

Neuropeptid Y Y₁-Rezeptorantagonisten der Argininamid-Reihe: Entwicklung von Synthesemethoden an polymeren Trägern und Strategien zur Herstellung von Radioliganden

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie -
der Universität Regensburg



vorgelegt von

Florian Graichen

aus Willmering

2002

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht im Mai 2002.

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2002

Prüfungsausschuss:	Prof. Dr. S. Elz	(Vorsitzender)
	Prof. Dr. A. Buschauer	(Erstgutachter)
	Prof. Dr. J. Sauer	(Zweitgutachter)
	Prof. Dr. C. Steinem	(Drittprüfer)

Für meine Eltern

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Mai 1999 bis Mai 2002 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Buschauer am Institut für Pharmazie der Naturwissenschaftlichen Fakultät VI – Chemie und Pharmazie – der Universität Regensburg.

An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei:

- Herrn Prof. Dr. A. Buschauer für die interessante Themenstellung, seine wissenschaftlichen Anregungen, Diskussionen und seine Förderung
- Herrn Prof. Dr. E. v. Angerer für seine Hilfe bei wissenschaftlichen Problemen
- Herrn Prof. Dr. S. Dove für die Durchführung von Molecular Modeling Untersuchungen
- Herrn PD Dr. G. Bernhardt für seine Unterstützung bei analytischen und pharmakologischen Problemen
- Frau E. Schreiber und Herrn E. Schneider für die Betreuung der pharmakologischen Testung und für die Durchführung der Ca^{2+} -Assays
- Frau S. Bollwein für die HPLC-Untersuchung zur stereochemischen Reinheit der Argininamide
- Herrn S. Braun für das Korrekturlesen dieser Arbeit
- Herrn J. Rewitzer und Herrn S. Heini für die stets gute Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Ausbildung
- Herrn Dr. T. Burgemeister und seinem Team für die Aufnahme der NMR-Spektren
- Herrn Dr. K. Mayer, Herrn J. Kiermeier und Herrn W. Söllner für die Aufnahme der Massenspektren
- Herrn G. Wandinger und Herrn H. Schüller für die Durchführung der Elementaranalysen
- Frau S. Ruider und Herrn P. Richtig für die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung in vielen organisatorischen Dingen

- Frau E. Peutler für die moralische Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit
- Frau Dr. I. Aiglstorfer, Herrn Dr. K.-C. Bart, Herrn Dr. A. Bauer, Herrn Dr. S. Fellner, Herrn Dr. U. Gürtler, Herrn M. Hofmann, Herrn Dr. M. Oettl und Herrn T. Schindler für zahlreiche unterhaltsame Gespräche während der Mittagspause und für manche gesellige Runde
- Allen Mitgliedern des Arbeitskreises für das angenehme Arbeitsklima
- Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. C. Götte und Herrn Dr. C. Hutzler, meinen Laborkollegen, für stete Heiterkeit, Hilfsbereitschaft, viele private und wissenschaftliche Gespräche und für diverse unvergessliche Abende während der letzten drei Jahre

Publikationen und Abstracts:

- Graichen F., Schalkhaußer F., Buschauer A.: A new method for the solid phase synthesis of N,N'-disubstituted guanidines: preparation and reactions of polymer-linked diphenyl carbonimidate. International Combinatorial Chemistry Symposium, Tübingen 1999, Abstract
- Graichen F. and Buschauer A.: Solid phase synthesis of monosubstituted guanidines using polymer-linked diphenylcarbonimidate. International Combinatorial Chemistry Symposium, Tübingen 1999, Abstract
- Graichen F., Hutzler C., Buschauer A.: A new method for the solid phase synthesis of argininamide-type neuropeptide Y Y₁ antagonists. Jahrestagung der DPhG in Halle, Germany, 10.-13. October 2001, Abstracts, C15, Arch. Pharm. 334, Suppl.2, 2001
- Hutzler C., Kracht J., Mayer M., Graichen F., Bauer B., Schreiber E., Bollwein S., Bernhardt G., Dove S., Fricker G., Buschauer A.: N^G-acylated argininamides: Highly potent selective NPY Y₁ receptor antagonists with special properties. Jahrestagung der DPhG in Halle, Germany, 10.-13. October 2001, Abstracts, V1-14, Arch. Pharm. 334, Suppl.2, 2001

**Nicht alles, was zählt, kann gezählt werden,
und nicht alles was gezählt werden kann, zählt**

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Neuropeptid Y (NPY)	2
1.1.1	Wirkungen von NPY	3
1.1.1.1	ZNS-vermittelte Wirkungen	3
1.1.1.2	Wirkungen in der Peripherie	5
1.1.2	NPY –Rezeptorsubtypen	6
1.1.2.1	Y ₁ -Rezeptor	8
1.1.2.2	Weitere NPY –Rezeptorsubtypen	9
1.1.3	NPY Y ₁ -Rezeptorantagonisten	11
1.2	Festphasensynthese von Guanidinen	15
1.2.1	Guanidierungssynthesen mit polymergebundenen Carbodiimiden	16
1.2.2	Guanidinsynthese mit polymergebundenen Thioharnstoffen	17
1.2.3	Verwendung von polymergebundenem Diphenylimidocarbonat	24
1.2.4	Verwendung von polymergebundenem 1 <i>H</i> -pyrazol-1-carboxamidin	25
2	Problemstellung	27
3	Chemischer Teil	30
3.1	Synthese von Argininamiden am Merrifield-Harz	31
3.1.1	Darstellung der verwendeten Linker (δ -Hydroxy- α -aminosäuren)	31
3.1.1.1	Synthese von (<i>R</i>)-2-(9 <i>H</i> -Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-5-hydroxypentansäure- <i>tert</i> -butylester (2) ausgehend von (<i>R</i>)-Glutaminsäure- α - <i>tert</i> -butylester	32
3.1.1.1.1	Herstellung von (<i>R</i>)- <i>N</i> -(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)glutaminsäure- α - <i>tert</i> -butylester (1)	32
3.1.1.1.2	Herstellung von (<i>R</i>)-2-(9 <i>H</i> -Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-5-hydroxypentansäure- <i>tert</i> -butylester (2)	33
3.1.1.2	Synthese von (<i>R</i>)-2-[(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)amino]-5-hydroxypentansäure- <i>tert</i> -butylester (7) ausgehend von (<i>R</i>)-Glutaminsäure	34
3.1.1.2.1	Darstellung von (<i>R</i>)-Glutaminsäure- γ -methylester (3)	34
3.1.1.2.2	Synthese von (<i>R</i>)- <i>N</i> -(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)glutaminsäure- γ -methylester (4)	34

3.1.1.2.3	Darstellung von (<i>R</i>)- <i>N</i> -(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)glutaminsäure- α - <i>tert</i> -butyl- γ -methylester (5)	35
3.1.1.2.4	Spaltung des Methylesters von 5 zum (<i>R</i>)- <i>N</i> -(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)glutaminsäure- α - <i>tert</i> -butylester (6)	36
3.1.1.2.5	Herstellung von (<i>R</i>)-2-[(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)amino]-5-hydroxypentansäure- <i>tert</i> -butylester (7)	36
3.1.2	Synthese der Arylalkansäuresuccinimidylester 8-11	37
3.1.3	Festphasensynthese am Merrifield-Harz	38
3.1.3.1	Herstellung von polymergebundenem <i>N,N'</i> -Bis(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)isothioharnstoff (P3)	39
3.1.3.2	Herstellung und Reaktionsverhalten von polymergebundenem (<i>R</i>)-5-[Bis(Boc)isothioureido]-2-(Fmoc-amino)pentansäure- <i>tert</i> -butylester (P4)	40
3.1.3.3	Festphasensynthese des Argininamids 18 am Merrifield Harz	41
3.2	Synthese von Argininamiden am Rink Amid-Harz	48
3.2.1	Synthese von (<i>R</i>)- <i>N</i> $^{\alpha}$ -(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)ornithin-(9-fluorenylmethyl)ester (20)	48
3.2.1.1	Veresterung von (<i>R</i>)- <i>N</i> $^{\alpha}$ -Fmoc- <i>N</i> $^{\delta}$ -Boc-ornithin mit 9-Hydroxymethylfluoren	48
3.2.1.2	Abspaltung der Boc-Schutzgruppe von (<i>R</i>)- <i>N</i> $^{\alpha}$ -Fmoc- <i>N</i> $^{\delta}$ -Boc-ornithin-(9-fluorenylmethyl)ester (19)	49
3.2.2	Synthese von Fluorenylmethoxycarbonylisothiocyanat (21)	50
3.2.3	Synthese von 4-Hydroxybenzylamin (22)	50
3.2.4	Darstellung von polymergebundenen <i>N</i> -Alkoxycarbonyl- und <i>N</i> -Alkyl-S-methylisothioharnstoffen (P16 , P18)	51
3.2.5	Synthese der <i>N</i> G -alkyl- bzw. <i>N</i> G -estersubstituierten Argininamide 26 und 27	53
3.3	Synthese von argininhaltigen Peptiden und Argininamiden am Wang-Harz	57
3.3.1	Synthese der substituierten S-Methylisothioharnstoffe	57
3.3.1.1	Herstellung von S-Methylisothiuroniumiodid (28)	57
3.3.1.2	Synthese der S-Methylisothioharnstoff- <i>N</i> -carbonsäureester 29 und 30	58
3.3.1.3	Synthese der <i>N</i> -Acyl-S-methylisothioharnstoffe 31 und 32	58
3.3.1.4	Herstellung des aminocarbonylsubstituierten S-Methylisothioharnstoffs 33	59
3.3.1.5	Synthese von <i>N</i> -Ethoxycarbonyl-S-methylisothioharnstoff (35)	59
3.3.2	Synthese von 4-Aminomethylbenzylalkohol (36)	60
3.3.3	Darstellung der argininhaltigen Peptide und Argininamide	60

3.3.3.1	Synthese von polymergebundenen substituierten S-Methylisothioharnstoffen am Wang-Harz	60
3.3.3.2	Umsetzung der polymergebundenen S-Methylisothioharnstoffe P28-P34 mit dem Ornithinlinker 20	62
3.3.3.3	Abspaltung der Fmoc/Fm-Schutzgruppen von den Polymeren P35-P41	63
3.3.3.4	<i>N</i> ^α -Acylierung der polymergebundenen Argininderivate	64
3.3.3.5	Amidierung der polymergebundenen Argininderivate	67
3.3.3.6	Abspaltung der Argininderivate 26, 37-68 vom Polymer	71
3.3.4	Vergleich der Ausbeuten an abgespaltenen Zwischenprodukten	76
3.3.5	HPLC-Untersuchung der Argininamide	77
3.4	Untersuchungen zur Darstellung eines Y₁-Rezeptor-selektiven Radioliganden ausgehend von (<i>R</i>)-Argininamiden	81
3.4.1	Synthese von (<i>R</i>)- <i>N</i> ^α -Diphenylacetyl- <i>N</i> -[(4-hydroxyphenyl)methyl]ornithinamid	82
3.4.1.1	Herstellung von (<i>R</i>)- <i>N</i> ^α -Benzyloxycarbonyl- <i>N</i> ^δ - <i>tert</i> -butoxycarbonylornithin (69)	82
3.4.1.2	Herstellung von (<i>R</i>)- <i>N</i> ^α -Benzyloxycarbonyl- <i>N</i> ^δ - <i>tert</i> -butoxycarbonyl- <i>N</i> -[(4-methoxyphenyl)methyl]ornithinamid (70)	83
3.4.1.3	Herstellung von (<i>R</i>)- <i>N</i> ^δ - <i>tert</i> -Butoxycarbonyl- <i>N</i> -[(4-methoxyphenyl)methyl]ornithinamid (71)	84
3.4.1.4	<i>N</i> ^α -Acylierung des <i>N</i> ^δ -geschützten Ornithinamids (71)	85
3.4.1.5	Herstellung des Ornithinamids 73	85
3.4.2	Herstellung von <i>N</i> -[5-(<i>tert</i> -Butoxycarbonylamino)pentanoyl]-S-methylisothioharnstoff	86
3.4.2.1	Synthese von 5-(<i>tert</i> -Butoxycarbonylamino)pentansäure (74)	86
3.4.2.2	Herstellung von 5-(<i>tert</i> -Butoxycarbonylamino)pentansäuresuccinimidylester (75)	87
3.4.2.3	Synthese von <i>N</i> -[5-(<i>tert</i> -Butoxycarbonylamino)pentanoyl]-S-methylisothioharnstoff (76)	87
3.4.3	Darstellung von (<i>R</i>)- <i>N</i> ^ε -[5-(<i>tert</i> -Butoxycarbonylamino)pentanoyl]- <i>N</i> ^δ -diphenylacetyl- <i>N</i> -[(4-hydroxyphenyl)methyl]argininamid (77)	88
3.4.3.1	Aminolyse des <i>N</i> -Acyl-S-Methylisothioharnstoffs 76 mit dem Ornithinamid 73	88
3.4.3.2	Abspaltung der Boc-Schutzgruppe vom Argininamid 77	89
3.4.4	Untersuchungen zur Darstellung potentieller Radioliganden	89
3.4.4.1	Herstellung von Succinimidylpropionat (79)	90
3.4.4.2	Herstellung von „kaltem“ BOLTON-HUNTER-Reagenz	90

