $\nu(NH_2\text{-}SO_2)$ 1542 cm^{-1}; $\nu(SO_2)$ 1338, 1161 cm^{-1}

Symmetrische Anhydride von geschützten Aminosäuren

Für die Herstellung des Anhydrides von RSO_2-AA-OH wurde nach einer Vorschrift von BENOITON [113] für Fmoc-Aminosäureanhydride gearbeitet. Es wurden 0,135 mmol RSO_2-AA-OH in 2,7 ml Essigester gelöst und mit 0,099 mmol Dicyclohexylcarbodiimid (20,4 mg) versetzt. Die Lösung wurde anschließend noch 2,5 Stunden gerührt und dann auf –20°C abgekühlt. Nach ca. 2h wurde der ausgefallenen Harnstoff in der Kälte abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in trockenem DCM aufgenommen und über Nacht nochmals auf –20°C abgekühlt. Das entstandene Produkt wurde filtriert und mit trockenem n-Hexan gewaschen.

DNBS-Aib-Anhydrid:

weißer Feststoff

Ausbeute: 61%

IR (KBr): ν(C-O-C) 1825, 1729 cm^{-1}, $\nu(SO_2)$ 1350, 1173 cm^{-1}

DNBS-MeAib-Anhydrid:

weißer Feststoff

Ausbeute: 43%

IR (KBr): ν(C-O-C) 1821, 1751 cm^{-1}, $\nu(SO_2)$ 1348, 1147 cm^{-1}

Pbf-MeAib-Anhydrid:

weißer Feststoff

Ausbeute: 65%

Fp.: 91-95°C

IR (KBr): ν(C-O-C) 1820, 1751 cm^{-1},
ν(SO_2) 1318, 1136 cm^{-1}

MS: [M+H]: 721; ber.: 720

5.3.3 Tosyl- und Pbf-Aminosäuren nach dem Schotten-Baumann-Verfahren

Die entsprechende Aminosäure wurde zu einer basischen (siehe Tab. 9) Lösung gegeben. Unter Rühren wurde das gelöste Arensulfonylchlorid anschließend portionsweise zum Reaktionsansatz gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur einige Stunden geschüttelt/gerührt.

Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ether abgetrennt bzw. der Reaktionsansatz mit Ether extrahiert, um überschüssige Reaktanten zu entfernen. Die wäßrige Phase wurde dann mit 50 %iger HCl auf pH 3-4 gebracht. Dabei fiel das gewünschte Produkt aus. Es wurde dann noch 2h gerührt und durch Filtration isoliert.

Tab. 9: Reaktionsbedingungen für die Herstellung der Tosyl- und Pbf-Aminosäuren

	Menge	**Base**	**org. LM**	**$T_{Reakt.}$**	**Reinigung**
Tosyl-AS	0,01 mol	20 ml 1N NaOH	Ether	3-4 h	Umkristallisation aus 60% EtOH
Pbf-AS	0,018 mol	20 ml 4,5M Na_2CO_3	Dioxan	12 h	Flash-Chromatographie; Kieselgel 60, EE/n-Hexan/HAc 95/5/1

Tos-Ala:

weißer Feststoff

Ausbeute: 47%

Fp.: 130-133°C

IR (KBr): ν(C=O): 1712 cm^{-1},
ν(SO_2): 1343, 1150 cm^{-1}

MS: [M-H]: 242; ber.: 243

Tos-Aib:

weißer Feststoff

Ausbeute: 31%

Fp.: 145-147°C

IR(KBr): ν(C=O): 1710 cm^{-1},
ν(SO_2): 1323, 1152 cm^{-1}

MS: [M-H]: 256; ber.: 257

Pbf-Aib-OH:

weiße Kristalle

Ausbeute: 30%

Fp.: 195-200°C

IR (KBr): ν(C=O): 1707 cm^{-1},
ν(SO_2): 1312, 1128 cm^{-1}

Pbf-MeAib-OH:

weiße Kristalle

Ausbeute: 31,7%

Fp.: 140-143°C

IR (KBr): ν(C=O): 1709 cm^{-1},
ν(SO2): 1318, 1126 cm^{-1}

MS: [M-H]: 354; ber.: 355

Elementaranalyse für $C_{17}H_{25}NO_5S$:

ber.: C: 57,46%; H: 7,04%; N: 3,94%

gef.: C: 55,97%; H: 6,82%; N: 3,80%

1H-NMR: (ppm, MeOD), δ 1.31 (s,6,AS-Me_2), 1.49 (s,6,Pbf-Me_2), 2.09, 2.47, 2.56 3× (s, 3, Ar-Me), 3.01 (s, 2, CH_2)

MS: [M+H]: 370; [M-H]: 368; ber. 369

Elementaranalyse für $C_{18}H_{27}NO_5S$:

ber.: C: 58, 45%; H: 7,32%; N: 3,79%

gef.: C: 58,53%; H: 7,14%; N: 3,60%

^{1}H-NMR: (ppm, MeOD), δ 1.48 (s,6,AS-Me_2), 1.49 (s,6,Pbf-Me_2), 2.1, 2.49, 2.55 3× (s, 3, Ar-Me), 2.82 (s, 3, N-Me), 3.03 (s, 2, CH_2)

5.3.4 NBS- und DNBS-Aminosäuren

5 mmol Aminosäure wurden in 15 ml Acetonitril suspendiert. Zu dieser Mischung wurde 10,8 mmol BSA (2,63 ml) gegeben und bei 50-60°C bis zur vollständigen Lösung der Aminosäure gerührt. Nach Abkühlung des Reaktionsgemisches wurden 4,9 mmol Arensulfonylchlorid zum Ansatz gegeben und bei Raumtemperatur bis zur Beendigung der Reaktion (DC-Kontrolle – Laufmittel: $CHCl_3$/MeOH/HAc=9/1/0,1) gerührt. Nach Abschluß der Reaktion wurde die Lösung eingeengt und in Essigester aufgenommen. Die organische Phase wurde 3× mit 50%iger HCl extrahiert und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Die so erhaltene Lösung wurde eingeengt, die Arensulfonyl-geschützte Aminosäure kristallisierte aus trockenem EE/n-Hexan aus. Die Reinigung der Substanzen erfolgte durch Umkristallisation bzw. Flash-Chromatographie (Laufmittel: EE/HAc=9,85/0,15). Das Laufmittel wurde unter Zugabe von Toluen abgezogen, um die Essigsäure zu entfernen.

o-NBS-Ala-OH:

Hellgelber Feststoff

Ausbeute: 91,2%

Fp.: 153-159°C

IR (KBr): ν(C=O) 1720 cm^{-1}; ν(SO_2) 1350, 1172 cm^{-1}

MS: [M-H]: 272; ber.: 273

Elementaranalyse für $C_9H_{10}N_2O_6S$:

ber.: C: 39,42%; H: 3,65%; N: 10,2%

gef.: C: 39,60%; H: 3,57%; N: 9,99%

o-NBS-Val-OH:

Hellgelber Feststoff

Ausbeute: 88.5%

Fp.: 112-114°C

IR (KBr): ν(C=O) 1714 cm^{-1}; ν(SO_2) 1360, 1167 cm^{-1}

MS: [M-H]: 301; ber.: 302

o-NBS-Aib-OH:

Hellgelber Feststoff

o-NBS-MeAib-OH:

Hellgelber Feststoff

Ausbeute: 93,6%

Fp.: 175-178°C

IR (KBr): ν(C=O) 1706 cm^{-1}; $\nu(SO_2)$ 1332, 1164 cm^{-1}

MS: [M-H]: 287; ber.: 288

Elementaranalyse für $C_{10}H_{12}N_2O_6S$:

ber.: C: 41,66%; H: 4,16%; N: 9,7%

gef.: C: 41,53%; H: 4,07%; N: 9,33%

p-NBS-Aib-OH:

Hellgelber Feststoff

Ausbeute: 93%

Fp.: 166-169°C

IR (KBr): ν(C=O) 1711 cm^{-1}; $\nu(SO_2)$ 1338, 1169 cm^{-1}

MS: [M-H]: 287; ber.: 288

DNBS-Val-OH:

Gelber Feststoff

Ausbeute: 93,6%

Fp.: 139-142°C

IR (KBr): ν(C=O) 1723 cm^{-1}; $\nu(SO_2)$ 1354, 1172 cm^{-1}

MS: [M-H]: 346; ber.: 347

^{1}H-NMR: (ppm, CD_3OD): δ 0.91, 0.94; 0.99, 1.02 2× (d, 3, CH_3), 2.2 (qqd, 1, C-H), 4.08, 4.11 (d, 1, N-CH), 8.38, 8.40; 8.55, 8.61 2× (d, 1, Ar-H), 8.70 (s, 1, Ar(NO_2)-H)

^{13}C-NMR: (ppm, CD_3OD), δ 18.1 (1, CH_3), 20.0 (2, CH_3), 32.4 (1, CH), 63. 7 (1, CHR), 121.4, 128.0, 133.8, 140.6, 149.6, 151.6 (6, Ar-C), 174.1 (C=O)

Ausbeute: 73%

Fp.: 145-148°C

IR (KBr): ν(C=O) 1728 cm-1; $\nu(SO_2)$ 1341, 1167 cm^{-1}

MS: [M-H]: 301; ber.: 302

Elementaranalyse für $C_{11}H_{14}N_2O_6S$:

ber.: C: 43,7%; H: 4,63%; N: 9,27%

gef.: C: 43,69%; H: 4,54%; N: 8,98%

p-NBS-MeAib-OH:

Hellgelber Feststoff

Ausbeute: 58%

Fp.: 180-184°C

IR (KBr): ν(C=O) 1715 cm^{-1}; $\nu(SO_2)$ 1353, 1144 cm^{-1}

MS: [M-H]: 301; ber.: 302

DNBS-Aib-OH:

Hellgelber Feststoff

Ausbeute: 89,7%

Fp.: 183-185°C

IR (KBr): ν(C=O) 1711 cm^{-1}; $\nu(SO_2)$ 1357, 1169 cm^{-1}

MS: [M-H]: 332; ber.: 333

^{1}H-NMR: (ppm, CD_3OD), δ 1.82 (s, 6, Me_2), 8.32, 8.36 (d, 1, Ar-H), 8.56, 8.60 (d, 1, Ar-H), 8.71 (s, 1, Ar(NO_2)-H)

^{13}C-NMR: (ppm, CD_3OD), δ 27.1 (2, CH_3), 63.7 (1, CMe_2), 121.6, 128.1, 133.3, 142.7, 149.5, 151.4 (6, Ar-C), 177.2 (C=O)

Elementaranalyse für $C_9H_{10}N_2O_6S$:

ber.: C: 36,03%; H: 3,3%; N: 12,61%

gef.: C: 38,13%; H: 3,49%; N:11,80%

DNBS-MeAib-OH:

Hellgelber Feststoff

Ausbeute: 50,6%

Fp.: 178-185°C

IR (KBr): ν(C=O) 1709 cm^{-1};
$\nu(SO_2)$ 1349, 1169 cm^{-1}

MS: [M-H]: 346; ber.: 347

^{1}H-NMR: (ppm, CD_3OD), δ 1.5
(s, 6, Me_2), 3.00 (s, 3, N-CH_3),
8.32, 8.36; 8.56, 8.60 2×
(d, 1, Ar-H), 8.71
(s, 1, Ar(NO_2)-H)

^{13}C-NMR: (ppm, CD_3OD): δ 26.7
(2, CH_3), 33.4 (3, N-CH_3),
66.2 (1, CMe_2), 121.3, 127.8,
133.3, 141.2, 150.2, 151.5
(6, Ar-C), 177.1 (C=O)

Elementaranalyse für $C_9H_{10}N_2O_6S$:

ber.: C: 38,04%; H: 3,74%; N: 12,1%

gef.: C: 38,51%; H: 3,78%; N:11,62%

5.3.5 Arensulfonyl-geschützte Aminosäurefluoride

3 mmol RSO_2-Aminosäure wurden in 20 ml trockenem DCM suspendiert und mit 3 mmol (0,25 ml) trockenem Pyridin versetzt. Unter Rühren wurden dann langsam 6 mmol (0,505 ml) Cyanurfluorid zugetropft und die Lösung 2h bei Raumtemperatur gerührt. Dabei fiel Cyanursäure aus. Nach Abschluß der Reaktion wurde die Lösung mit zerstoßenem Eis extrahiert, um überschüssiges Cyanurfluorid zu hydrolysieren. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel bis auf einen kleinen Rest am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhält das Aminosäurefluorid aus DCM/n-Hexan. Die Kristallisation des Aminosäurefluorides kann durch Abkühlung auf –18°C (Tiefkühlschrank) unterstützt werden.