3.4.4.3	Darstellung der Propionsäure- bzw. BOLTON-HUNTER-modifizierten Argininamide 82 und 83	92
3.4.4.4	Synthese eines fluorierten Y_1 -Rezeptorliganden	93
3.4.4.5	Voruntersuchungen zur Tritiierung durch hydrogenolytische Dehalogenierung	95
4	Pharmakologischer Teil	96
4.1	4.1 Bestimmung der Y_1-antagonistischen Wirkung	96
4.1.1	Y_1 -Antagonismus an HEL-Zellen (Ca^{2+} -Assay)	96
4.1.2	Y_1 -Radioligand-Bindungsassay an SK-N-MC-Zellen	99
4.2	Y_2-Radioligand-Bindungsassay an SMS-KAN-Zellmembranen	99
4.3	Y_5-Radioligand-Bindungsassay an HEC-1B-Zellen	99
4.3.1	Berechnung von IC_{50} -Werten aus Kompetitionskurven im Radioligand-Bindungsassay	100
4.3.2	Berechnung von K_i -Werten	100
4.4	Pharmakologische Wirkung der synthetisierten Argininamide	101
4.5	Diskussion der Struktur-Wirkungs-Beziehungen	106
4.5.1	N^G -unsubstituierte Argininamide	106
4.5.2	N^G -substituierte Argininamide	110
4.5.2.1	N^G -alkylsubstituierten Argininamide	111
4.5.2.2	N^G -Ester- und N^G -acetylsubstituierte Argininamide	112
4.5.2.3	N^G -Carbamoylsubstituierte Argininamide	115
4.5.3	Molecular Modeling-Untersuchungen zur Y_1 -Rezeptorbindung des Argininamids 82	116
5	Zusammenfassung	122
6	Experimenteller Teil	128
6.1	Allgemeine Bedingungen	128
6.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel	128
6.1.2	Geräte	128

6.2	Synthese von N^α-Arylalkanoylargininamiden am Merrifield-Harz	130
6.2.1	Darstellung der di-geschützten δ -Hydroxyaminosäuren (Linker)	130
6.2.1.1	Synthese von (<i>R</i>)-2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-5-hydroxypentansäure <i>tert</i> -butylester (2)	130
6.2.1.1.1	Darstellung von (<i>R</i>)- <i>N</i> -(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)glutaminsäure- α - <i>tert</i> -butyl-ester (1)	130
6.2.1.1.2	Darstellung von (<i>R</i>)-2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-5-hydroxypentansäure- <i>tert</i> -butylester (2)	131
6.2.1.2	Synthese von (<i>R</i>)-2-[(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)amino]-5-hydroxypentansäure- <i>tert</i> -butylester (7)	132
6.2.1.2.1	Darstellung von (<i>R</i>)-Glutaminsäure- γ -methylester (3) • HCl	132
6.2.1.2.2	Synthese von (<i>R</i>)- <i>N</i> -(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)glutaminsäure- γ -methylester (4)	133
6.2.1.2.3	Darstellung von (<i>R</i>)- <i>N</i> -(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)glutaminsäure- α - <i>tert</i> -butyl- γ -methyl-ester (5)	133
6.2.1.2.4	Darstellung von (<i>R</i>)- <i>N</i> -(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)glutaminsäure- α - <i>tert</i> -butylester (6)	134
6.2.1.2.5	Darstellung von (<i>R</i>)-2-[(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)amino]-5-hydroxypentansäure- <i>tert</i> -butylester (7)	135
6.2.2	6.2.2 Synthese der Arylalkansäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-ester (8-11)	136
6.2.3	Festphasensynthese der N^α -Arylalkanoylargininamide	139
6.3	Synthese von N^G-alkylsubstituierten und N^G-estersubstituierten Argininamiden am Rink Amid Harz	146
6.3.1	Darstellung von (<i>R</i>)- N^α -(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-ornithin-9-fluorenylmethylester-trifluoracetat (20 • CF ₃ COOH)	146
6.3.1.1	Darstellung von (<i>R</i>)- N^δ -(<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)- N^α -(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-ornithin-9-fluorenylmethylester (19)	146
6.3.1.2	Darstellung von (<i>R</i>)- N^α -(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-ornithin-9-fluorenylmethylester-trifluoracetat (20 • CF ₃ COOH)	147
6.3.2	Darstellung von Fluorenylmethoxycarbonylisothiocyanat (21)	147
6.3.3	Darstellung von 4-Hydroxybenzylamin (22)	148
6.3.4	Festphasensynthese der N^G -estersubstituierten und N^G -alkylsubstituierten Argininamide (26 und 27)	150

6.4	Synthese von <i>N</i>-mono- bzw. <i>N,N'</i>-disubstituierten Argininamiden und argininhaltigen Tri- bzw. Pentapeptiden am Wang Harz	157
6.4.1	Synthese der <i>S</i> -Methylisothioharnstoffe	157
6.4.1.1	Darstellung von <i>S</i> -Methylisothiuroniumiodid (28 • HI)	157
6.4.1.2	Darstellung der <i>S</i> -Methylisothioharnstoff- <i>N</i> -carbonsäureester 29 und 30	157
6.4.1.3	Darstellung der <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -Methylisothioharnstoffe 31 und 32	159
6.4.1.4	Darstellung von <i>N</i> -{[5-(Ethoxycarbonyl)pentyl]aminocarbonyl}- <i>S</i> -methylisothioharnstoff (33)	160
6.4.1.5	Darstellung von <i>N</i> -Ethoxycarbonyl- <i>S</i> -methylisothioharnstoff (35)	161
6.4.2	Darstellung von 4-Aminomethylbenzylalkohol (36)	162
6.4.3	Durchführung der Festphasensynthese von monosubstituierten Guanidinen, Tri- und Pentapeptiden am <i>p</i> -Nitrophenylcarbonat Wang-Harz	163
6.4.3.1	Monosubstituierte Guanidine 37-43	168
6.4.3.2	Tripeptide 44-49	172
6.4.3.3	Pentapeptide 50-55	175
6.4.4	Durchführung der Festphasensynthese von disubstituierten Guanidinen am para-Nitrophenylcarbonat Wang-Harz	179
6.4.5	HPLC-Untersuchung zur Bestimmung der stereochemischen Reinheit der Argininamide und Peptide 38, 43, 46, 50, 60, 68	194
6.5	Darstellung nicht strahlender (kalter) Analoga potentieller Radioliganden für NPY Y₁-Rezeptoren	195
6.5.1	Synthese des Ornithinamids 73 • HBr	195
6.5.1.1	Synthese von (<i>R</i>)- <i>N</i> ^α -Benzyloxycarbonyl- <i>N</i> ^δ - <i>tert</i> -Butoxycarbonylornithin (69)	195
6.5.1.2	Darstellung von (<i>R</i>)- <i>N</i> ^α -Benzyloxycarbonyl- <i>N</i> ^δ - <i>tert</i> .-butoxycarbonyl- <i>N</i> -[(4-methoxyphenyl)methyl]ornithinamid (70)	196
6.5.1.3	(<i>R</i>)- <i>N</i> ^δ - <i>tert</i> -butoxycarbonyl- <i>N</i> -[(4-methoxyphenyl)methyl]ornithinamid (71)	197
6.4.1.4	(<i>R</i>)- <i>N</i> ^δ - <i>tert</i> -Butoxycarbonyl- <i>N</i> ^α -diphenylacetyl- <i>N</i> -[(4-methoxyphenyl)methyl]ornithinamid (72)	197
6.5.1.5	(<i>R</i>)- <i>N</i> ^α -Diphenylacetyl- <i>N</i> -[(4-hydroxyphenyl)methyl]ornithinamid (73)	198
6.5.2	Synthese des Guanylierungsmittels <i>N</i> -[5-(<i>tert</i> -Butoxycarbonylamino)pentanoyl]- <i>S</i> -methylisothioharnstoff	199
6.5.2.1	Darstellung von (<i>N</i> - <i>tert</i> -butoxycarbonylamino)pentansäure (74)	199
6.5.2.2	(<i>tert</i> -Butoxycarbonylamino)pentansäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-ester (75)	200
6.5.2.3	<i>N</i> -[<i>tert</i> -Butoxy-carbonylamino)pentanoyl]- <i>S</i> -methylisothioharnstoff (76)	200
6.5.3	Synthese von (<i>R</i>)- <i>N</i> ^G -(5-Aminopentanoyl)- <i>N</i> ^α -diphenylacetyl- <i>N</i> -[(4-hydroxyphenyl)methyl]argininamid 78	201

6.5.3.1	(<i>R</i>)- <i>N</i> ^G -[5-(<i>tert</i> -Butoxycarbonylamino)pentanoyl]- <i>N</i> ^α -diphenylacetyl- <i>N</i> -[(4-hydroxyphenyl)methyl]argininamid (77)	201
6.5.3.2	(<i>R</i>)- <i>N</i> ^G -(5-Aminopentanoyl)- <i>N</i> ^α -diphenylacetyl- <i>N</i> -[(4-hydroxyphenyl)methyl]argininamid (78)	202
6.5.4	Synthese der „kalten“ Markierungsreagenzien 79 und 81	203
6.5.4.1	Propansäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-ester (79)	203
6.5.4.2	Darstellung von BOLTON-HUNTER-Reagenz (81)	203
6.5.5	Untersuchungen zur Herstellung potentieller Radioliganden	205
6.5.5.1	Herstellung der <i>N</i> ^G -(5-Amidopentanoyl)argininamide 82 , 83	205
6.5.5.2	(<i>R</i>)- <i>N</i> ^α -Diphenylacetyl- <i>N</i> -[(4-hydroxyphenyl)methyl]- <i>N</i> ^G -[5-(4-Fluorbenzamido)pentanoyl]argininamid (86)	206
6.5.5.3	Hydrogenolyse von 64 zu (<i>R</i>)- <i>N</i> ^α -Diphenylacetyl- <i>N</i> ^G -ethoxycarbonyl- <i>N</i> -[(4-hydroxyphenyl)methyl]argininamid (26)	207
6.6	Pharmakologische Testung	209
6.6.1	Untersuchung der NPY Y ₁ -antagonistischen Aktivität an HEL-Zellen	209
6.6.1.1	Vorbereitung der Reagenzien	209
6.6.1.2	Testung der NPY-Antagonisten	210
6.6.2	Y ₁ -Bindungsassay mit intakten SK-N-MC-Zellen	212
6.6.3	Y ₂ -Bindungsassay an SMS-KAN-Zellmembranen	213
6.6.4	Y ₅ -Radioligand-Bindungsassay an stabil transfizierten HEC-1B-Zellen	214
6.6.5	Assay zur Bestimmung der 3',5'-cAMP-Konzentration in Zellen	214
6.6.5.1	Versuchsprinzip	214
6.6.5.2	Stimulation der Zellen	216
6.6.5.3	Probenaufbereitung	217
6.6.5.4	Durchführung des cAMP-Assays	217
6.6.5.5	Geräteeinstellungen	218
6.6.5.6	Berechnungen	218
6.6.5.6.1	Berechnung des cAMP-Gehaltes	218
6.6.5.6.2	Berechnung der prozentualen Hemmung der cAMP Bildung	219
7	Literaturverzeichnis	220