Für die Lagerung empfiehlt sich eine Aufbewahrung im Exsikkator über Phosphorpentoxid.

Tos-Ala-F:

Hellroter Feststoff

Ausbeute: 81,6%

Tos-Aib-F:

Hellroter Feststoff

Ausbeute: 74,4%

Fp.: 85°C

IR (KBr): ν(C=O): 1845 cm^{-1}, $\nu(SO_2)$: 1339, 1156 cm^{-1}

Fp.: 118°C

IR (KBr): ν(C=O): 1846 cm^{-1}, $\nu(SO_2)$: 1319, 1147 cm^{-1}

Pbf- Aib-F:

Weiße Kristalle

Ausbeute: 40%

IR (KBr): ν(C=O): 1841cm^{-1}, $\nu(SO_2)$: 1313, 1132cm^{-1}

Pbf-MeAib-F:

Weiße Kristalle

Ausbeute: 46%

IR (KBr): ν(C=O): 1830cm^{-1}, $\nu(SO_2)$: 1302, 1133cm^{-1}

^{1}H-NMR: ($CDCl_3$) δ 1.47 (s, 6, Pbf-Me_2), 1.57 (s, 6, AS-Me_2), 2.11, 2.47, 2.52 3× (s, 3, Me-Ar), 2.72 (s, 3, N-Me), 3.04 (s, 2, CH_2)

5.3.6 Arensulfonyl-geschützte Aminosäurechloride

500 mg Arensulfonyl-geschützte Aminosäure wurden in 2,5 ml Dichlormethan in einem 50 ml Kolben suspendiert. Unter Rühren wurden dann 1 ml Thionylchlorid zur Suspension gegeben und das Reaktionsgemisch ca. 45 Minuten unter Rückfluß erhitzt (45°C) bis sich die Aminosäure vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das überschüssige Thionylchlorid 3× mit trockenem Dichlormethan abgezogen. Das Arensulfonyl-geschützte Aminosäurechlorid kristallisierte aus trockenem DCM/n-Hexan bzw. trockenem Ether/n-Hexan aus. Die Kristallisation des Aminosäurechlorides kann durch Abkühlung auf –18°C (Tiefkühlschrank) unterstützt werden.

Zur Verbesserung der Kristallisation wurde bei der Herstellung der DNBS-Aminosäurechloride zusätzlich noch 0,1 Äquivalent Collidin zur Reaktionslösung gegeben.

Tos-Ala-Cl:

Hellgelbe Kristalle

Ausbeute: 88,6%

Fp.: 103°C

IR (KBr): ν(C=O): 1785 cm^{-1}, $\nu(SO_2)$: 1329, 1152 cm^{-1}

Tos-Aib-Cl:

Hellgelbe Kristalle

Ausbeute: 87,8%

Fp: 115°C

IR (KBr): ν(C=O): 1803 cm^{-1}, $\nu(SO_2)$: 1325, 1149 cm^{-1}

Pbf-Aib-Cl:

Hellbraune Kristalle

Ausbeute: 74,5%

Fp.: 115-120°C

Pbf-MeAib-Cl:

Hellbraune Kristalle

Ausbeute: 72,1%

IR (KBr): ν(C=O): 1801 cm^{-1}, ν(SO_2): 1314, 1133 cm^{-1}

^{1}H-NMR: (ppm $CDCl_3$), δ 1.41 (s, 6, Pbf-Me_2), 1.47 (s, 6, Me_2), 2.11, 2.48, 2.56 3× (s, 3, Ar-Me), 2.97 (s, 2, CH_2)

^{13}C-NMR: (ppm, $CDCl_3$) δ 13.00, 18.38, 19.79 3× (1, Ar-Me), 25.49 (2, Aib-Me_2), 28.99 (2, Pbf-Me_2), 43.58 (1, Pbf-CH_2), 66.51 (1, C-α), 87.47 (1, Pbf-CMe_2), 118.66, 125.83, 130.86, 133.87, 139.46, 160.42 (6, Ar-C), 178.24 (C=O)

IR (KBr): ν(C=O): 1808 cm^{-1}, ν(SO_2): 1319, 1126 cm^{-1}

^{1}H-NMR: (ppm, $CDCl_3$), δ 1.48 (s, 6, Pbf-Me_2), 1.61 (s, 6, AS-Me_2), 2.11, 2.49, 2.55 3× (s, 3, Ar-Me), 2.89 (s, 3, N-Me), 2,97 (s, 2, CH_2)

^{13}C-NMR: (ppm, $CDCl_3$) δ 13.18, 18.09, 19.98 3×(1, Ar-Me), 24.89 (2, AS-Me_2), 29.24 (2, Pbf-Me_2), 34.30 (1, N-Me), 43.86 (1, Pbf-CH_2), 72.85 (1, C-α), 87.66 (1, Pbf-CMe_2), 118.84, 126.03, 130.74, 135.12, 141.03, 160.72 (6, Ar-C), 177.59 (1, C=O)

o-NBS-Aib-Cl:

Hellbrauner Feststoff

Ausbeute: 58,8%

Fp.: 103-105°C

IR (KBr): ν(C=O) 1805 cm^{-1}; ν(SO_2) 1330, 1159 cm^{-1}

^{1}H-NMR: (ppm, $CDCl_3$): δ 1.64 (s, 6, Me_2), 5.97 (s, 1, N-H), 7.78 (d, 2, Ar-H), 7.95, 8.14 2× (dd, 1, Ar-H)

^{13}C-NMR: (ppm, $CDCl_3$): δ 26.82 (2, Me_2), 67.67 (1, C-Me), 126.25, 130.88, 133.96, 134.48, 136.20, 148.16 (6, Ar-C), 177.05 (C=O)

o-NBS-MeAib-Cl:

Hellbrauner Feststoff

Ausbeute: 82,6%

Fp.: 119-122°C

IR (KBr): ν(C=O) 1808 cm^{-1}; ν(SO_2) 1341, 1149 cm^{-1}

^{1}H-NMR: (ppm, $CDCl_3$): δ 1.64 (s, 6, Me_2), 3.03 (s, 1, N-Me), 7.66, 8.14 2× (dd, 1, Ar-H), 7.71 (d, 2, Ar-H)

^{13}C-NMR: (ppm, $CDCl_3$): δ 25.85 (2, Me_2), 33.89 (1, N-Me), 71.63 (1, C-Me), 125.06, 130.69, 132.73, 134.56, 134.68, 149.08 (6, Ar-C), 176.61 (C=O)

p-NBS-MeAib-Cl:

Hellbrauner Feststoff

Ausbeute: 70,7%

Fp.: 116-121°C

IR (KBr): ν(C=O) 1802 cm^{-1}; ν(SO_2) 1347, 1164 cm^{-1}

DNBS-Val-Cl:

Hellgelbe Kristalle

Ausbeute: 91,2%

Fp.: 78-80°C

IR (KBr): ν(C=O) 1797 cm^{-1}; ν(SO_2) 1348, 1171 cm^{-1}

DNBS-Aib-Cl:

Hellgelbe Kristalle

Ausbeute: 99,1%

IR (KBr): ν(C=O) 1791 cm^{-1}; $\nu(SO_2)$ 1350, 1168 cm^{-1}

^{1}H-NMR: (ppm, CH_2Cl_2): δ 1.65 (s, 6, Me_2), 8.35, 8.40 (d, 1, Ar-H), 8.60, 8.65 (d, 1, Ar-H), 8.70 (s, 1, Ar(NO_2)-H)

^{13}C-NMR: (ppm, CH_2Cl_2): δ 26.22 (2, CH_3), 67.81 (1, CMe_2), 121.33, 128.03, 132.34, 140.58, 148.00, 150.25 (6, Ar-C), 177.1 (C=O)

DNBS—MeAib-Cl:

Hellgelbe Kristalle

Ausbeute: 100%

IR (KBr): ν(C=O) 1791 cm^{-1}; $\nu(SO_2)$ 1345, 1146 cm^{-1}

5.4 Kupplungen der Arensulfonylaminosäurehalogenide

5.4.1 RSO_2-Aib/MeAib-X an Aib-OMe

0,1 mmol Aib-OMe×HCl in 600 µl DCM wurde unter Rühren mit 0,2 mmol Base versetzt. Anschließend wurde zu der so erhaltenen Lösung 0,1 mmol RSO_2-Aminosäurehalogenid gegeben und noch 15 Minuten gerührt (Tab. 10).

Tab. 10: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten der Kupplung von RSO_2-Aib/MeAib-X an Aib-OMe

AS-X	NH-R	LM	Base	Ausbeute
Tos-Aib-F; 0,1 mmol = 25,9 mg	Aib-OMe; 0,1 mmol = 15,2 mg	DCM 600 µl	DIEA; 0,3 mmol = 51,3 µl	88%
Tos-Aib-F; 0,1 mmol = 25,9 mg	Aib-OMe; 0,1 mmol = 15,2 mg	DCM 600 µl	DIEA; 0,2 mmol = 34,2 µl	88%
Tos-Aib-Cl; 0,1 mmol = 27,5 mg	Aib-OMe; 0,1 mmol = 15,2 mg	DCM 600 µl	DIEA; 0,3 mmol = 51,3 µl	81%
Tos-Aib-Cl; 0,1 mmol = 27,5 mg	Aib-OMe; 0,1 mmol = 15,2 mg	DCM 600 µl	DIEA; 0,2 mmol = 34,2 µl	95%
Tos-Aib-Cl; 0,05 mmol = 13,7 mg	Aib-OMe; 0,05 mmol = 7,6mg	DCM 300 µl	BSA; 0,1 mmol = 24,4 µl	84%

AS-X	NH-R	LM	Base	Ausbeute
Pbf-Aib-F; 0,1 mmol = 35,7 mg	Aib-OMe; 0,1mol = 5,2 mg	DCM 600 µl	DIEA; 0,2 mmol = 34,2 µl	83%
Pbf-MeAib-F; 0,1 mmol = 37,1 mg	Aib-OMe; 0,1mol = 5,2 mg	DCM 600 µl	DIEA; 0,2 mmol = 34,2 µl	81%
Pbf-Aib-Cl; 0,1 mmol = 37,3 mg	Aib-OMe; 0,1mol = 5,2 mg	DCM 600 µl	DIEA; 0,2 mmol = 34,2 µl	90%
Pbf-Aib-Cl; 0,05 mmol = 18,7 mg	Aib-OMe; 0,1mol = 5,2 mg	DCM 300 µl	BSA; 0,1 mmol = 24,4 µl	83%
Pbf-MeAib-Cl; 0,1 mmol = 38,7 mg	Aib-OMe; 0,1mol = 5,2 mg	DCM 600 µl	DIEA; 0,2 mmol = 34,2 µl	94%

Pbf-MeAib-Aib-OMe:

Weißer Feststoff

IR (KBr): ν(C-OMe) 1746 cm^{-1}, ν(N-CO) 1683 cm^{-1}, ν(SO_2) 1306, 1152 cm^{-1}

MS: [M+H] 469, ber.:468

5.4.2 RSO_2-Aib/MeAib-X an MeAib-OMe

MeAib-OMe×HCl wurde in Toluen gelöst. Die Freisetzung des Hydrochlorides erfolgte unter Zugabe von 1eq. DIEA. Die Lösung wurde kurz gerührt und anschließend filtriert. Das Filtrat wurde dann unter Rühren zu RSO_2-Aib-Cl (Tab. 11) bzw. RSO_2-MeAib-Cl (Tab. 12) gegeben. Die Reaktionszeit betrug 15 Minuten bzw. 3h.

In einigen Fällen wurde für die Kupplung der freie Ester eingesetzt. Dieser wurde durch Versetzen mit festem K_2CO_3 und anschließender Extraktion mit trockenem Ether gewonnen. Der Ether wurde bei Raumtemperatur abrotiert. (Vorsicht: der freie Ester ist sehr flüchtig!) Man erhält MeAib-OMe als ein Öl.

Tab. 11: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten der Kupplung von RSO_2-Aib-X an MeAib-OMe

AS-X	NH-R	LM	Base	Ausbeute
Tos-Aib-F; 0,1 mmol = 25,9 mg	MeAib-OMe; ≈0,1mol	DCM 600 µl	_____	2%
Tos-Aib-Cl; 0,1 mmol = 27,5 mg	MeAib-OMe; ≈0,1mol	DCM 600 µl	_____	45%
Tos-Aib-Cl; 0,05 mmol = 13,8 mg	MeAib-OMe×HCl; 0,1 mmol = 16,7 mg	Toluen; 600 µl	DIEA; 0,1 mmol = 17,1 µl	20%
Tos-Aib-Cl; 0,05 mmol = 13,8 mg	MeAib-OMe×HCl; 0,1 mmol = 16,7 mg	Toluen; 300 µl	DIEA; 0,1 mmol = 17,1 µl	66%

AS-X	NH-R	LM	Base	Ausbeute
Tos-Aib-Cl; 0,05 mmol = 13,8 mg	MeAib-OMe×HCl; 0,1 mmol = 16,7 mg	DCM; 300 µl	DIEA; 0,1 mmol = 17,1 µl	18%
Tos-Aib-Cl; 0,05 mmol = 13,8 mg	MeAib-OMe×HCl; 0,2 mmol = 33,4 mg	Toluen; 300 µl	DIEA; 0,2 mmol = 34,2 µl	71%
Pbf-Aib-Cl; 0,05 mmol = 13,8 mg	MeAib-OMe×HCl; 0,2 mmol = 33,4 mg	Toluen; 300 µl	DIEA; 0,2 mmol = 34,2 µl	60%
Pbf-Aib-Cl; 0,05 mmol = 13,8 mg	MeAib-OMe×HCl; 0,1 mmol = 16,7 mg	Toluen; 300 µl	DIEA; 0,1 mmol = 17,1 µl BSA; 0,05 mmol = 12,2 µl	56%
o-NBS-Aib-Cl; 0,05 mmol = 15,3 mg	MeAib-OMe×HCl; 0,1 mmol = 16,7 mg	Toluen* 300 µl	DIEA; 0,1 mmol = 17,1 µl BSA; 0,05 mmol = 12,2 µl	32%
o-NBS-Aib-Cl; 0,05 mmol = 15,3 mg	MeAib-OMe×HCl; 0,1 mmol = 16,7 mg	Toluen; 300 µl	DIEA; 0,1 mmol = 17,1 µl BSA; 0,05 mmol = 12,2 µl	51%
DNBS-Aib-Cl; 0,05 mmol = 17,6 mg	MeAib-OMe; 0,1 mmol = 16,7 mg	Toluen; 300 µl	BSA; 0,15 mmol = 36,7 µl	36%
DNBS-Aib-Cl; 0,05 mmol = 17,6 mg	MeAib-OMe; 0,1 mmol = 16,7 mg	Toluen; 300 µl	DIEA; 0,1 mmol = 17,1 µl	2%
DNBS-Aib-Cl; 0,1 mmol = 35,1 mg	MeAib-OMe; ≈0,3 mmol = 50 mg	Toluen; 600 µl	_____	66%
DNBS-Aib-Cl; 0,05 mmol = 17,6 mg	MeAib-OMe; 0,1 mmol = 13,1 mg	Toluen; 300 µl	_____	55%
DNBS-Aib-Cl; 0,05 mmol = 17,6 mg	MeAib-OMe; 0,05 mmol = 6,6 mg	Toluen; 300 µl	BSA; 0,05 mmol = 12,1 µl	54%

Tos-Aib-MeAib-OMe:

Weißer Feststoff

IR (KBr): ν(C=O): 1740 cm^{-1}, ν(CO-N): 1612 cm^{-1}, ν(SO_2): 1328, 1157 cm^{-1}

MS: [M+H]: 371; ber.:370

Pbf-Aib-MeAib-OMe:

Weißer Feststoff

IR (KBr): ν(C=O):1717 cm^{-1}, ν(CO-N): 1632 cm^{-1}, ν(SO_2): 1322, 1135 cm^{-1}

MS: [M+H]: 469; ber.:468

Elementaranalyse für $C_{23}H_{36}N_2O_6S$:

ber.: C: 58,97; H: 7,69; N: 5,98

gef.: C: 58,90; H: 7,47; N: 5,99

^{1}H-NMR: (ppm, CD_2Cl_2): δ 1.31 (s, 6, MeAib-Me_2), 1.39 (s, 6, Aib-Me_2), 1.46 (s, 6, Pbf-Me_2), 2.1, 2.43, 2.52 3× (s, 3, Me-Ar), 2.98 (s, 2, CH_2), 3.23 (s, 3, N-Me), 3.58 (s, 3, O-Me)

o-NBS-Aib-MeAib-OMe:

Weißer Feststoff

Ausbeute laut HPLC: 52%

MS: [M+H]: 402; ber.: 401

DNBS-Aib-MeAib-OMe:

Weißer Feststoff

MS: [M+H]: 447; ber.: 446

Tab. 12: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten der Kupplung von RSO_2-MeAib-X an MeAib-OMe

AS-X	NH-R	LM	Base	Ausbeute
Pbf-MeAib-Cl; 0,05 mmol = 19,4 mg	MeAib-OMe×HCl; 0,2 mmol = 33,4 mg	Toluen; 300 µl	DIEA; 0,2 mmol = 34,2 µl	51%
Pbf-MeAib-Cl; 0,15 mmol = 58,1 mg	MeAib-OMe×HCl; 0,6 mmol = 100,2 mg	Toluen; 900 µl	DIEA; 0,6 mmol = 77,6 µl	63%
Pbf-MeAib-Cl; 0,05 mmol = 19,4 mg	MeAib-OMe×HCl; 0,1 mmol = 16,7 mg	Toluen; 300 µl	DIEA; 0,1 mmol = 17,1 µl BSA; 0,05 mmol = 12,2 µl	51%
o-NBS-MeAib-Cl; 0,1 mmol = 32,0 mg	MeAib-OMe×HCl; 0,3 mmol = 50,1 mg	Toluen; 600 µl	DIEA; 0,3 mmol = 51,3 µl	38% (1d=64%)
o-NBS-MeAib-Cl; 0,05 mmol = 16,0 mg	MeAib-OMe×HCl; 0,1 mmol = 16,1 mg	Toluen* 250 µl	DIEA; 0,1 mmol = 17,1 µl BSA; 0,05 mmol = 12,2 µl	83%
p-NBS-MeAib-Cl; 0,05 mmol = 16,0 mg	MeAib-OMe×HCl; 0,1 mmol = 16,1 mg	Toluen* 250 µl	DIEA; 0,1 mmol = 17,1 µl BSA; 0,05 mmol = 12,2 µl	80%

* Das Aminosäurechlorid wurde vor Zugabe zur Aminokomponente in 50 µl DCM gelöst.

Pbf-MeAib-MeAib-OMe:

Weißer Feststoff

Ausbeute: 63%

o-NBS-MeAib-MeAib-OMe:

Weißer Feststoff

Ausbeute laut HPLC: 86%

Fp.: 170°-172°C

IR (KBr): ν(C-OMe)1741 cm^{-1};
ν(N-CO) 1642 cm^{-1};
ν(SO_2) 1306, 1132 cm^{-1}

MS: [M+H]: 483; ber.: 482

Elementaranalyse für $C_{24}H_{38}N_2O_6S$:

ber.: C: 59,75%; H: 7,88%; N: 5,8%

gef.: C: 59,33%; H: 7,66%; N:5,81%

^{1}H-NMR: (ppm, $CDCl_3$): δ 1.39, 1.48 2× (s, 6, Me_2), 1.6 (s, 6, Pbf-Me_2), 2.1, 2.5, 2.54 3× (s, 3, Me-Ar), 2.77 (s, 3, N-Me), 2.97 (s, 2, CH_2), 3.25 (s, 3, N-Me), 3.65 (s, 3, O-Me)

^{13}C-NMR: (ppm, $CDCl_3$): δ 12.7, 18.2, 19.9 3× (1, Ar-Me), 22.8, 23.6 2× (2, MeAib-Me), 28.8 (2, Pbf-Me), 30.6, 34.1 2×(1, N-Me), 43.5 (1, Pbf-CH_2), 52.2 (1, O-Me), 62.1, 67.2 2× (1, C-α), 87.66 (1, Pbf-CMe_2), 118.5, 125.7, 129.8, 135.1, 140.5, 160.2 (6, Ar-C), 171.9 (1, C=O), 171.9 (1, C=O)

MS: [M+H]: 416; ber.: 415

p-NBS-MeAib-MeAib-OMe

Ausbeute laut HPLC: 80%

5.4.3 Synthese von DNBS-Val-Val-OMe

Zu einer Lösung von 0,05 mmol Val-OEt×HCl (9,05 mg) in 300 µl Lösungsmittel wurde unter Rühren 0,05 mmol DIEA (8,56 µl) zum Freisetzen des Hydrochlorides gegeben. Dann wurde das Reaktionsgemisch mit 0,05 mmol DNBS-Val-Cl (18,25 mg) und 0,05 mmol Base versetzt. Die Reaktion wurde nach 15 Minuten abgebrochen (Tab. 13).