Abkürzungsverzeichnis

Ahx	6-Aminohexansäure
APP	Avian pancreatic polypeptide
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BSA	Bovine serum albumine
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
cAMP	Zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CDI	<i>N, N'</i> -Carbonyldiimidazol
d	Tag
DCC	<i>N, N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylamin
DMF	<i>N, N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Fm	9-Fluorenylmethyl
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
h	Stunde
HEL-Zellen	Human erythroleukemia cells
HPLC	High-performance liquid chromatography
Im	Imidazol
i. Vak	im Vakuum
LHRH	Luteotropes-Hormon-Releasing-Hormon
NAC	<i>N</i> -Acetyl- <i>L</i> -cystein
Naphth.	Naphthyl
NPY	Neuropeptid Y
OPA	<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd
Pht	Phthaloyl
Pip.	Piperidin
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
PMSF	Pentamethylsulfonylfluorid
pNPY	Neuropeptid Y (Schwein)
PP	Pankreatisches Polypeptid
PPA	Polyphosphorsäure
Py	Pyridin
Pyr	Pyrazol

PYY	Peptid YY
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SPS	Solid phase synthesis
TBTU	2-[(1 <i>H</i>)-Benzotriazol-1-yl]-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluorborat
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Z	Benzyloxycarbonyl
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Die Arzneimittelforschung hat in den letzten Jahrzehnten vor dem Hintergrund des *Humanen Genom-Projektes* durch die Entwicklung miniaturisierter hochdurchsatzfähiger biologischer Assays und die rasanten Fortschritte der molekularbiologischen Forschung bei der Aufklärung interessanter „neuer“ biologischer Zielstrukturen (Targets) einen „methodischen Paradigmenwechsel“ erfahren. Die enorme Beschleunigung der Methoden zur pharmakologischen Untersuchung potentieller Wirkstoffe („High-Throughput-Screening“) führt dazu, dass die konventionelle organisch-chemische Synthese erstmals in der Wirkstoffforschung an ihre Grenzen stößt. Anstelle der traditionellen Vorgehensweise, eine Substanz nach der anderen zu synthetisieren, gewinnen daher zunehmend Methoden an Bedeutung, mit denen es gelingt, möglichst viele unterschiedliche Substanzen mit definierter Struktur gleichzeitig bzw. parallel herzustellen [Adang und Hermkens, 2001]. Die Kombinatorische Synthese trägt mittlerweile mit der Herstellung von Substanzbibliotheken - sowohl in Lösung als auch an Festphasen – entscheidend zur Beseitigung des Engpasses bei [Guillier et al., 2000]. Die kombinatorische Synthese an polymeren Trägern, in der Peptidchemie seit langer Zeit praktiziert und perfektioniert, hat sich seit den frühen 90er Jahren auch im Bereich der Nichtpeptide zu einer ernstzunehmenden Methode in der Wirkstoffforschung entwickelt. Allerdings können die Methoden der konventionellen Synthese in Lösung meist nicht einfach auf die Festphase übertragen werden, d. h. es muss in der Regel für jede Substanzklasse erst eine geeignete Synthesestrategie an polymeren Trägern erarbeitet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Synthesemethode entwickelt werden, die es erlaubt, die Vorteile der Festphasensynthese zur Darstellung von Neuropeptid Y Y₁-Rezeptorantagonisten mit Guanidin-Partialstruktur zu nutzen. Aus diesem Grund wird zunächst ein kurzer Überblick über die Pharmakologie von Neuropeptid Y (NPY) bzw. NPY-Rezeptorantagonisten sowie über den aktuellen Stand der Festphasensynthese von Guanidinen gegeben.

1.1 Neuropeptid Y (NPY)

Neuropeptid Y (NPY), ein aus 36 Aminosäuren bestehendes Peptid, wurde 1982 erstmals von TATEMOTO aus Schweinehirn isoliert [Tatemoto et al., 1982]. NPY gehört zur Familie der „pancreatic polypeptides“, zu der auch das Peptid YY (PYY) und das pankreatische Polypeptid (PP), von dem sich der Name der Peptidfamilie ableitet, gezählt werden [Kimmel und Pollok, 1971]. Im Gegensatz zu PP und PYY, die Hormoncharakter besitzen, fungiert NPY als Neurotransmitter. NPY, dessen Entwicklungslinie sich über mehr als 400 Millionen Jahre zurückverfolgen lässt, ist eines der am besten konservierten Peptide [Larhammer et al., 1993]. Es gilt als das am häufigsten vorkommende Neuropeptid im Säugetiergehirn.

Die vielfältigen Wirkungen von NPY werden durch mindestens sechs NPY-Rezeptorsubtypen vermittelt, die alle zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Membranrezeptoren gehören (kloniert: Y_1 , Y_2 , Y_4 , Y_5 , y_6 und Y_7 ; Y_3 : postuliert aufgrund pharmakologischer Untersuchungen) [Michel et al. 1998; Herzog, 2000]. Sowohl zur pharmakologisch eindeutigen Charakterisierung der Subtypen als auch zur Klärung der physiologischen Rolle von NPY an diesen Rezeptoren sind potente und selektive Liganden, sowohl Agonisten als auch Antagonisten, erforderlich.

NPY ist an der Steuerung einer Vielzahl von biologischen Prozessen sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem beteiligt, z.B. an der zentralen Regulation des Blutdrucks, der Sexualhormonfreisetzung und der Nahrungsaufnahme [Munglani et al., 1996]. In der Peripherie ist Neuropeptid Y beispielsweise aufgrund der Stimulation postsynaptischer Y_1 -Rezeptoren ein potenter Vasokonstriktor, während der Angriff an präsynaptischen Y_2 -Rezeptoren zu einer Hemmung der Neurotransmission führt.

1.1.1 Wirkungen von NPY

1.1.1.1 ZNS-vermittelte Wirkungen

Von NPY können durch Angriff an Rezeptoren im Gehirn verschiedenartige, teils gegensätzliche Wirkungen ausgelöst werden, z.B. Anxiolyse und Sedation [Heilig et al., 1993], Steigerung der Gedächtnisleistung [Flood and Morley, 1989], vermehrte oder verringerte Nahrungsaufnahme [Stanley und Leibowitz, 1985], Hypertension oder Hypotension [Cross et al., 1996], Veränderung der Herzfrequenz, Stimulation der Gonadorelin- [Kalra et al., 1991] und der Insulinfreisetzung [Wilding et al., 1995] sowie die Hemmung der Sekretion von Wachstumshormonen (GH) [Pierroz et al., 1995].

Entscheidend für die Qualität des beobachteten Effektes von NPY auf den Organismus ist der Applikationsort im Gehirn. So verursacht beispielsweise die Gabe in den hinteren Hypothalamus einen Anstieg des arteriellen Blutdrucks, während die Injektion in den Nucleus tractus solitarii zur Senkung von Blutdruck und Herzfrequenz führt [Michel und Buschauer, 1992].

Die Injektion kleiner Dosen NPY in den Nucleus amygdalae ruft einen anxiolytischen Effekt hervor, höhere Dosierungen wirken sedierend [Heilig et al., 1989]. Beim Menschen konnte ein Zusammenhang zwischen dem NPY-Spiegel in der Cerebrospinalflüssigkeit und dem Schweregrad von Angstzuständen hergestellt werden [Doetsch et al., 1997; Ekman et al., 1996].

Besonderes Interesse, vor allem seitens der Wirkstoffforschung, gilt seit geraumer Zeit der zentralen Rolle von NPY in der Regulation der Nahrungsaufnahme. Die Untersuchungen zur Wirkung verschiedener NPY-Antagonisten auf die Nahrungsaufnahme in Ratten ergaben, dass der Y_1 -Rezeptoragonist $[\text{Leu}^{31}, \text{Pro}^{34}]$ -NPY die Nahrungsaufnahme im Gegensatz zum Y_2 -Rezeptoragonisten NPY_{13-36} stimulierte (Kalra et al., 1991). Selektive und potente NPY Y_1 -Rezeptorantagonisten hemmen die NPY-induzierte Nahrungsaufnahme von Nagern [Wieland et al., 1998; Hipskind et al., 1997]. Es wird vermutet, dass zumindest ein Teil des orexigenen Effekts über den Y_1 -Rezeptor vermittelt wird. NPY_{13-36} , obwohl es eine hohe Affinität zum Y_5 -Rezeptor besitzt, konnte die Futtersaufnahme nicht stimulieren [Kalra et al., 1991], jedoch hemmte der Y_5 -selektive Antagonist CGP 71683A [Criscione et al., 1998] die NPY-vermittelte Stimulation der Futtersaufnahme [Schaffhauser et al., 1997]. Auch durch Untersuchungen an Y_1 - oder Y_5 -Rezeptor- sowie NPY-defizienten (knockout) Mäusen ließ sich nicht endgültig klären, über welchen NPY-Rezeptorsubtyp das Fressverhalten nun gesteuert wird [Pedrazzini et al., 1998; Kanatani et al., 2000]. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass an der Regulation der Nahrungsaufnahme durch NPY und damit an der Entwicklung von Stoffwechselstörungen und Fettleibigkeit mehr als ein Rezeptorsubtyp

beteiligt ist. Vermutlich spielen dabei die Subtypen Y_1 und Y_5 eine Rolle. Es liegen zudem klinische Studien vor, die darauf schließen lassen, dass NPY und PYY pathogenetische Faktoren bei Anorexie und Hyperorexie (Bulimie) darstellen [Kaye et al., 1990].

NPY könnte als endogenes Antikonvulsivum fungieren, da NPY bei epileptischen Krämpfen – vermutlich über Y_5 -Rezeptoren – inhibitorisch wirkt [Woldbye, 1997]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass zwischen dem NPY-Spiegel im Gehirn von Ratten und deren Alkoholkonsum ein inverser Zusammenhang besteht [Thiele et al., 1998].

1.1.1.2 Wirkungen in der Peripherie

In der Peripherie kommt Neuropeptid Y als Kotransmitter im sympathischen Nervensystem vor, der sowohl mit post- (Y_1 -Rezeptoren), als auch mit präsynaptischen Rezeptoren (Y_2 -Rezeptoren) interagiert. Funktionell betrachtet führt die Stimulation von Y_1 - und Y_2 -Rezeptoren zu gegensätzlichen Effekten. Ein Beispiel dafür ist die vasokonstriktorische, blutdrucksteigernde Wirkung von NPY, die durch Stimulation postsynaptischer Rezeptoren zustande kommt [Zukowska-Grojec et al., 1986]. Untersuchungen an Y_1 -Rezeptor defizienten (knockout) Mäusen zeigen, dass die Blutdrucksteigerung der dominante periphere Effekt von NPY ist [Pedrazzini et al., 2000; Kanatani et al., 2000]. Außerdem potenziert NPY die vasokonstriktorische Wirkung von Noradrenalin, Serotonin und Angiotensin II [Ekbal et al., 1984]. Daneben wirkt NPY über präsynaptische Rezeptoren hemmend auf seine eigene Freisetzung sowie auf die Freisetzung von Noradrenalin aus sympathischen Neuronen. Dies kann als Feinregulation der vasokonstriktorischen Wirkung beider Substanzen verstanden werden. Bei Patienten mit hohem Blutdruck und Herzinsuffizienz konnte ein erhöhter NPY-Spiegel nachgewiesen werden. Ungeklärt ist bislang die Frage, ob die Zunahme der NPY-Konzentration als Ursache für die Entstehung der Erkrankung oder als Folge, d.h. erhöhte NPY-Konzentration aufgrund kompensatorisch gesteigerter Aktivität des sympathischen Nervensystems, angesehen werden muss.

Neben dem Gefäßtonus beeinflusst NPY auch die Herzfunktion. Durch systemische Gabe von NPY wird das Schlagvolumen ohne Veränderung der Herzfrequenz gesenkt [Allen et al., 1993].

Des Weiteren werden kardiovaskuläre Effekte von NPY auf dessen Eingriff in das Renin-Angiotensin-System zurückgeführt. So kann bei Ratten mit erhöhten Reninplasmaspiegeln durch NPY-Administration die Reninfreisetzung gehemmt werden, während dieser Effekt bei Ratten mit physiologischen Reninspiegeln nicht zu beobachten ist [Walker et al., 1991].