Tab. 13: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten für DNBS-Val-Cl + Val-OMe

LM	HCl-Fänger	Ausbeute [%]
Toluen	BSA	75
	DIEA	81
DMF	BSA	79
	DIEA	82

LM	HCl-Fänger	Ausbeute [%]
DCM	BSA	93
	DIEA	97

DNBS-Val-Val-OMe:

Weißer Feststoff

IR (KBr): ν(C=O): 1737 cm^{-1}, ν(CO-N): 1649 cm^{-1}, ν(SO_2): 1352, 1168 cm^{-1}

MS: [M+H]: 475; ber.: 474

5.5 Abspaltung der Arensulfonylschutzgruppe

5.5.1 Abspaltung der Pbf-Schutzgruppe

TFA/TMSO

Zu 0.002 mmol Peptid (1 mg) wurden 100 µl TFA und 28,2 µl TMSO gegeben und bei Raumtemperatur 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit Ether versetzt. Das Rohpeptid konnte durch Zentrifugation von der Reaktionslösung abgetrennt werden.

TFA/TFMSA

Zu einer Lösung von 0,002 mmol Peptid (1 mg) in 100 µl TFA wurden 4,5 µl TFMSA und 5,3 µl Thioanisol gegeben. Anschließend wurde 1,5h bei Raumtemperatur gerührt. Das Peptid wurde durch Fällung mit Ether und anschließender Zentrifugation des Reaktionsgemisches erhalten.

TFA/DMS

0,004 mmol Peptid (2 mg) wurden mit 180 µl TFA und 20 µl DMS versetzt und 1h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Ether versetzt und der entstehende Niederschlag durch Zentrifugation vom Lösungsmittel abgetrennt.

50%TFA/DMS

Zu $1{,}3\times10^{-4}$ mmol Peptid (0,6 mg) wurden 50 µl einer Lösung bestehend aus 25 µl 50% TFA und 25 µl DMS gegeben. Der Ansatz wurde mehrere Stunden gerührt, die Reaktion chromatographisch verfolgt.

MeAib-MeAib-OMe:

weißer Feststoff

Ausbeute: 80%

IR (KBr): ν(C=O) 1740 cm^{-1}, ν(C(O)-N) 1642 cm^{-1}, ν(SO_2) 1306, 1157 cm^{-1}

MS [M+H]: 231; ber.: 230

5.5.2 Abspaltung der NBS-Schutzgruppe

Die Abspaltung der o-NBS-Schutzgruppe wurde mit einer 0,5M Lösung von β-Mercaptoethanol/DBU in DMF durchgeführt.

Dazu wurden $4{,}98\times10^{-3}$ mmol o-NBS-Aib-MeAib-OMe (2 mg) mit 10 Äquivalenten β-Mercaptoethanol (3,5 µl) und 5 Äquivalente DBU (3,8 µl) in 100µl DMF versetzt und die Reaktion chromatographisch verfolgt.

5.5.3 Abspaltung der DNBS-Schutzgruppe

Thiophenol/K_2CO_3

0,017 mmol DNBS-Val-Val-OEt (8,3 mg) wurden mit 70 µl einer 5 %igen Thiophenolatlösung versetzt. Das für die Abspaltung der Schutzgruppe notwendige Phenolat wurde dabei durch Schütteln mit 2 Äquivalenten K_2CO_3 in DMF und anschließender Filtration der Lösung erhalten (0,034 mmol Thiophenol (3,5 µl) und 0,068 mmol K_2CO_3 (9,4 mg) in 70µl DMF). Die verwendete Abspaltlösung ist sehr oxydationsempfindlich und in ihrer zeitlichen Anwendung begrenzt.

β-Mercaptoethanol/DBU

Zu 0,028 mmol DNBS-Val-OH (10 mg) wurden unter Rühren bei Raumtemperatur β-Mercaptoethanol/DBU jeweils (1:2) in DMF, (1:1) und (2:1) in DCM gegeben. Die Konzentration der Lösung war 0,3M. Es wurde jeweils 1 Äquivalent β-Mercaptoethanol verwendet. Die Reaktionen wurde über mehrere Stunden verfolgt.

β-Mercaptoethanol/ Triethylamin

Zu 0,0288 mmol DNBS-Aminosäure wurde eine 0,3M β-Mercaptoethanolatlösung gegeben. Dafür wurde ein 10facher Überschuß β-Mercaptoethanol (0,288 mmol = 20,1 µl) in 860 µl Lösungsmittel (DCM, DMF) gegeben und mit 2 Äquivalenten Triethylamin (0,576 mmol = 80,33 µl) versetzt.

5.6 Kupplungen mit in situ gebildeten Aminosäurechloriden

5.6.1 In situ Aktivierung am Essigsäuremodell

Von 6 ml einer 0,1 M $SOCl_2$ (43,76 µl $SOCl_2$ in 6 ml DCM) wurde 1 ml für IR-spektroskopische Untersuchungen verwendet. In die restlichen 5 ml wurden 0,5 mmol HAc (28,6 µl) gegeben. Für spektroskopische Untersuchungen wurde wiederum 1 ml entnommen. Die verbleibenden 4 ml wurden geteilt und mit jeweils 0.1, 0.25, 0.5 und 1 Äquivalenten Base (Collidin, Pyridin und DIEA) versetzt. Die IR-Spektren wurden jeweils für 2, 5 und 10 Minuten Reaktionszeit aufgenommen.

5.6.2 In situ Aktivierung von DNBS-Val-OH

Zu DNBS-Val-OH wurde eine Lösung von $SOCl_2$ in DCM, sowie unter Rühren Pyridin gegeben. Die Reaktion wurde sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 45°C durchgeführt. Zur Umsatzkontrolle wurden 10 µl Probe in 20 µl einer 5 %igen Pyridin/MeOH-Lösung gegeben und nach 10 Minuten mit 50 % AN/H_2O/0.1 %TFA verdünnt. In Tab. 14 sind die Daten der über in situ Aktivierung erhaltenen Aminosäurechloride dargestellt.

Tab. 14: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten der in situ Aktivierung von DNBS-Val-Cl

µl LM	$SOCl_2$ [mmol]	Pyridin [mmol]	Temperatur	Ausbeute [%]
160µl DCM~	0,05 (1 eq.)	0,05 (1 eq.)	T_{Raum}	46
160µl DCM~	0,05 (1 eq.)	0,05 (1 eq.)	40°-45°C	30,5
160µl DCM~	0,05 (1 eq.)	0,025 (0,5 eq.)	T_{Raum}	36,7
160µl DCM~	0,05 (1 eq.)	0,025 (0,5 eq.)	40°- 45°C	47,8
160µl DCM	0,075 (1,5 eq.)	0,05 (1 eq.)	T_{Raum}	58,4
160µl DCM	0,075 (1,5 eq.)	0,025 (0,5 eq.)	T_{Raum}	47,2
160µl DCM	0,1 (2 eq.)	0,05 (1 eq.)	T_{Raum}	72,4
160µl DCM	0,075 (1,5 eq.)	0,075 (1,5 eq.)	40°- 45°C	60,5
160µl DCM	0,075 (1,5 eq.)	0,05 (1 eq.)	40°- 45°C	61,3
160µl DCM	0,1 (2 eq.)	0,075 (1,5 eq.)	40°- 45°C	64,5
160µl DCM	0,1 (2 eq.)	0,05 (1 eq.)	40°- 45°C	76,5
80 µl DCM*	0,075 (1,5 eq.)	0,05 (1 eq.)	40°- 45°C	71°
80 µl DCM*	0,075 (1,5 eq.)	0,05 (1 eq.)	40°- 45°C	76°
60µl DCM*	0,075 (1,5 eq.)	0,05 (1 eq.)	40°-45°C	71,5°
60µl DCM	0,075 (1,5 eq.)	0,05 (1 eq.)	40°- 45°C	80,1°
60µl DCM*	0,1 (2 eq.)	0,05 (1 eq.)	40°- 45°C	74,9°
60µl DCM	0,1 (2 eq.)	0,05 (1 eq.)	40°- 45°C	86,0°

~ Das Lösungsmittel enthielt zusätzlich THF. Die Zusammensetzung war DCM/THF = 3:1.
* Zusätzlich wurden zu der Lösung noch 2µl DMF als Katalysator gegeben.
° Umsätze nach 30 Minuten.

5.6.3 IR-Untersuchungen zum Abfangen von $SOCl_2$ mit t-BuOH

Von einer 0,1M Lösung $SOCl_2$ (21,88 µl $SOCl_2$ in 3 ml DCM) wurde 1 ml für die Nullwert-Bestimmung abgenommen. Die verbleibenden 2 ml wurden geteilt und mit je 0,1 mmol und 0,2 mmol t-BuOH versetzt. Die Lösungen wurden IR-spektroskopisch vermessen.

Um zu überprüfen, daß die zum Abfangen des $SOCl_2$ genutzten Reaktionsbedingungen die Stabilität des Aminosäurechlorides nicht beeinflussen, wurden 0,2 mmol DNBS-Val-Cl in 2 ml DCM gelöst. Für die Messung des Aminosäurechlorides wurde 1 ml verwendet. Die restliche Lösung wurde geteilt und mit jeweils 3 (0.15 mmol = 14,4 µl) bzw. 12 Äquivalenten t-BuOH (0,6 mmol = 57,6 µl) versetzt. Die so erhaltenen Lösungen wurden ebenfalls IR-spektroskopisch vermessen.

5.6.4 Kupplung mit in situ gebildetem DNBS-Val-Cl

Für die Kupplung mit in situ hergestellten Aminosäurechloriden wurde DNBS-Val-OH mit 2 Äquivalenten $SOCl_2$ und 1 Äquivalent Pyridin für 30 Minuten bei 40-45°C in DCM umgesetzt. Anschließend wurde die Aminosäurechloridlösung mit t-Butanol zum Abfangen des $SOCl_2$ versetzt und 2 Minuten gerührt. Zu der so erhaltenen Lösung wurde unter Rühren die mit einem Äquivalent DIEA freigesetzte Aminokomponente und Base gegeben. In der folgenden Tab. 15 sind die Daten für die Umsetzungen zum Dipeptid dargestellt.

Tab. 15: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten für die Kupplung mit in situ gebildetem DNBS-Val-Cl

DNBS-Val	LM	t-BuOH	Base	Val-OR	Ausbeute [%]
0.05mmol	DCM	_____	0,05mmol DIEA	0,05 mmol	13,1
0.05mmol	DCM	0,15mmol	0,05mmol DIEA	0,05 mmol	51,7
0.05mmol	DCM	0,15mmol	0,075mmol DIEA	0,05 mmol	86,5
0.05mmol	DCM	0,15mmol	0,10mmol DIEA	0,05 mmol	95,8
0.05mmol	DCM/DMF	0,15mmol	0,05mmol DIEA	0,05 mmol	62,9
0.05mmol	DCM/DMF	0,15mmol	0,05mmol DIEA, 0,05mmol Collidin	0,05 mmol	60,4
0.05mmol	DCM/DMF	0,15mmol	0,10mmol Collidin	0,05 mmol*	79,9
0.05mmol	DCM	0,15mmol	0,075mmol DIEA	0,05 mmol*	93,1

* Hier wurde die Aminokomponente separat durch Extraktion mit einer $NaHCO_3$-Lösung freigesetzt.

5.6.5 Acylierungen mit in situ gebildeten, sterisch gehinderten Aminosäurechloriden

RSO_2-Aminosäure in DCM wurde mit 2 eq. $SOCl_2$ und 1 eq. Pyridin versetzt und 30 Minuten bei 45°C gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit einem $SOCl_2$-Fänger versetzt und noch 2 Minuten gerührt. Dann wurden 2-4 eq. Aminokomponente zur Reaktionslösung gegeben und weitere 30 Minuten bis 3h gerührt (Tab. 16).

Tab. 16: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten für die Kupplung mit in situ gebildetem DNBS-Aib/MeAib-Cl

Aminosäure/in situ-Ansatz	%	HCl-Fänger	Base	Aminokomp.	Umsatz
DNBS-Aib 0,15mmol $SOCl_2$ 0,3 mmol; Pyridin 0,15mmol, 316µl DCM	93,7	t-BuOH, 0,45 mmol	Collidin 0,3 mmol	Ala-NA 0,15 mmol	82%,
DNBS-Aib 0,3mmol $SOCl_2$ 0,6 mmol; Pyridin 0,3mmol, 320µl DCM	90,4	t-BuOH, 0,9 mmol	Collidin 0,6 mmol	Ala-NA 0,2 mmol	85%

Aminosäure/in situ-Ansatz	%	HCl-Fänger	Base	Aminokomp.	Umsatz
DNBS-Aib 0,3 mmol $SOCl_2$ 0,6 mmol; Pyridin 0,3 mmol, 320 µl DCM	92	t-BuOH, 0,9 mmol	DIEA 0,6 mmol	Ala-NA 0,2 mmol	82,3%
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60 µl DCM	91,3	t-BuOH, 0,15 mmol	DIEA 0,1 mmol	Ala-NA 0,025 mmol	58%
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60 µl DCM	98	t-BuOH, 0,15 mmol	DIEA 0,15mmol	Ala-NA 0,025 mmol	96,8%
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60µl DCM	99	3eq. t-BuOH, 0,15 mmol	BSA 0,15mmol	Ala-NA 0,025 mmol	61%
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60 µl DCM	83,8	t-Butylamin, 0,15 mmol	DIEA 0,15mmol	Ala-NA 0,025 mmol	62%
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60 µl DCM	78	t-Butylamin, 0,15 mmol, in 10µl DCM	DIEA 0,1 mmol	Ala-NA 0,025 mmol	98%
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60µl DCM	84,6	t-Butylamin, 0,1 mmol	DIEA 0,1 mmol	Ala-NA 0,025 mmol	65,9%
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60 µl DCM	85	t-Butylamin, 0,05 mmol	DIEA 0,1 mmol	Ala-NA 0,025 mmol	23,7%
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60µl DCM	81,6	t-Butylamin, 0,1 mmol	DIEA 0,15mmol	Ala-NA 0,025 mmol	11,2%
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60 µl DCM	81,6	t-Butylamin, 0,15 mmol	DIEA 0,05mmol	Ala-NA 0,025 mmol	10,6%
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60 µl DCM		t-Butylamin, 0,25 mmol	_____	Ala-NA 0,025 mmol	87%
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60µl DCM	84,6	t-Butylamin, 0,3 mmol	_____	Ala-NA 0,025 mmol	71%
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60 µl DCM	84,3	t-Butylamin, 0,5 mmol	_____	Ala-NA 0,025 mmol	10,5%

Aminosäure/in situ-Ansatz	%	HCl-Fänger	Base	Aminokomp.	Umsatz
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60 µl DCM	84,7	Trityl-MeOH, 0,15 mmol	DIEA 0,1 mmol	Ala-NA 0,025 mmol	70,1%
DNBS-MeAib 0,05mmol $SOCl_2$ 0.1mmol; Pyridin 0,05mmol, 60µl DCM	81,2	Tritylamin, 0,15 mmol	DIEA 0,15mmol	Ala-NA 0,025 mmol	100%
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60 µl DCM	75,3	Trityl-MeOH 0,15 mmol	DIEA 0,1 mmol	Aib-Ala-NA 0,025 mmol	_____%
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0;1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60µl DCM	72,1	Tritylamin, 0,15 mmol	DIEA 0,1 mmol	Aib-Ala-NA 0,025 mmol	65%(3h)
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60 µl DCM	80,3	Tritylamin, 0,15 mmol	DIEA 0,15mmol	Aib-Ala-NA 0,025 mmol	76%
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60µl DCM	89,9	Tritylamin, 0,15 mmol	DIEA 0,2 mmol	Aib-Ala-NA 0,025 mmol	10%
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60 µl DCM	82,3	Tritylamin, 0,15 mmol	DIEA 0,16mmol	Aib-Ala-NA 0,025 mmol	90,8%
DNBS-NMeAib 0,05mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60 µl DCM	77,4	Tritylamin, 0,15 mmol	DIEA 0,17mmol	Aib-Ala-NA 0,025 mmol	84,1%
DNBS-MeAib 0,05 mmol $SOCl_2$ 0,1 mmol; Pyridin 0,05mmol, 60 µl DCM	69,5	t-Butylamin, 0,15 mmol	DIEA 0,1 mmol	Aib-Ala-NA 0,025 mmol	29,9%
DNBS-MeAib 0,031 mmol $SOCl_2$ 0,05 mmol; Pyridin 0,025 mmol, 30 µl DCM	54,6	t-Butylamin, 0,094 mmol	DIEA 0,094 mmol	MeAib-Ala-NA 5 mg	_____
DNBS-MeAib 0,031 mmol $SOCl_2$ 0,05 mmol; Pyridin 0,025 mmol, 30 µl DCM	46,0	t-Butylamin, 0,094 mmol	DIEA 0,094 mmol	MeAib-Ala-NA 5 mg	_____
DNBS-MeAib 0,03 mmol $SOCl_2$ 0,06mmol; Pyridin 0,03mmol35 µl DCM	83,8	Tritylamin, 0,09 mmol	DIEA 0,096 mmol	Aib-Ala-NA 0,025 mmol	48,5%
DNBS-MeAib 0,03 mmol $SOCl_2$ 0,06mmol; Pyridin 0,03mmol35 µl DCM	87,3	Tritylamin, 0,09 mmol	DIEA 0,099 mmol	Aib-Ala-NA 0,025 mmol	55%

Aib-MeAib-Aib-Ala-NA:

Weißer Feststoff

MS: [M+H]: 484; ber.: 483

MeAib-MeAib-Aib-Ala-NA:

Weißer Feststoff

MS: [M+H]: 498; ber.:497

Tab. 17: Chemische Verschiebungen [ppm] für die Tetrapeptide Aib/MeAib-MeAib-Aib-Ala-NA

	Aib	**MeAib**	**Aib**	**Ala**	**NA**
$H_{(2)}N$	7,982	N-Me 3,115	6,933	7,376 (d)	9,403
Hα				4,309 (qui)	8,459; 7,886
Hβ	1,638	1,464	1,427	1,489	7,813; 2×7,802
Hβ‘	1,795	1,411	1,416		7,45; 7,392
C‘	184,5	186,9	186,8	185,0	128,48; 132,79; 140,75; 139,90; 140,00; 138,80; 137,21; 142,90; 146,30; 149,20
Cα	71,85	76,41	69,30	63,17	
Cβ	34,98	35,80	38,06	29,46	
NH/NCH_3	34,60	33,04	35,58		

	MeAib	**MeAib**	**Aib**	**Ala**	**NA**
$H_{(2)}N$	1,618	1,43	1,43	7,33	9,414
Hα				4,34	8,46; 7,88; 7,87; 7,82; 7,81; 7,46; 7.33
Hβ	1,767	1,46	1,44	1,52	
NH/NCH_3	2,589	3,12	6,91		

5.7 Festphasensynthesen

5.7.1 Harzsynthese von MeAib-Aib-Phe-Phe

Das Tripeptid Aib-Phe-Phe-OH wurde manuell am Cl-Trt-Harz synthetisiert (300 mg, 1,5 mmol/g). Dazu wurden die Aminosäuren (2 eq.) unter Verwendung von TBTU und DIEA in DMF gekuppelt. Die Konzentration der Reaktionslösung war 0,45M, die Kupplungszeit betrug 30 Minuten. MeAib wurde als o-NBS-geschütztes Aminosäurechlorid eingeführt. Dazu wurden zuerst 3,3 Äquivalente (1,5 mmol) o-NBS-MeAib-Cl fest aufs Harz gegeben, anschließend je 1 ml DCM und Toluen. Zum Abfangen des Hydrochlorides wurden 1,5 mmol BSA benutzt. Die Kupplungszeit betrug hierbei eine Stunde. Die Abspaltung der o-NBS-Schutzgruppe erfolgte unter Verwendung einer Lösung von β-Mercaptoethanol und DBU in DMF (1,6M, 3,21 mmol ME, 1,6 mmol DBU). Die Abspaltdauer betrug 30 Minuten, die erfolgreiche Abspaltung der Schutzgruppe war an einer Goldfärbung der Lösung zu sehen.

Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit Essigsäure/Trifluorethanol/DCM 1/1/8 für 30 Minuten. Das Rohpeptid wurde mit Ether aus Methanol gefällt und anschließend präparativ gereinigt.

MeAib-Aib-Phe-Phe-OH:

Weißer Feststoff

Ausbeute: 32,7%

MS: [M+H]: 497; ber.:496

5.7.2 Synthese eines Urocortin-Analoga

Die Sequenz Aib-UEK(32-40) (sie entspricht DDPPLSIDLTFHLLRTLLEI) wurde an einem 433A Synthesizer der Firma Perkin Elmer synthetisiert. Es wurde Tentagel S RAM-Harz der Firma RAPP Polymere Tübingen genutzt. Der Aufbau der Peptide erfolgte mittels Doppelkupplung (30min, 2eq. AS, 2eq. TBTU, 4eq. DIEA, DMF). An das so erhaltene Peptid wurden 2 MeAib-Reste und ein Alaninrest mittels Säurechloridaktivierung gekuppelt (Tab. 18). Als Lösungsmittel wurde DCM genutzt.