1.1.2 NPY –Rezeptorsubtypen

NPY, PYY und PP interagieren mit der selben Familie von Rezeptoren (NPY-Rezeptoren). Inzwischen sind sechs Rezeptorsubtypen (Y_1 , Y_2 , Y_4 , Y_5 , y_6 , Y_7) kloniert, ein weiterer, Y_3 , wird aufgrund pharmakologischer Hinweise postuliert. Alle Subtypen gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Membranrezeptoren mit sieben transmembranären Domänen. Die Effektivierung erfolgt über Pertussistoxin-sensitive G-Proteine. NPY bewirkt an allen Rezeptorsubtypen eine Hemmung der Adenylylcyclase [Weinberg et al., 1996]. Darüber hinaus sind weitere Signalwege beschrieben, z.B. die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern [Michel, 1991] oder die Aktivierung oder Hemmung von Ionenkanälen (Ca^{2+} , K^+) [Edwald et al., 1988; Miller et al., 1991].

Mangels geeigneter Antagonisten für alle Rezeptoren erfolgt deren pharmakologische Charakterisierung vorwiegend anhand von Affinitätsreihen agonistisch wirkender Peptide, d.h. von NPY, PYY, PP, deren Analoga und Fragmenten (Tabelle 1-1).

Von klonierten Rezeptoren lassen sich Mutanten mit selektiv ausgetauschten Aminosäuren herstellen, die nützlich sind, um Informationen über die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen zu gewinnen. Umfangreiche Untersuchungen wurden durchgeführt, um auf diesem Wege Hinweise zu erhalten, welche Strukturelemente des NPY für optimale Affinität, biologische Aktivität und Rezeptorsubtyp-Selektivität verantwortlich sind. Aus diesen Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden auch wichtige Hinweise für die Entwicklung nichtpeptidischer Antagonisten gewonnen.

Tabelle 1-1: Klassifizierung von NPY-Rezeptoren aufgrund der Bindungsfähigkeit von NPY und verwandten Peptiden [Michel et al., 1998]

Rezeptor	Pharmakologische Differenzierung mittels Agonisten (Aktivitätsreihe von Peptiden)	Rezeptorvorkommen	Biologische Wirkungen (Beispiele)
Y ₁	NPY (0.2 nM) ≥ PYY (0,7 nM) >> NPY ₁₃₋₃₆ >> PP (100 nM) selektive Agonisten: [Leu ³¹ ,Pro ³⁴]NPY, [Leu ³¹ ,Pro ³⁴]PYY, [Pro ³⁴]NPY, [Pro ³⁴]PYY	glatte Gefäßmuskulatur, Großhirnrinde, Colon	Peripherie: Vaso-konstriktion, Blutdruck ↑; ZNS: Nahrungsaufnahme ↑, Anxiolyse, Sedierung
Y ₂	NPY ≈ PYY (0.7 nM) > NPY ₁₃₋₃₆ >> PP (> 1000 nM) selektive Agonisten: NPY ₃₋₃₆ , PYY ₃₋₃₆ , NPY ₁₃₋₃₆ , PYY ₁₃₋₃₆	Nervenendigungen, Nierentubuli, Hippocampus	präsynaptische Hemmung der Neurotransmitter-freisetzung
Y ₃ ^{a)}	NPY ≥ [Pro ³⁴]NPY ≥ NPY ₁₃₋₃₆ >> PYY, PP	Hinterhirn, Herz, Nebennierenmark	präsynaptische Hemmung der Neurotransmitter-freisetzung
Y ₄ (PP ₁)	PP (0.05 nM) > oder >> NPY ≈ PYY Agonist: GW 1229 ^{b)}	Gehirn, Koronararterien, Ileum	gastrointestinale und zentrale Effekte
Y ₅ (Y ₁ -like)	NPY (0.6 nM) ≥ PYY (1 nM) ≥ NPY ₂₋₃₆ ≥ hPP >> rPP	Hypothalamus	ZNS: Nahrungsaufnahme ↑ ('feeding receptor'), antikonvulsive Wirkung
Y ₆ (Y ₅ , Y _{2b} , PP ₂)	NPY ≈ PYY ≈ NPY ₂₋₃₆ >> hPP	c)	zentrale Effekte bei Mäusen

a) Mit Ausnahme des vorläufig als Y₃ bezeichneten Rezeptors sind alle Rezeptoren kloniert; in Klammern frühere Bezeichnungen

b) in der Literatur auch als 1229U91 oder GR 23118 bezeichnet

c) der humane y₆-Rezeptor wird nicht in funktionsfähiger Form exprimiert (Pseudogen)

Der erst kürzlich klonierte Y₇-Rezeptor entspricht in seinem pharmakologischen Profil im Wesentlichen dem Y₂-Rezeptor.

1.1.2.1 Y₁-Rezeptor

1990 wurde der Y₁-Rezeptor als erster NPY-Rezeptorsubtyp aus einer cDNA-Bibliothek aus Rattenhirn kloniert [Eva et al., 1990]. Kurze Zeit später gelang den Arbeitsgruppen um HERZOG [Herzog et al., 1992] und LARHAMMER [Larhammer et al., 1992] die Klonierung des humanen Y₁-Rezeptors, der bislang am besten untersucht ist. Mit einer Homologie von über 94 % zeigt der Y₁-Rezeptor der Säugetiere eine stark konservierte Struktur [Blomquist et al., 1997].

Als G-Protein gekoppelter Rezeptor weist der Y₁-Rezeptor ebenso wie die anderen Subtypen sieben transmembranäre helikale Domänen, einen extrazellulär gelegenen N-Terminus, einen intrazellulär gelegenen C-Terminus sowie drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen auf. Die Wechselwirkung mit dem G-Protein erfolgt vermutlich im Bereich der dritten zytoplasmatischen Schleife.

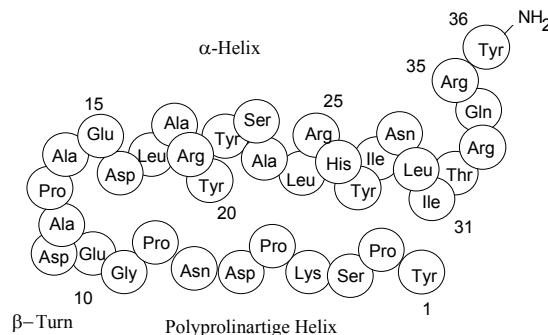


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung von NPY nach ALLEN et al.

Bindungsstudien an Y₁-Rezeptormutanten, bei denen saure Aminosäuren (Glu, Asp) in extrazellulären Domänen des Rezeptors durch Ala ausgetauscht wurden, ergaben Hinweise, dass Aspartatreste in den extrazellulären Schleifen für die Bindung von NPY von zentraler Bedeutung sind. Das NPY-Molekül weist eine bipolare Struktur auf: Im β-Turn häufen sich negativ geladene saure Aminosäuren (Asp, Glu), während an N- und C-Terminus mehrere positiv geladene, basische Aminosäuren (Arg, Lys, His) lokalisiert sind [Allen et al., 1987]. Weil die sauren Aminosäuren im Bereich der PP-Faltung für die Bindung keine Rolle spielen, ist anzunehmen, dass die basischen Aminosäuren des NPY über ionische Wechselwirkungen mit den bei physiologischem pH-Wert negativ geladenen sauren Aminosäuren der extrazellulären Loops des Rezeptors interagieren [Walker et al., 1994]. In weiteren Mutationsexperimenten wurden hydrophobe Aminosäuren der transmembranären Helices II, VI und VII identifiziert, die wahrscheinlich eine "hydrophobe Tasche" bilden, die ebenfalls an der Ligandbindung beteiligt ist [Sautel et al., 1995].

Um die für die Wechselwirkung mit dem Y_1 -Rezeptor essentiellen Aminosäuren von NPY zu ermitteln, wurden verschiedene Fragmente von NPY sowie NPY-Analoga in Bindungsstudien und funktionellen Tests auf ihre Aktivität geprüft. Dabei ist man zu folgenden Ergebnissen gekommen: Im Bereich des N-Terminus von NPY führen die Elimination oder der Austausch von Tyr durch Ala bereits zu einer ausgeprägten Abnahme der Affinität [Beck-Sickinger et al., 1994]. Das zur Rezeptorsubtyp-Klassifizierung eingesetzte Fragment NPY_{13-36} ist im Vergleich zu NPY 100- bis 400-mal schwächer wirksam [Seikh et al., 1990]. Somit scheint ein intakter N-Terminus für die Y_1 -Rezeptorbindung von entscheidender Bedeutung zu sein. Durch einen punktuellen Austausch aller Aminosäuren des NPY durch L-Alanin ("Alanin-Scan") konnte gezeigt werden, dass auch das C-terminale Pentapeptid für die Rezeptorbindung essentiell ist. Insbesondere die Aminosäuren Arg³³ und Arg³⁵ sind für die Wechselwirkung mit dem Y_1 -Rezeptor essentiell [Beck-Sickinger et al., 1994]. Die Aminosäuren 31 und 34 können dagegen unter Erhalt der Affinität ausgetauscht werden. Durch den Austausch von Ile³¹ bzw. von Gln³⁴ im NPY-Molekül gegen die entsprechenden Aminosäuren des humanen PP_s (Leu bzw. Pro) wurden die ersten selektiven Y_1 -Antagonisten [Pro³⁴]NPY bzw. [Leu³¹, Pro³⁴]NPY erhalten [Fuhlendorff et al., 1990a; Krstenansky et al., 1990]. Untersuchungen zur Sekundärstruktur von NPY ergaben, dass die desamidierte Form von NPY ($NPY(Tyr^{36}-OH)$) in Lösung keine stabile α -Helix und somit keine stabile PP-Faltung ausbilden kann. Das könnte erklären, warum NPY als freie Säure keinerlei biologische Aktivität besitzt [Tonan et al., 1990].

Die Aminosäuren des β -Turns scheinen für die Rezeptorbindung keine wesentliche Rolle zu spielen. Auch zentral trunkierte NPY-Analoga besitzen Y_1 -Rezeptoraffinität. Entscheidend ist dabei, dass die räumliche Anordnung des C- und des N-Terminus zueinander erhalten bleibt [Schwartz et al., 1990]. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass ein die PP-Faltung störender Ersatz von Tyr²⁰ durch Pro zu einem Verlust der Y_1 -Rezeptoraffinität führt [Fuhlendorff et al., 1990].

1.1.2.2 Weitere NPY –Rezeptorsubtypen

Der Y_2 -Rezeptor ist der vorherrschende NPY-Rezeptorsubtyp im ZNS. Charakteristisch für den Y_2 -Rezeptor ist die präsynaptische Inhibierung der Freisetzung von NPY und anderer Neurotransmitter wie z.B. Noradrenalin im peripheren Nervensystem oder Glutamat im Hippocampus [Wahlestedt et al., 1990; Bleakman et al., 1993]. Das Vorkommen von postsynaptischen Y_2 -Rezeptoren im peripheren Nervensystem beschränkt sich auf die glatte Muskulatur [Potter et al., 1989]. Der humane Y_2 -Rezeptor weist zum humanen Y_1 -Rezeptor lediglich eine Homologie von 31 % auf.

Der Y_3 -Rezeptor ist der einzige NPY-Rezeptorsubtyp, der PYY mit wesentlich geringerer Affinität als NPY bindet. Der Y_3 -Rezeptor ist bislang nicht kloniert. Seine Existenz wurde aufgrund pharmakologischer Untersuchungen postuliert. Rezeptoren mit diesem pharmakologischen Profil wurden im Nebennierenmark, wo NPY die Freisetzung von Katecholaminen hemmt [Higuchi et al., 1988], Membranen von Herzmuskelzellen der Ratte [Balasubramaniam et al., 1990], chromaffinen Zellen der Nebenniere von Rindern [Wahlestedt et al., 1992] und im Hirnstamm [Grundemar et al., 1991] gefunden.

Der Y_4 -Rezeptor zeichnet sich im Gegensatz zu den übrigen Rezeptorsubtypen durch seine hohe Affinität zu PP ($K_i = 13.8 \text{ pM}$) [Lundell et al., 1995; Lundell et al., 2000] aus, weshalb er früher als PP_1 -Rezeptor bezeichnet wurde. Mit einer Homologie von 42 % bzw. 38 % ist der humane Y_4 -Rezeptor dem humanen Y_1 - und dem y_6 -Rezeptor am ähnlichsten. Die humane Y_4 -mRNA wird in der Peripherie u.a. in Skelettmuskeln, Leber, Herz, Colon, Dünndarm und Prostata exprimiert und außerdem in verschiedenen Gehirnregionen wie Hippocampus, Thalamus und Hypothalamus [Bard et al., 1995; Gregor et al., 1996a; Lundell et al., 1995; Yan et al., 1996]. Die physiologischen Effekte des Y_4 -Rezeptors sind bislang nicht bekannt. Vermutlich spielt er bei der Regulierung gastrointestinaler Funktionen eine Rolle [Cox et al., 2001; Pheng et al., 1999].

Der Y_5 -Rezeptor weist eine vergleichsweise niedrige Homologie zu den anderen klonierten Rezeptorsubtypen auf (30-33 %). 1996 gelang GERALD die Klonierung des Y_5 -Rezeptors aus dem Hypothalamus der Ratte [Gerald et al., 1996]. Inzwischen bestehen erhebliche Zweifel daran, ausschließlich dem Y_5 -Rezeptor die feeding-Funktion zuzusprechen. Vielmehr wird die Beteiligung von Y_1 -, Y_5 - und möglicherweise sogar weiterer, bisher unbekannter Y_1 -like Rezeptoren an der durch NPY stimulierten Nahrungsaufnahme diskutiert [Zimanyi et al., 1998].

An Mensch, Affe, Maus und Kaninchen wurde mit Hilfe von Klonierungstechniken ein weiterer Rezeptorsubtyp mit 51 % Identität zum Y_1 -Rezeptor gefunden [Matsumoto et al., 1996; Weinberg et al., 1996; Gregor et al., 1996]. Die humane y_6 -mRNA wurde zwar in verschiedenen Geweben, wie z.B. Herz und Skelettmuskel gefunden, der Rezeptor wird jedoch beim Menschen und anderen Primaten, aber auch bei der Ratte, nicht in funktionsfähiger Form exprimiert.

1.1.3 NPY Y₁-Rezeptorantagonisten

Zur pharmakologischen Klassifizierung der Rezeptorsubtypen und zur Untersuchung der physiologischen Rolle von NPY werden potente und selektive Antagonisten benötigt.

In der Reihe der peptidischen Y₁-Rezeptorantagonisten ist das zyklische Peptid 1229U91 (GW 1229) ($K_i = 18 \text{ pM}$) einer der potentesten Liganden [Hedge et al., 1995]. Für dieses Peptid wurde auch eine Y₄-agonistische Wirkung gefunden [Schober et al., 1998].

Wegen der höheren metabolischen Stabilität und der höheren Wahrscheinlichkeit, oral wirksame Substanzen zu erhalten, sind nichtpeptidische Antagonisten jedoch vorteilhafter als peptidische. Als erste nichtpeptidische Liganden wurden D-myo-1,2,6-Inositoltrisphosphat PP56 [Edvinsson et al., 1990] und der irreversible α_1 -Adrenorezeptorantagonist Benextramin [Doughty et al., 1990] beschrieben, die jedoch nur schwach, weder selektiv noch spezifisch, wirksam sind. Zeitgleich wurde für den potenten Histamin H₂-Rezeptoragonisten BU-E-76 (He 90481) [Buschauer, 1989] eine schwache, aber kompetitive Y₁-antagonistische Wirkung ($pA_2 = 4.43$, HEL-Zellen) [Michel et al., 1990] nachgewiesen. Ausgehend von der Struktur des Imidazolypropylguanidins BU-E-76 konnte Knieps mit der Synthese von Analogverbindungen die Y₁-Rezeptoraffinität bei gleichzeitiger Abnahme der histaminergen Aktivität um den Faktor 100 steigern [Knieps et al., 1995; Knieps et al., 1996]. In Fortsetzung dieser Arbeiten gelang es MÜLLER mit der Synthese von ω -Amino und ω -Guanidinoalkanamiden, potentere und selektivere Y₁-Rezeptorantagonisten ohne H₂-agonistische Aktivität darzustellen, wobei (*RS*)-6-Amino-*N*-(2,3-diphenylpropyl)-*N*-[2-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl]hexanamid (200) ($IC_{50} = 0.9 \text{ } \mu\text{M}$, HEL-Zellen, Ca^{2+} -Assay) die aktivste Verbindung war [Müller et al., 1997] (Abbildung 1-2).

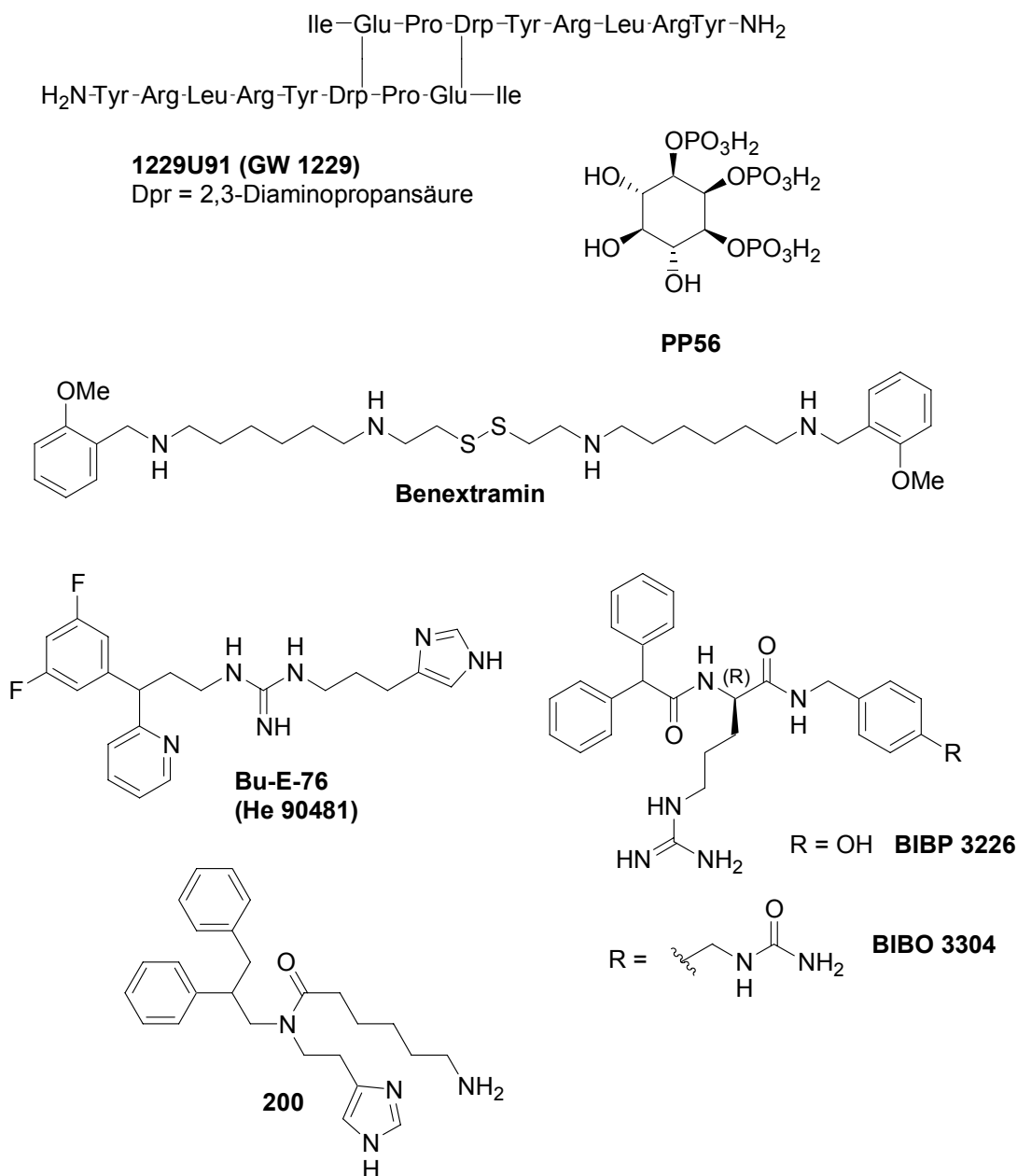


Abbildung 1-2: Y₁-Rezeptorantagonisten

Von der Fa. Thomae (Boehringer Ingelheim) stammt der erste im submikromolaren Bereich wirksame selektive Y₁-Antagonist BIBP 3226 ($K_i = 7.2 \text{ nM}$) [Rudolf et al., 1994]. Diese peptidähnliche Substanz wurde durch systematische Variation des C-Terminus von NPY entwickelt. Der Austausch der 4-Hydroxyfunktion in BIBP 3226 gegen eine Aminocarbonylaminomethyl-Gruppe führte zu dem Y₁-selektiven Antagonisten BIBO 3304, der 20-fach wirksamer ist als BIBP 3226 ($\text{IC}_{50} = 0.37 \text{ nM}$, SK-N-MC-Zellen [^{125}I]NPY). Mit Hilfe dieses Y₁-Antagonisten wurden Studien zur Nahrungsaufnahme bei Ratten durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen führten zu der Vermutung, dass sowohl der Y₁-Rezeptor als auch weitere NPY-Rezeptorsubtypen an der Stimulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sind [Wieland et al., 1998]. Die o.g. Verbindungen waren

wichtige pharmakologische Werkzeuge für die Erforschung der Effekte von NPY, jedoch auf Grund der zu geringen Bioverfügbarkeit nach peroraler Applikation und mangelnder ZNS-Gängigkeit nicht brauchbar für therapeutische Zwecke [Wieland et al., 2000].

Neben den o. g. Substanzen von BUSCHAUER, KNEIPS und MÜLLER wurden an unserem Lehrstuhl von AIGLSTORFER und HUTZLER hochpotente und selektive Y_1 -Antagonisten synthetisiert, die große strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Y_1 -Rezeptorantagonisten BIBP 3226 [Rudolf et al., 1994] aufweisen, allerdings primär aufgrund eines anderen Konzeptes entwickelt wurden, das auf Vorarbeiten von UFFRECHT [Uffrecht, 1996] zurückgeht. Nach Veröffentlichung der Struktur von BIBP 3226 wurden die Argininamide noch intensiver bearbeitet, um die Struktur-Wirkungsbeziehungen dieser Substanzklasse detaillierter untersuchen zu können.

AIGLSTORFER gelang es, durch den Einbau rigidisierter *N*-Benzylamidpartialstrukturen und zusätzlicher HO- bzw. H_2NCO -Gruppen in die NPY Antagonisten mit Argininpartialstruktur, wichtige Informationen zur mutmaßlichen aktiven Konformation der Argininamide am Y_1 -Rezeptor zu gewinnen. Außerdem wurde sowohl die Diarylalkansäure-Partialstruktur variiert, die stark basische Guanidingruppe substituiert und der Argininrest durch geeignete Komponenten mit geringerer Basizität ersetzt [Aiglstorfer et al., 1998].