Tab. 18: Reaktionsbedingungen für die Synthese des UEK-Analogons

	DNBS-N-MeAib	**DNBS-N-MeAib**	**o-NBS-Ala**
Menge	3eq. DNBS-N-MeAib-Cl	4eq. DNBS-N-MeAib-Cl	4eq.
Base	3,4eq. DIEA	4,4eq. DIEA	4,4eq. DIEA
Zeit	2×2h	3×4h	3×4h
Abspaltung der SG	1×45min; ME/Piperidin	1×45min; ME/Piperidin; 40°C	0,5M Thiophenol/K_2CO_3 in DMF; 2×30min

Anschließend wurde das Peptid unter Verwendung der Fmoc-Strategie verlängert. Mit Standardmethoden (TBTU, DIEA, DMF) wurden durch Einfachkupplungen UEK-(1-20)-(QNRKLLDEV) an das bereits vorhandene Peptid synthetisiert.

CD-spektroskopische Untersuchungen

Für die CD-spektroskopischen Untersuchungen wurde das Peptid in Wasser gelöst und bei einem Wellenlängenbereich von 250 bis 200nm vermessen. Die vermessenen Lösungen waren dabei 10^{-4}M.

Aktivitätsuntersuchungen

Die Untersuchungen der biologischen Aktivität des hergestellten Peptides wurden an Leydigzellen der Maus vorgenommen /104/.

5.7.3 Harzkupplungen mit in situ gebildeten Aminosäurechloriden

Die in situ gebildeten Aminosäurechloridlösungen für die Kupplungen am Harz wurden wie beschrieben hergestellt. Die Kupplungsdauer betrug 15 Minuten, es wurden 2 Äquivalente DNBS-Val verwendet (Tab. 19). Als erste Aminosäure wurden Lysin bzw. Alanin als Fmoc-Aminosäuren ans Harz geknüpft. Zur Vermeidung eventuell auftretender Diketopiperazinbildung wurde in einigen Fällen noch eine zweite Aminosäure mit DIPCDI und HOBt ans Harz gekuppelt.

Tab. 19: Harzkupplung mit in situ gebildetem DNBS-Val-Cl am Harz

Harz	Kupplung an:	Base	LM	Ausbeute [%]
500mg SRAM-	Lys-∅	1eq. DIEA	DCM/DMF 1:1	_____
300mg SRAM	Val-Lys-∅	1,1eq. DIEA	DCM/DMF 1:1	10,1
150mg Cl-Trt.	Val-Lys-∅	1eq. DIEA	DCM/DMF 1:1	15
150mg Cl-Trt.	Lys-∅	1,1eq. DIEA	DCM/DMF 1:1	28
250mg SRAM	Ala-Ala-∅	1,5eq. DIEA	DCM/DMF 1:1	6,6
250mg SRAM	Ala-Ala-∅	1,75eq. DIEA	DCM/DMF 1:1	19,2
250mg SRAM	Ala-Ala-∅	2eq. DIEA	DCM/DMF 1:1	18,3
250mg SRAM	Ala-Ala-∅	2eq. Collidin	DCM/DMF 1:1	7,5
300mg SRAM	Ala-Ala-∅	1,75eq. DIEA	DCM	37,8
300mg SRAM	Ala-∅	2eq. DIEA	DCM	39,5
300mg SRAM	Ala-∅	2eq. DIEA	DCM	100*
300mg SRAM	Ala-∅	3eq. DIEA	DCM	37,8
300mg SRAM	Ala-∅	1,35eq.+2,7eq. DIEA	DCM	60,8
100mg SRAM	Ala-∅	2eq. DIEA	DCM	55,6
100mg SRAM	Ala-∅	2,5eq. DIEA	DCM	72,6
100mg SRAM	Ala-Ala-∅	3eq. DIEA	DCM	93,4
100mg SRAM	Ala-Ala-∅	3,2eq. DIEA	DCM	86,5
100mg SRAM	Ala-Ala-∅	3,3eq. DIEA	DCM	91,3

* Die Kupplung wurde zum Vergleich mit preformiertem Säurechlorid durchgeführt.
** Die Beladungsbestimmung lieferte trotz leicht grünem Kaisertest das gleiche Ergebnis wie für 4eq. DIEA, obwohl dort ein negativer Kaisertest erhalten wurde.

Das Harz darf vor Durchführung der Kupplung mit in situ gebildeten DNBS-Aminosäurechloriden nicht vollständig „trocken“ gesaugt werden, da es beim „Trockensaugen“ des Harzes zu einer Bindung von Luftfeuchtigkeit durch das Harz

kommen kann [114]. Das so gebundene Wasser führt zu einer teilweisen Hydrolyse des Aminosäurechlorides bei der Reaktion am Harz und so zu Umsatzeinbußen.

5.7.4 Untersuchungen mit DNBS-Val-Cl/OH (Siehe Nebenreaktionen SPPS)

Die Kupplungseffizienz der DNBS-Aminosäurechloride wurde an verschiedenen Harzen getestet und anhand der Beladung bestimmt (Tab. 20,Tab. 21). Als erste Aminosäuren wurden jeweils Fmoc-Lys(Boc)-OH und Fmoc-Val-OH mittels HOBt und DIPCDI in DCM/DMF ans Harz gekuppelt. Dabei wurden die Aminosäuren vor der Kupplung 2 Minuten voraktiviert.

Tab. 20: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten für die Kupplung mit DNBS-Val-Cl

Harz	AS-Derivat	Reagenzien	Zeit	Kaiser-Test	Beladung
SRAM	3eq. Fmoc-Lys(Boc)	3eq HOBt/DIPCDI;	30min		0,23
	2eq. Fmoc-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15min		0,23
	2eq. DNBS-Val-Cl	2,2eq. DIEA;	15min	Negativ	0,22
	2eq. DNBS-Val-Cl	2,2eq. DIEA;	15min	negativ	0,15
SRAM	3eq. Fmoc-Lys(Boc)	3eq HOBt/DIPCDI;	30min		0,22
	2eq. Fmoc-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15min		0,22
	2eq. DNBS-Val-Cl	2,3eq. DIEA;	15min	Negativ	0,27
	2eq. DNBS-Val-Cl	2,3eq. DIEA;	15min	negativ	0,18
SRAM	3eq. Fmoc-Lys(Boc)	3eq HOBt/DIPCDI;	30min		0,23
	2eq. Fmoc-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15min		0,23
	2eq. DNBS-Val-Cl	2,3eq. Collidin;	15min	Negativ	0,22
	2eq. DNBS-Val-Cl	2,3eq. Collidin;	15min	negativ	0,21
SRAM	3eq. Fmoc-Lys(Boc)	3eq HOBt/DIPCDI;	30min		0,23
	2eq. Fmoc-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15min		0,23
	2eq. DNBS-Val-Cl	2,2eq. DIEA;	15min	negativ	0,18
SRAM	3eq. Fmoc-Lys(Boc)	3eq HOBt/DIPCDI;	30min		0,23
	2eq. Fmoc-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15min		0,24
	2eq. DNBS-Val-Cl	2,3eq. DIEA; 15min	15min	Negativ	0,23
	2eq. DNBS-Val-Cl	2,3eq. DIEA; 15min	15min	negativ	0,13
SRAM	3eq. Fmoc-Lys(Boc)	3eq HOBt/DIPCDI;	30min		0,25
	2eq. Fmoc-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15min		0,24
	2eq. DNBS-Val-Cl	2,3eq. DIEA;	15min	negativ	0,18
SRAM	3eq. Fmoc-Lys(Boc)	3eq HOBt/DIPCDI;	30min		0,24
	2eq. Fmoc-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15min		0,24
	2eq. DNBS-Val-Cl	2,3eq. DIEA;	15min	negativ	0,18

Tab. 21: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten für die Kupplung mit DNBS-Val

Harz	AS-Derivat	Reagenzien	Zeit	Kaiser-Test	Beladung
SRAM	3eq. Fmoc-Lys(Boc)	3eq HOBt/DIPCDI;	30 min		0,24
	2eq. Fmoc-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min		0,24
	2eq. DNBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	Negativ	0,27
	2eq. DNBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	negativ	0,22
	2eq. DNBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	negativ	0,18
SRAM	3eq. Fmoc-Lys(Boc)	3eq HOBt/DIPCDI;	30 min		0,24
	2eq. DNBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	Negativ	0,23
	2eq. DNBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	negativ	0,20
SRAM	3eq. Fmoc-Lys(Boc)	3eq HOBt/DIPCDI;	30 min		0,24
	2eq. Fmoc-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	Negativ	0,24
	2eq. DNBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	negativ	0,19
Cl-Trityl	2eq. Fmoc-Lys(Boc)	4eq. DIEA;	1h		0,8
	2eq. Fmoc-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min		0,78
	2eq. DNBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	Negativ	0,89
	2eq. DNBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	negativ	0,75
	2eq. DNBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	negativ	0,63
MBHA	3eq. Fmoc-Lys(Boc)	3eq HOBt/DIPCDI;	ü. N.		0,58
	2eq. Fmoc-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min		0,56
	2eq. DNBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	Negativ	0,69
	2eq. DNBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	negativ	—
	2eq. DNBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	negativ	0,47
MBHA	3eq. Fmoc-Lys(Boc)	3eq HOBt/DIPCDI;	ü. N.		0,59
	2eq. Fmoc-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min		0,56
	2eq. DNBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	Negativ	0,59
	2eq. DNBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	negativ	0,49
	2eq. DNBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	negativ	0,41
	2eq. Fmoc-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	negativ	0,45
MBHA 100 mg	3eq. Fmoc-Lys(Boc)	3eq HOBt/DIPCDI;	ü. N.		0,58
	2eq. Fmoc-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min		0,59
	2eq. o-NBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	Negativ	
	2eq. o-NBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	negativ	
	2eq. o-NBS-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	negativ	0,28
	2eq. Fmoc-Val	2eq HOBt/DIPCDI;	15 min	negativ	

5.8 Untersuchungen zum Auftreten von Stereomutation

Für die Untersuchungen wurde das Dipeptid DNBS-Val-Lys(Boc)-NH_2 genutzt. Es wurde am Tentagel S Ram Harz mittels Standardmethoden (HOBt, DIPCDI) synthetisiert. Danach wurde die DNBS-Schutzgruppe mit verschiedenen Konzentrationen an Abspaltlösung entfernt. Verwendet wurden eine 2 und 5%ige Lösung von TP/K_2CO_3 in DMF sowie 6, 10 bzw. 20 eq. ME/TEA in DCM. Anschließend wurden die Peptide mit TFA vom Harz gespalten (3h) (Tab. 22).

Um die aufgetretene Stereomutation zu bestimmen, wurden 1-3 mg der vom Harz

abgespaltenen Rohpeptide in 6N DCl/D_2O über 24h bei 110°C hydrolysiert und die Aminosäuren mit iso-Propanol/HCl und Trifluoressigsäureanhydrid in die entsprechenden N-Trifluoracetylisopropylester überführt. Die derivatisierten Proben wurden unter Verwendung von Helium als Trägergas auf einer Chirasil-VAL-Säule chromatographiert. Die Injektionstemperatur betrug 190°C und die Temperatur der Ionenquelle 180°C. Die Anfangstemperatur betrug 50°C und wurde mit einem Temperaturgradienten von 2°C/min auf 81°C erhitzt. Diese Temperatur wurde 2min gehalten und anschließend wurde mit 20°C/min auf 190°C erhitzt. Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte im „Selective-Ion-Modus“ (SIM).