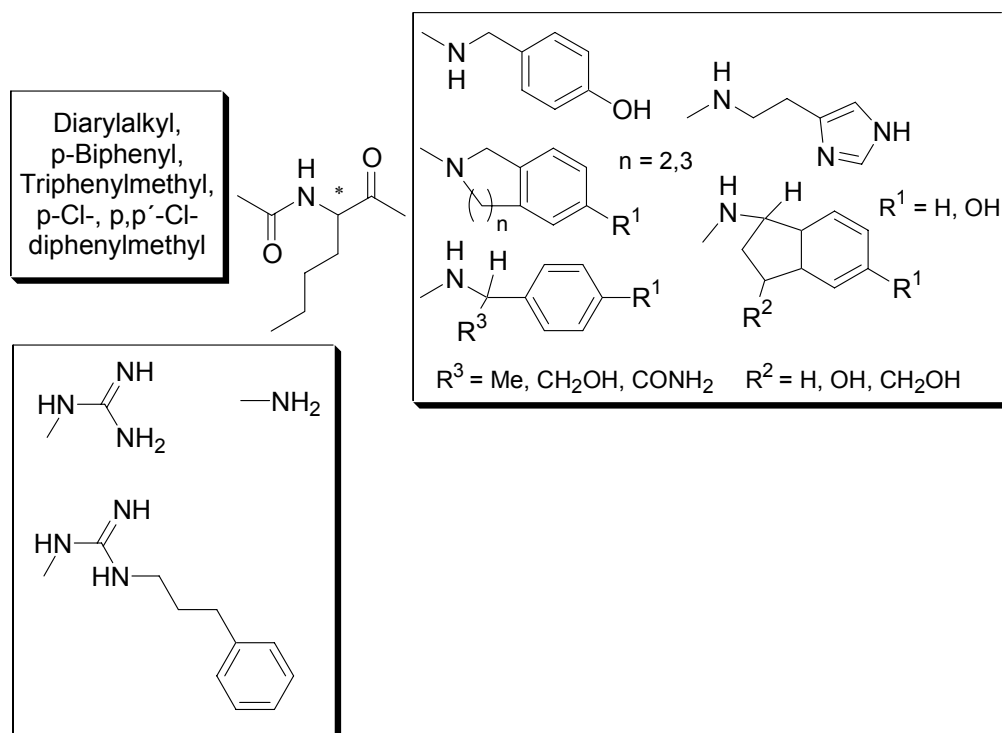


Abbildung 1-3

Von HUTZLER wurde eine große Anzahl von (*R*)-Argininamiden mit verschiedenartigen Substituenten am Guanidinsystem hergestellt. Ziel war es durch Akzeptorsubstituenten und/oder lipophile Reste die Basizität der Guanidinogruppe zu vermindern bzw. die Hydrophobizität zu erhöhen, um zu möglicherweise peroral applizierbaren und zentral wirksamen Substanzen zu gelangen. Überraschenderweise erwiesen sich Substanzen mit elektronenziehenden *N*⁶-Substituenten (Abbildung 1-4) als außerordentlich stark wirkende Y₁-Antagonisten mit bis zu etwa 100 fach höherer Rezeptoraffinität als BIBP 3226 (K_i-Werte im pM-Bereich) [Hutzler, 2001]. Die Substanzen dienen derzeit als Modellverbindungen, um die Ligand-Rezeptorwechselwirkungen auf molekularer Ebene, d. h. an Rezeptormutanten, zu untersuchen.

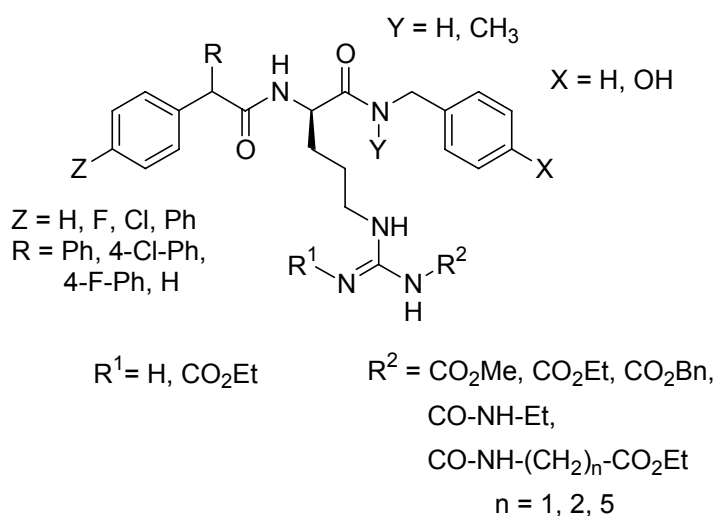


Abbildung 1-4

1.2 Festphasensynthese von Guanidinen

Gemeinsames Strukturelement der von AIGLSTORFER und HUTZLER synthetisierten Y_1 -Rezeptorantagonisten ist das Arginingrundgerüst mit der mono- bzw. disubstituierten Guanidingruppe. Guanidingruppen sind, außer in NPY-Antagonisten, in vielen anderen Pharmaka wie z.B. NO-Synthase-Inhibitoren, Fibrinogenantagonisten, Thrombrininhibitoren, Histamin- H_2 -Rezeptoragonisten oder bestimmten Antihypertensiva als essentielle Partialstrukturen enthalten [Greenhill et al., 1993]. Daher besteht in der Wirkstoffforschung ein besonderes Interesse an Methoden zur Herstellung von Guanidinen. Für die Synthese *N*-mono- und *N,N'*-disubstituierter Guanidine in Lösung sind in der Literatur einige Verfahren beschrieben. Dabei kommen z.B. folgende Guanylierungsreagenzien bzw. -methoden zum Einsatz:

1. S-Methylisothiuroniumiodid
2. 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin
3. *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)thioharnstoff
4. Hydrierung von Nitroguanidinen

Neben geringen Ausbeuten und der Bildung zahlreicher Nebenprodukte erschwert die extreme Basizität und Polarität der Guanidine und der damit verbundene hohe Reinigungsaufwand die Anwendung der entsprechenden Reaktionen. Daher stellt die Festphasensynthese eine interessante Alternative zur Synthese von Guanidinen dar. Obwohl bei Festphasensynthesen mindestens zwei zusätzliche Syntheseschritte notwendig sind, überwiegen doch in vielen Fällen die Vorteile gegenüber einer Synthese in Lösung. Bei einer konventionellen Synthese muss in der Regel nach jeder Stufe das entstandene Produkt durch Chromatographie, Kristallisation oder Destillation gereinigt werden, bevor eine weitere Umsetzung mit dem Produkt durchgeführt werden kann. Dies ist in um so stärkerem Ausmaß der Fall, wenn einer der beteiligten Reaktionspartner im Überschuss eingesetzt wurde, um etwa die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen oder eine thermodynamische Gleichgewichtslage im gewünschten Sinne zu verschieben.

Bei Festphasensynthesen ist die nahezu vollständige Umsetzung in jedem Reaktionsschritt eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg einer Reaktionssequenz. Schon aus diesem Grund wird hier immer mit einem großen Überschuss der gelösten Reaktanden gearbeitet. Deren Abtrennung ist aber bei Festphasensynthesen sehr leicht durchzuführen: es genügt mehrfaches gründliches Waschen des Harzes mit verschiedenen Lösungsmitteln.

Durch eine geschickte Verankerung des Moleküls am Harz kann man zudem dafür sorgen, dass eventuell ablaufende Nebenreaktionen zur Abspaltung der betreffenden unerwünschten

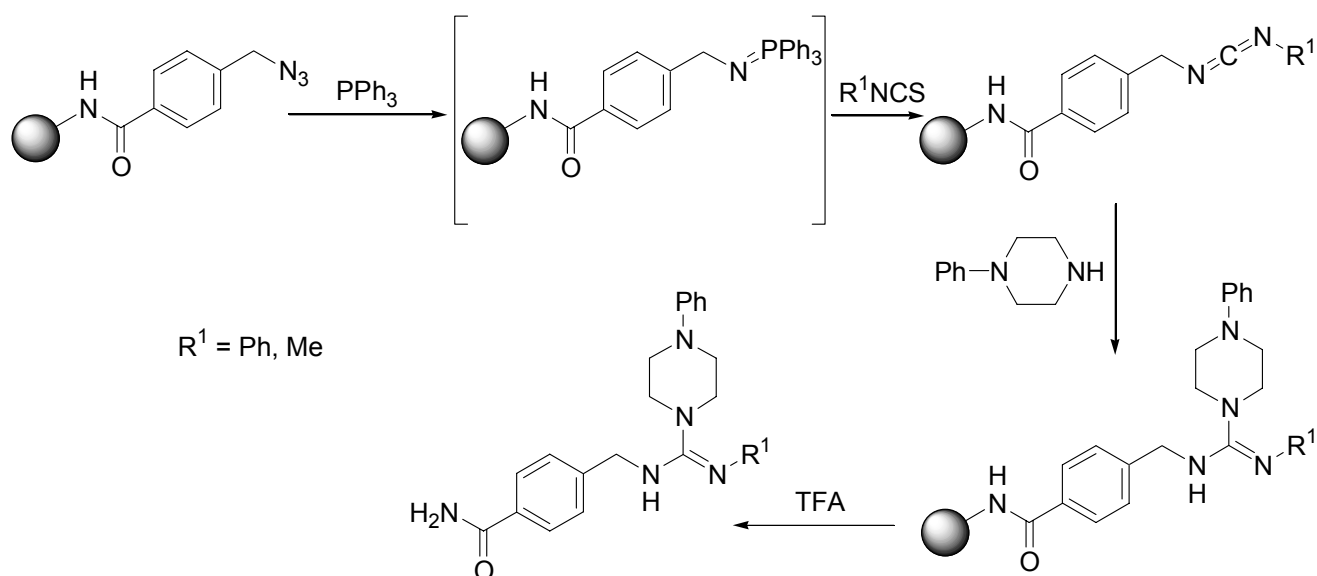
Produkte vom Polymer führen, so dass diese Substanzen ebenfalls durch einfaches Auswaschen zu entfernen sind.

Weitere entscheidende Vorteile der Festphasensynthese liegen in der vor allem für die Industrie interessanten Möglichkeit der Automatisierung und Miniaturisierung.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Methoden zur Synthese von guanidinhaltigen Substanzen an polymeren Trägern entwickelt. Exemplarisch werden im Nachfolgenden einige Darstellungsmöglichkeiten erläutert.

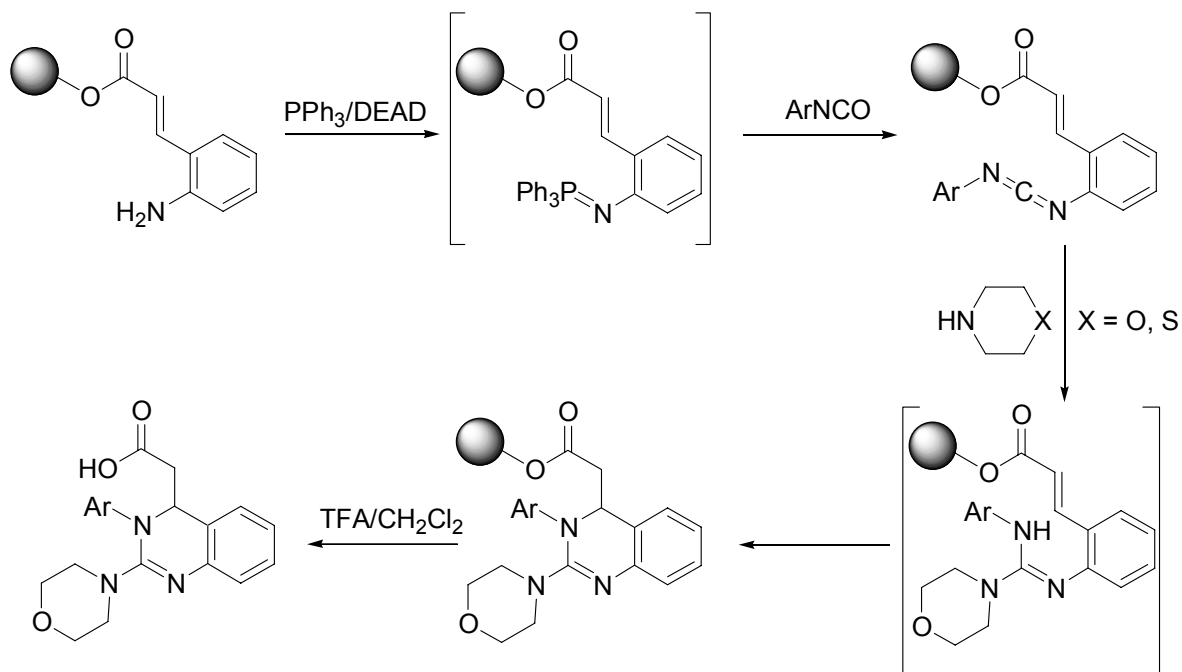
1.2.1 Guanidierungssynthesen mit polymergebundenen Carbodiimiden

Polymergebundene Carbodiimide können durch Aza-Wittig Reaktionen dargestellt werden. So setzen z. B. DREWRY et al. ein polymergebundenes Azid mit Triphenylphosphin zum Phosponimin um, das dann mit einem Isothiocyanat zu dem korrespondierenden Carbodiimid reagiert. Durch die Umsetzung mit einem Amin erhält man schließlich das gewünschte Guanidin [Drewry et al., 1997] (Formelschema 1-1).



Formelschema 1-1

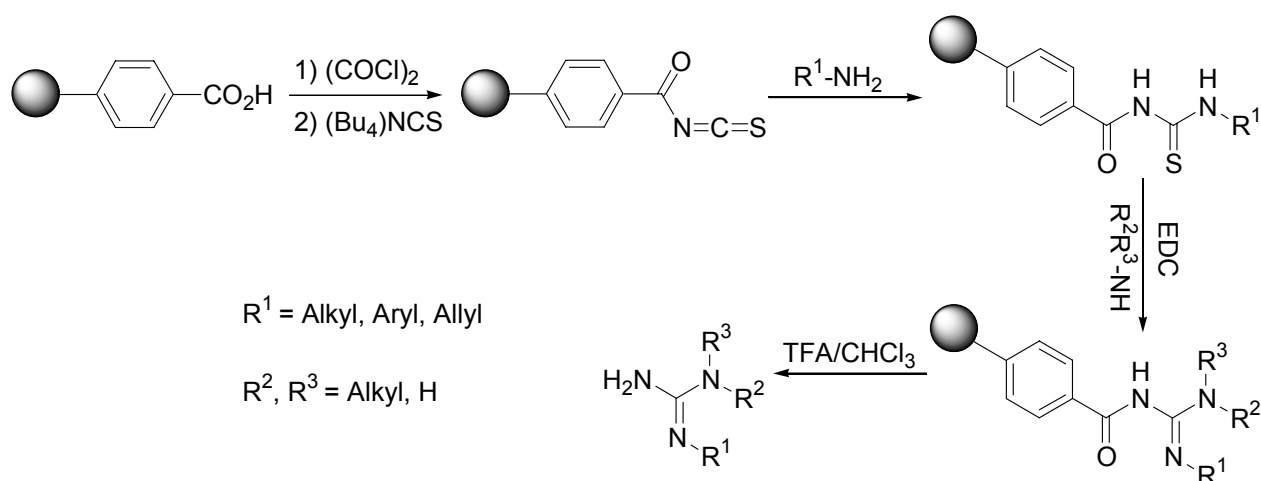
Auf ähnliche Weise gelang es WANG und HAUSKE, ringintegrierte Guanidine über eine Michael Addition herzustellen [Wang und Hauske, 1997] (Formelschema 1-2).



Formelschema 1-2

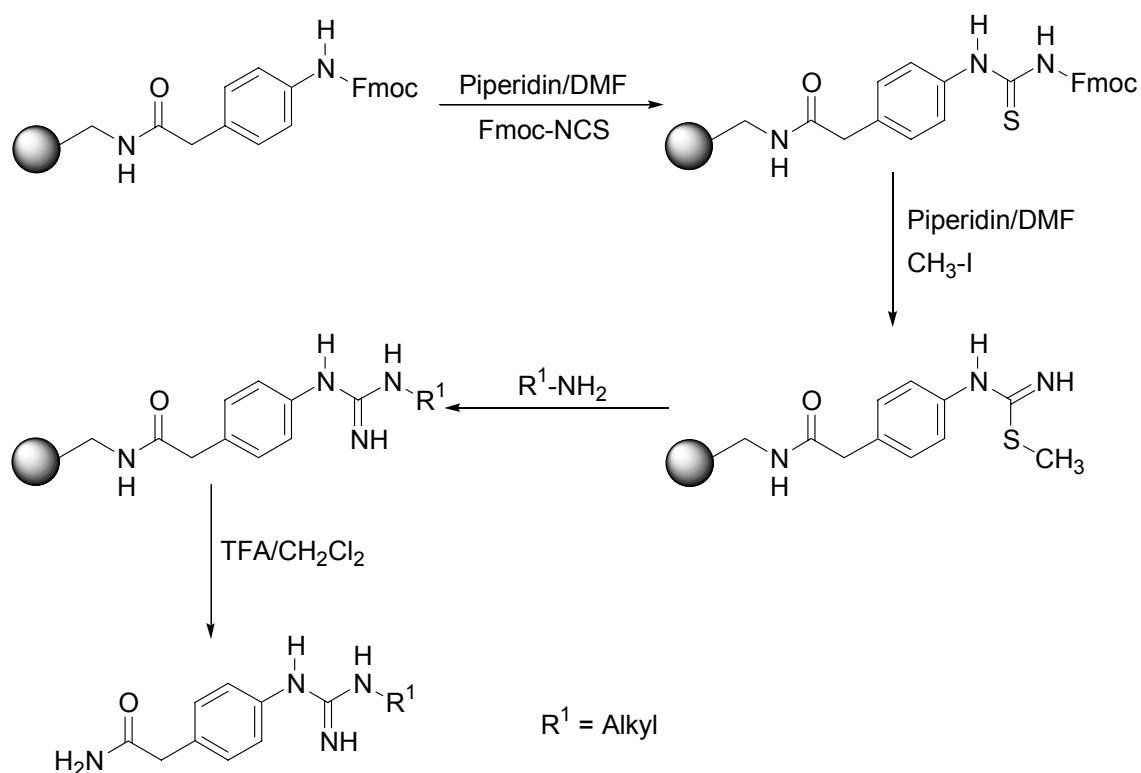
1.2.2 Guanidinsynthese mit polymergebundenen Thioharnstoffen

Der in der Literatur am häufigsten beschriebene Weg zur Darstellung von polymergebundenen Guanidinen verläuft über polymergebundene Thioharnstoffe. WILSON et al. setzen in ihrer Arbeit Carboxyl-polystyrol-Harz mit Oxalsäurechlorid und Tetrabutylammoniumthiocyanat um. Das so dargestellte polymergebundene Isothiocyanat zeichnet sich durch sehr hohe Reaktivität auch gegenüber wenig nucleophilen oder sterisch gehinderten Aminen aus. Durch Reaktion des polymergebundenen acylierten Thioharnstoffs mit verschiedenen Aminen in Anwesenheit des Kondensationsmittels EDC gelangten WILSON et al. zu einer Vielzahl von polymergebundenen Guanidinen, die mit Trifluoressigsäure vom polymeren Träger abgespalten werden können [Wilson et al., 1999] (Formelschema 1-3).



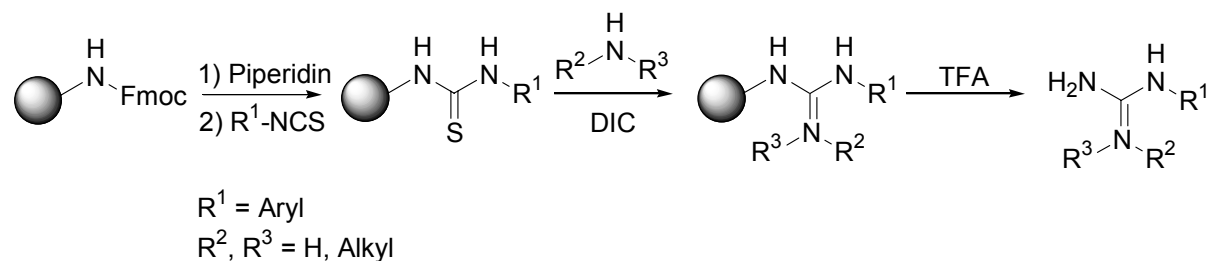
Formelschema 1-3

Andere Methoden, um mit Hilfe von Isothiocyanaten zu polymergebundenen Thioharnstoffen bzw. polymergebundenen Guanidinen zu gelangen, publizierten KEARNEY et al. und LI et al. KEARNEY et al. setzen Rink Amid-Harz mit Fmoc-geschützten Aminosäuren (z. B. p-Aminophenyllessigsäure) um (Formelschema 1-4). Anschließende Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe und Reaktion mit Fluorenylmethoxycarbonylisothiocyanat führt zu den entsprechenden polymergebundenen Thioharnstoffen. Diese werden entschützt und mit Methyljodid alkyliert. Man erhält polymergebundenen Isothioharnstoff, der mit Aminen zu polymergebundenen Guanidinen umgesetzt werden kann. Die gewünschten Produkte werden mit Trifluoressigsäure vom Harz abgespalten [Kearney et al., 1998].



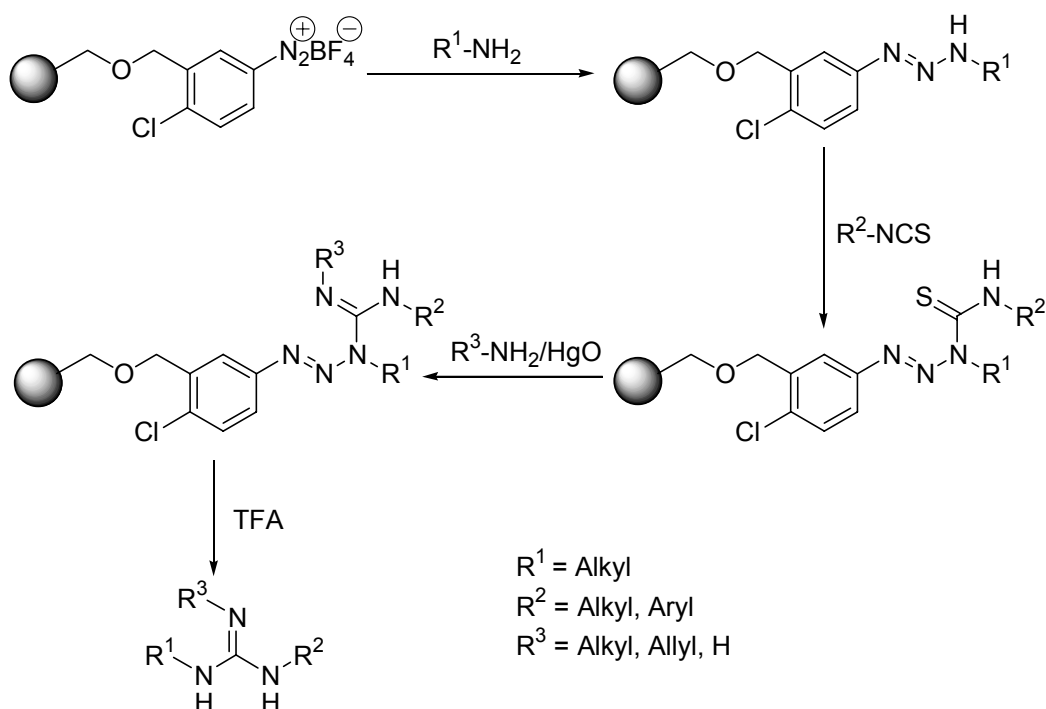
Formelschema 1-4

Im Gegensatz dazu verzichten Li et al. auf einen Linker zwischen Harz und Guanidin. Sie setzen Rink Amid Harz mit aryl-substituierten Isothiocyanaten zu den entsprechenden Thioharnstoffen um (Formelschema 1-5). Auf die S-Methylierung wird hier verzichtet, der polymergebundene Thioharnstoff kann direkt durch Umsetzung mit verschiedenen Aminen und dem Aktivierungsreagenz DIC in das polymergebundene Guanidin überführt werden. Trifluoressigsäure spaltet anschließend die Produkte vom Harz ab [Li et al., 2001].