Für die Untersuchungen der chiralen Integrität bei der in situ Kupplung von DNBS-Val mit Ala-NA wurden jeweils 0,05 mmol DNBS-Val mit 0,1mmol $SOCl_2$ und 0,05 mmol Pyridin in 60 µl DCM umgesetzt. Zu dieser Lösung wurden 0,05 mmol Ala-naphthylamid und Base gegeben. Die in situ Kupplungen wurden in DCM bzw. DCM/DMF durchgeführt. Die Abspaltung der DNBS-Schutzgruppe erfolgte mit einer Lösung von 0,5 mmol ME (34,9 µl) und 1 mmol TEA (139,4 µl) in 1,5 ml DCM.

Tab. 22: Reaktionsbedingungen für die Untersuchungen zur Stereomutation

Art der Kupplung	Base	LM	%Racemisierung*
DNBS-Val; 17,35 mg	DIEA; 0,1 mmol, 17,1 µl	DCM	nicht detektierbar
DNBS-Val; 17,35 mg	Collidin; 0,1 mmol, 13,3µl	DCM	0,42[#]
DNBS-Val; 17,35 mg	DIEA; 0,02 mmol, 34,2 µl	DCM	nicht detektierbar
DNBS-Val; 17,35 mg	Collidin; 0,2 mmol, 26,5µl	DCM	nicht detektierbar
DNBS-Val; 17,35 mg	DIEA; 0,1 mmol, 17,1 µl	DCM/DMF	nicht detektierbar
DNBS-Val; 17,35 mg	Collidin; 0,1 mmol, 13,3µl	DCM/DMF	nicht detektierbar
DNBS-Val-Cl; 18,25 mg	DIEA; 0,05 mol,8,6 µl	DCM	nicht detektierbar
DNBS-Val-Cl; 18,25 mg	Collidin; 0,05 mmol, 6,6µl	DCM	nicht detektierbar

*Die Werte wurden nach Abspaltung der DNBS-Gruppe erhalten.
[#] Die Abspaltung der DNBS-Schutzgruppe erfolgte ohne vorheriges Entfernen der überschüssigen Base.

Literaturverzeichnis

[1] Merrifield, R. B.; J. Am. Chem. Soc.; 1963, *85,* 2149,

[2] Nushiuchi, Y.; Inui, T.; Nishio, H.; Bodi, J.; Kimura, K.; Tsuji, F. I.; Sakakibara, S.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 1998, *95,* 13549,

[3] Fairwell, T.; Hospattankar, A. V.; Ronan, R.; Brewer, H. B.; Chang, J. K.; Shimizu, M.; Zitner, L.; Arnaud, C. D.; Biochemistry; 1983, *22,* 2691,

[4] Blake, J.; Li, C. H.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 1983, *80,* 1556,

[5] Yamashiro, D.; Li, C. H.; J. Am. Chem. Soc.; 1978, *92,* 7608,

[6] Gutte, B.; Merrifield, R. B.; J. Am. Chem. Soc.; 1969, *91,* 501,

[7] Gutte, B.; Merrifield, R. B.; J. Biol. Chem.; 1971, *246,* 1922,

[8] Clark-Lewis, I.; Aebersold, R.; Ziltener, F. H.; Schrader, J. W.; Hood, L. E.; Kent, S. B.; Science; 1986, *231,* 134,

[9] Kent, S. B.; Annu. Rev. Biochem.; 1988, *57,* 959,

[10] Slomczynska, U.; Beusen, D. D.; Zabrocki, J.; Kociolek, K.; Redlinski, A.; Reusser, F.; Hutton, W. C.; Leplawy, M. T.; Marshall, G. R.; J. Am. Chem. Soc.; 1992, *114,* 4095,

[11] Rapp, W.; Zhang, L.; Häbich, R.; Bayer, E.; Hrsg.: Jung, G.; Bayer, E.: Peptides; New York, Walter De Gryuter, 1989 199,

[12] Beyermann, M.; Wenschuh, H.; Henklein, P.; Bienert, M.; Hrsg.: Epton, R.: Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis, Peptides, Polypeptides and Nucleotides; Canterbury, Mayflower Scientific, 1992 349,

[13] Narita, M.; Ishikawa, K.; Chen, J.-Y.; Kim, Y.; Int. J. Peptide Protein Res.; 1984, *24,* 580,

[14] Redemann, T.; Jung, G.; Hrsg.: Ramage, R.; Epton, R.: Peptides 1996; Wolverhampton, Mayflower Scientific, 1998 749,

[15] Hancock, W. S.; Prescott, D. J.; Vagelos, P. R.; Marshall, G. R.; J. Org. Chem.; 1973, *38,* 774,

[16] Kent, S. B.; Merrifield, R. B.; Hrsg.: Brunfeld, K.: Peptides, Proceedings of Sixteenth Europeen Peptide Symposium; 1980 328,

[17] Westhall, F. C.; Robinson, A. B.; J. Org. Chem.; 1970, *35,* 2842,

[18] Bayer, E.; Panhaus, G.; Ali Khan, M.; Hrsg.: Epton, R.: Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis; Birmingham, Mayflower Scientific, 1997 317,

[19] Yamashiro, D.; Blake, J. F.; Li, C. H.; Tetrahedron Lett.; 1976, *18,* 1469,

[20] Felix, M. F.; Wang, C.-T.; Lambros, T. J.; Hrsg.: Deber, C. M.; Hruby, V. J.; Kopple, K. D.: Peptides, Structure and Function; 1985 389,

[21] Narita, M.; Kojima, Y.; Bull. Chem. Soc. Jpn.; 1989, *62,* 3572,

[22] Narita, M.; Ishikawa, S.; Nakano, H.; Isokawa, S.; Int. J. Peptide Protein Res.; 1984, *24,* 14,

[23] Schnölzer, M.; Alewood, P.; Jones, A.; Alewood, D.; Kent, S. B.; Int. J. Peptide Protein Res.; 1992, *40,* 180,

[24] Milton, R. C. de L.; Milton, S. C. F.; Adams, P. A.; J. Am Chem. Soc.; 1990, *112,* 6039,

[25] Thaler, A.; Seebach, D.; Helv. Chim. Acta; 1991, *74,* 628,

[26] Hendrix, J. C.; Halverson, K.-J.; Jarrett, J. T.; Lansbury, P. T. jr. ; J. Org. Chem.; 1990, *55,* 4517,

[27] Stewart, J. M.; Klis, W. A.; Hrsg.: Epton, R.: Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis; Wolverhampton, Wolverhampten Polytechnic, 1990 1,

[28] Spencer, J. R.; Antonenko, V.V.; Delaet, N. G. J.; Goodman, M.; Int. J. Peptide Protein Res.; 1992, *40,* 282,

[29] Larsen, D. B.; Larsen, C.; Holm, A.; Hrsg.: Giralt, E.; Andreu, D.: Peptides 1990; Leiden, ESCOM, 1991 183,

[30] Tam, J. P.; Hrsg.: Deber, C. M.; Hruby, V. J.; Kopple, K. D.: Peptides, Structure and Function; 1985 423,

[31] Kent, S. B. H.; Hrsg.: Deber, C. M.; Hruby, V. J.; Kopple, K. D.: Peptides, Structure and Function; 1985 405,

[32] Atherton, E.; Clive, D. L. J.; Sheppard, R, C.; J. Am. Chem. Soc.; 1975, *97,* 6584,

[33] Rodionov, L. I.; Baru, M. B.; Ivanov, V. T.; Pept. Res.; 1992, *5,* 119,

[34] Fields, G. F.; Fields, C. G.; J. Am. Chem. Soc.; 1991, *113,* 4202,

[35] Bedfored, J.; Hyde, C.; Johnson, T.; Jun, W.; Owen, D.; Quibell, M.; Sheppard, R. C.; Int. J. Petide Protein Res.; 1992, *40,* 300,

[36] Johnson, T.; Quibell, M.; Owen, D.; Sheppard, R. C.; J. Chem. Soc., Chem. Commun.; 1993, 369,

[37] Blaakmeer, J.; Tjisse-Klasen, T.; Tesser, G. I.; Int. J. Peptide Protein Res.; 1991, *37,* 556,

[38] Yokum, T. S.; Elzr., P. H.; McLaughlin, M. L.; J. Med. Chem.; 1996, *39,* 3603,

[39] Wysong,C. L.; Yokum, T. S.; McLaughlin, M. L.; Hammer, R. P.; Chemtech; 1997, 26,

[40] Dive, V.; Yiotakis, A.; Roumestand, C.; Gilquin, B.; Labadie, J.; Toma, F.; Int. J. Peptide Protein Res.; 1992, *39,* 506,

[41] Nagaraj, R.; Balaram, P.; Acc. Chem. Res.1981; 1981, *14,* 356,

[42] Bodansky, M.; Prinzipien der Peptidsynthese; 2. Berlin, Springer-Verlag, 1993 11,

[43] Carpino, L. A.; Sadat-Aalaee, D.; Chao, H. G.; De Selms, R. H.; J. Am. Chem. Soc.; 1990, *112,* 9651,

[44] Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Krause, E.; Bienert, M.; Carpino, L. A.; Hrsg.:

Schneider, C. H.; Eberle, A. N.: Peptides 1992; ESCOM Science Publishers B. V., 1993 294,

[45] Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Krause, E.; Brudel, M.; Winter, R.; Schümann, M.; Carpino, L. A.; Bienert, M.; J. Org. Chem.; 1994, *59,* 3275,

[46] Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Haber, H.; Seydel, J. K.; Krause, E.; Bienert, M.; Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Albericio, F.; J. Org. Chem.; 1995, *60,* 405,

[47] Kaduk, C.; Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Forner, K.; Carpino, L. A.; Bienert, M.; LIPS; 1995, *2,* 285,

[48] Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Rothemund, S.; Carpino, L. A.; Bienert, M.; Tetrahedron Lett.; 1995, *36,* 1247,

[49] Wenschuh, H.; Beyermann, M.; El-Faham, A.; Ghassemi, S.; Carpino, L. A.; Bienert, M.; J. Chem. Soc., Chem. Comm.; 1995, 669,

[50] Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Bienert, M.; El-Faham, A.; Ghassemi, S.; Carpino, L. A. ; Hrsg.: Kamaya, P. T. P.; Hodges, R. S.: Peptides, Chemistry, Structure and Biology; Kingswinford, Mayflowers Scientific Ltd., 1996 33,

[51] Carpino, L. A.; Beyermann, M.; Wenschuh, H.; Bienert, M.; Acc. Chem. Res.; 1996, *29,* 268,

[52] Rajeswari, S.; Jones, R. J.; Cava, M. P.; Tetrahedron Lett.; 1987, *28,* 5099,

[53] Kim, H.-O.; Gardner, B.; Kahn, M.; Tetrahedron Lett.; 1995, *36,* 6013,

[54] Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Winter, R.; Bienert, M.; Ionescu, D.; Carpino, L.A.; Tetrahedron Lett.; 1996, *37,* 5483,

[55] Wenschuh; H.; Beyermann, M.; Granitza, D.; Haber, H.; Truran, G. A.; Bienert, M.; Carpino, L. A.; Hrsg.: Epton, R.: Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis; Birmingham, Mayflower Scintific, 1996 131,

[56] Wenschuh, H.; Ionescu, D.; Beyermann, M.; Bienert, M.; Carpino, L. A.; Hrsg.: Ramage, R.; Epton, R.: Peptides 1996; Kingswinford, Mayflower Scientific, 1998 907,

[57] Moretto, V.; Valle, G.; Crisma, M.; Bonora, G. M.; Toniolo, C.; Int. J. Biol. Macromol.; 1992, *14,* 178,

[58] Fischer, E.; Otto, E.; Ber. Deutsch. Chem. Ges.; 1903, *36,* 2106,

[59] Fischer, E.; Bergmann, M.; Ann.; 1913, *398,* 117,

[60] Schönheimer, R.; Z. Physiol. Chem.; 1926, *154,* 203,

[61] Bergmann, M.; Zervas, L.; Ber. Deutsch. Chem. Ges.; 1932, *65,* 1192,

[62] Bergmann, M.; Zervas, L.; Fruton, J. S.; Schneider, F.; Schleich, H.; J. Biol. Chem.; 1935, *109,* 325,

[63] Bergmann, M.; Zervas, L.; Schleich, H.; Leinert, F.; Z. Physiol. Chem.; 1932, *212,* 72,

[64] Sammes, G. P.; Weller, D. J.; Synthesis; 1995, 1205,

[65] Leplawy, M. T.; Jones, D. S.; Kener, G. W.; Sheppard, R. C.; Tetrahedron; 1960, *11,*

39,

[66] Beecham, A. F.; J. Am. Chem. Soc.; 1957, *79,* 3257,

[67] Carpino, L. A.; Han, G. Y.; J. Org. Chem.; 1972, *37,* 3404,

[68] Carpino, L. A.; Acc. Chem. Res.; 1987, *20,* 401,

[69] Beyermann; M.; Bienert, M.; Chao, H.-G.; Carpino, L. A.; Proceedings of the Peptide Symposium; 1995 925,

[70] Carpino, L. A.; Chao, H.-G.; Beyermann, M.; Bienert, M.; J. Org. Chem.; 1991, *56,* 2635,

[71] Babu, V. V. S.; Gopi, H. N.; Tetrahedron Lett.; 1998, *39,* 1049,

[72] Ananda, K.; Gopi, H. N.; Babu, V. V. S.; LIPS; 1998, *5,* 277,

[73] Gopi, H. N.; Babu, V. V. S.; Tetrahedron Lett.; 1998, *39,* 9769,

[74] Babu, V. V. S.; Gayathri, K.; Ind. J. Chem.; 1998, *37B,* 1109,

[75] Basu, G.; Kuki, A.; Biopolymers; 1993, *33,* 995,

[76] Frerot, E.; Coste, J.; Pantaloni, A.; Dufour, M.; Jouin, P.; Tetrahedron; 1991, *47,* 259,

[77] Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Winter, R.; Bienert, M.; Ionescu, D.; Carpino, L. A.; Tetrahedron Lett.; 1996, *37,* 5483,

[78] Carpino, L. A.; Ionescu, D.; El-Faham, A.; Henklein, P.; Wenschuh, H.; Bienert, M.; Beyermann, M.; Tetrahedron Lett.; 1998, *39,* 241,

[79] Henklein, P.; Ionescu, D.; El-Faham, A.; Wenschuh, H.; Bienert, M.; Carpino, L. A.; Beyermann, M.; Hrsg.: Epton, R.: Innovations and Perspectives in Solid Phase Synthesis; Birmingham, Mayflower Scientific, 1998 221,

[80] Du Vigneaud, D.; Popenoe, E. A.; J. Am. Chem. Soc.; 1954, *76,* 6202,

[81] Greene, T. W.; Wuts, P. G. M.; Protective Groups in Organic Synthesis; 2. Aufl. New York, Wiley, 1991 379,

[82] Roemmele, R. C.; Rapoport, H.; J. Org. Chem.; 1988, *53,* 2367,

[83] Yajima, H.; Takeyama, M.; Kanaki, J.; Mitani, K.; J. C. S. Chem. Comm.; 1978, 482,

[84] Atherton, E.; Logan, C. J.; Sheppard, R. C.; J. Chem. Soc. Perkin Trans. I; 1981, 538,

[85] Ramage, R.; Green. J.; Tetrahedron Lett.; 1987, *28,* 2287,

[86] Wisniewski, K.;Kolodziejczyk, A. S.; Tetrahedron Lett.; 1997, *38,* 483,

[87] Fukuyama, T.; Jow, C.-K.; Cheung, M.; Tetrahedron Lett.; 1995, *36,* 6373,

[88] Fukuyama, T.; Cheung, M.; Jow, C.-K.; Hidai, Y.; Kann, T.; Tetrahedron Lett.; 1997, *38,* 5831,

[89] Miller, S. C.; Scanlan, T. S.; J. Am. Chem. Soc.; 1998, *120,* 2690,

[90] Wenschuh, H.; Ionescu, D.; Beyermann, M.; Bienert, M.; Carpino, L. A.; Hrsg.: Ramage, R.; Epton, R.: Peptides 1996; Kingswinford, Mayflower Scientific, 1998 907,

[91] Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Winter, R.; Bienert, M.; Ionescu, D.; Carpino, L. A.; Tetrahedron Lett.; 1996, *37,* 5483,

[92] Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Bienert, M.; El-Faham, A.; Ghassemi, S.; Carpinmoi, L. A.; Hrsg.: Pravin, T. P.; Hodges, R. S.: Peptides: Chemistry and Biology; Mayflower Scientific, 1996 33,

[93] Carpino, L. A.; Shroff; H.; Triolo, S. A.; Mansour, E.-S. M. E.; Wenschuh, H.; Albericio, F.; Tetrahedron Lett.; 1993, *34,* 7829,

[94] Brückner, H.; könig, W. A.; Greiner, M.; Jung, G.; Angew. Chem.; 1979, *91,* 508,

[95] Brückner, H.; Jung, G.; Liebigs Ann. Chem.; 1982, 1677,

[96] Schmitt, H.; Jung, G.; Liebigs Ann. Chem.; 1985, 321,

[97] Slomcynska, U.; Beusen, D. D.; Zabrocki, J.; Kociolek, K.; Redlinski, A.; Reusser, F.; Hutton, W. C.; Leplawy, M. T.; Marshall, G. R.; J. Am. Chem. Soc.; 1992, *114,* 2095,

[98] Miller, S. C.; Scanlan, T. S.; J. Am. Chem. Soc.; 1997, *119,* 2301,

[99] Pass, S.; Amint, B.; Patchornik, A.; J. Am. Chem. Soc.; 1981, *103,* 7674,

[100] Matsuda, F.; Itoh, S.; Hattori, N.; Yanagiya, M.; Matsumoto, T.; Tetrahedron; 1985, *41,* 3631,

[101] Matsuda, F.; Yanagiya, M.; Matsumoto, T.; Tetrahedron Lett.; 1982, *23,* 4043,

[102] Falb, E.; Yechezkel, T.; Salitra, Y.; Gilon, C.; J. Peptide Res.; 1999, *53,* 1,

[103] Heinrich, N.; Meyer, M. R.; Furkert, J.; Sasse, A.; Beyermann, M.; Bönigk, W.; Berger, H.; Endocrinology; 1998, *139,* 651,

[104] Beyermann, M.; J. Med. Chem.; 1996, *39,* 3324,

[105] Rothemund, S.; Krause, E.; Beyermann, M.; Bienert, M.; J. Peptide Res.; 1997, *50,* 184,

[106] Beyermann, M.; eingereicht;

[107] Kaiser, R. E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I.; Analyt. Biochem.; 1970, *34,* 595,

[108] Wuts, P. G. M.; Northius, J. M.; Tetrahedron Lett.; 1998, *39,* 3889,

[109] Larsen,D.B.; Christensen, D. H.; Holm, A.; Zillmer, R.; Nielsen, O. F.; J. Am. Chem. Soc.; 1993, *115,* 6247,

[110] Kusumoto, S.; Matsukura, M.; Shiba, T.; Biopolymers; 1981, *20,* 1869,

[111] Frank, H.; Nicholson, G. J.; Bayer, E.; J. Chromatogr. Sci.; 1977, *15,* 174,

[112] Muth, F.; Funktionelle Aminosäurederivate der Arylsulfonsäuren; Band Bd. IX; 4. Aufl. Houben-Weil,

[113] Panquet, A.; Chen, F. M. F.; Benoiton, N. L.; Can. J. Chem.; 1984, *62,* 1335,

[114] Meldal, M.; Jullano, M. A.; Jansson, A. M.; Tetrahedron Lett.; 1997, *38,* 2531,

Anhang

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren, herzlich bedanken.

Besonderer Dank gilt meinen Betreuern Herrn Prof. M. Bienert und Herrn Dr. M. Beyermann für die Bereitstellung der interessanten Thematik, ihre Anteilnahme am Fortgang der Arbeiten und ihre ständige Gesprächsbereitschaft. Besonders der scheinbar nie versiegende Optimismus von Herrn Dr. Beyermann war mir eine große Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. L. A. Carpino für sein Interesse an meinen Arbeiten und die anregenden Gespräche und Hinweise.

Sven Rothemund möchte ich für die Hilfe bei Computerfragen und seine Disskusionsbereitschaft danken. Bei Frau H. Hans und Frau A. Klose möchte ich mich für die geleistete technische Unterstützung bedanken.

Bei Dr. R. Winter und Frau Schlegel bedanke ich mich für die Anfertigung von NMR-Spektren und die Unterstützung bei deren Auswertung. Für die Durchführung der zahlreichen massenspektrometrischen Untersuchungen möchte ich Herrn Dr. E. Krause, Herrn D. Runald und Frau H. Lerch danken. Frau H. Nikolenko und Frau D. Smetan danke ich für die Aufnahme der CD-Spektren.

Bei Angelika Ehrlich, Monika Georgi sowie dem gesamten „Labor 40“ möchte ich mich dafür bedanken, daß sie ein offenes Ohr für alle Fragen hatten, über manche Durststrecke hinwegtrösteten und es in jeglicher Hinsicht nicht an Unterstützung fehlen ließen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich in jeder Beziehung unterstützte.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchte ich für die Gewährung eines zweijährigen Forschungsstipendiums danken.

Eidestattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Michael Bienert und Herrn Dr. Michael Beyermann in der Zeit von Januar 1996 bis Juni 1999 am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie in Berlin angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Weder diese noch eine andere Arbeit wurde von mir an einer anderen Universität oder Hochschule zum Zwecke der Einleitung eines Promotionsverfahrens vorgelegt.