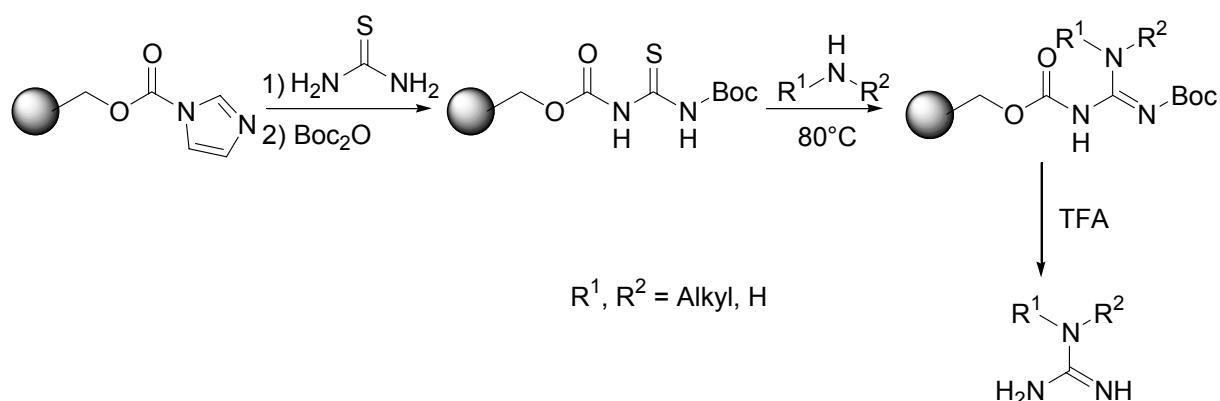
Formelschema 1-5

Die Verwendung des sog. T2-Linkers [Dahmen und Bräse, 2000] eines Diazonium-Linkers, hat gegenüber vielen anderen Methoden zur Festphasensynthese von Guanidinen den Vorteil, dass keiner der drei „Guanidin-Stickstoffe“ direkt mit dem polymeren Träger verbunden ist. Damit erhält man die Möglichkeit das Guanidingrundgerüst an allen drei Stickstoffpositionen zu variieren. Das polymergebundene Diazoniumsalz wird nacheinander mit einem primären Amin, einem substituierten Isothiocyanat und einem weiteren primären Amin in Gegenwart von Quecksilberoxid umgesetzt. Das polymergebundene, trisubstituierte Guanidin kann mit Trifluoressigsäure vom polymeren Träger abgespalten werden [Dahmen und Bräse, 2000] (Formelschema 1-6).



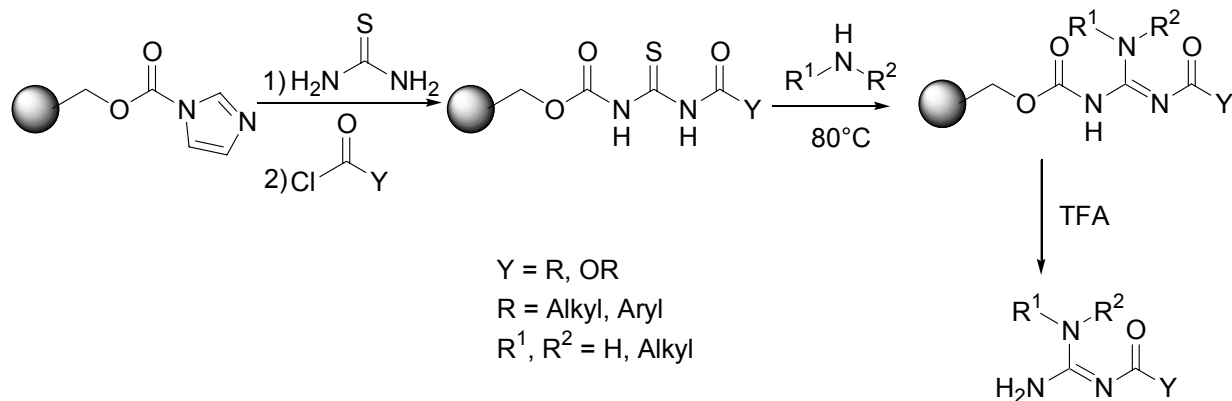
Formelschema 1-6

Eine sehr effiziente Methode, um zu Alkyl-, Acyl-, und Arylguanidinen zu gelangen, entwickelten JOSEY et al. Als polymeres Edukt verwenden sie Carbonylimidazol behandeltes Wang-Harz, das mit Thioharnstoff umgesetzt wird. Dieser polymergebundene Thioharnstoff kann nun, entsprechend der gewünschten Zielverbindung modifiziert werden. Zur Darstellung von monosubstituierten Guanidinen wird eine Boc-Schutzgruppe eingeführt. Anschließend wird mit den jeweiligen Aminen umgesetzt. Bei der Abspaltung des Guanidins mit Trifluoressigsäure wird gleichzeitig auch die Boc-Schutzgruppe entfernt. [Josey et al., 1998] (Formelschema 1-7).



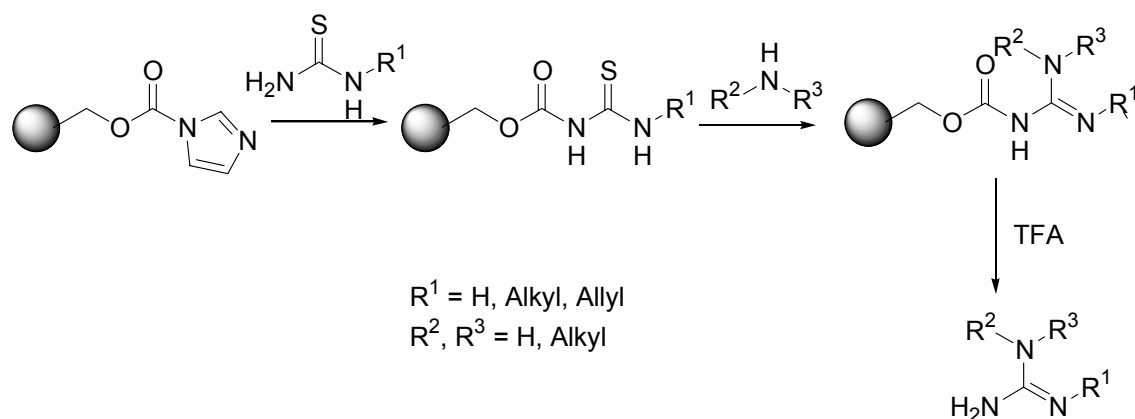
Formelschema 1-7

Zur Darstellung von disubstituierten Acyl/Alkyl-Guanidinen setzt man den polymergebundenen Thioharnstoff anstelle von Boc_2O mit Säurechloriden oder Chlorformiaten um. Anschließend erfolgt auch hier die Substitution des Schwefels durch ein Amin und die Abspaltung mit Trifluoressigsäure (Formelschema 1-8).



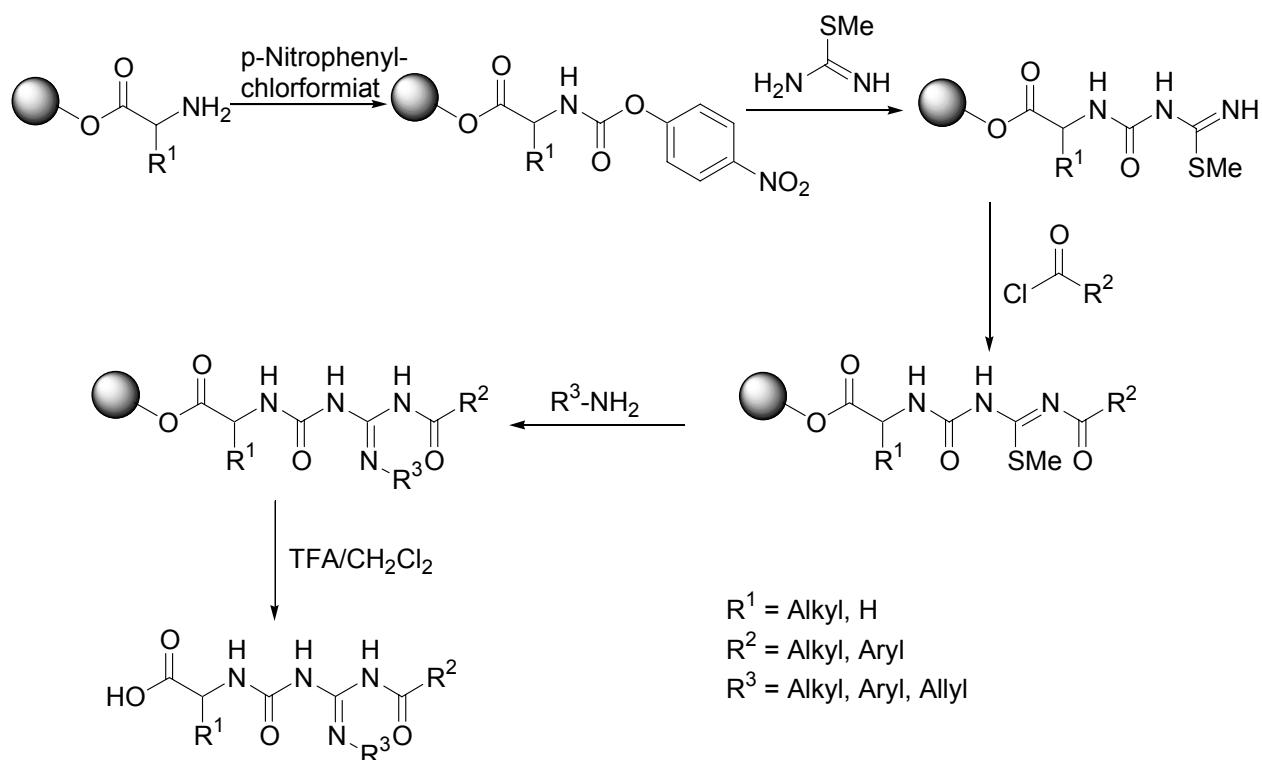
Formelschema 1-8

Verwendet man anstelle des unsubstituierten Thioharnstoffs substituierte *N*-Aryl-, -Allyl- oder -Alkylthioharnstoffe gelangt man auf sehr einfachem Weg zu den entsprechend substituierten Thioharnstoffen und nach der Umsetzung mit Aminen zu den gewünschten polymergebundenen Guanidinen (Formelschema 1-9).



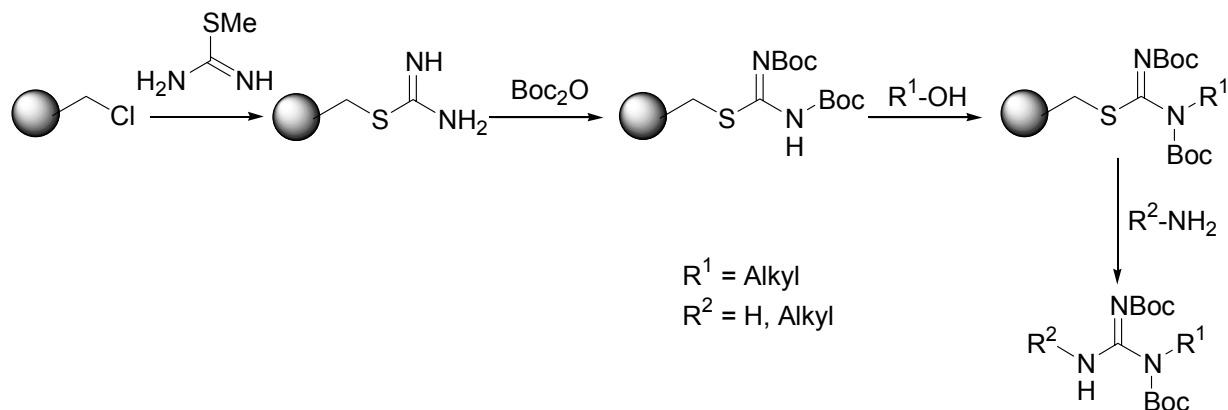
Formelschema 1-9

Zur Synthese einer Bibliothek von *N*-Acyl-*N'*-carbamoylguanidinen acylierten LIN und GANESAN an Polystyrol Wang-Harz gebundene Aminosäuren mit *p*-Nitrophenylchlorformiat. Die Nitrophenylcarbamate setzt man mit *S*-Methylisothioharnstoff um und acyliert anschließend mit einem Säurechlorid (Formelschema 1-10). Die Umsetzung mit einem Amin und anschließende Abspaltung vom Harz liefert die gewünschten *N*-Acyl-*N'*-carbamoylguanidine [Lin und Ganesan, 1998].



Formelschema 1-10

Die Synthese von Guanidinen nach DODD und WALLACE stellt eine Besonderheit dar (Formelschema 1-11). Der verwendete polymergebundene Thioharnstoff ist nicht wie sonst üblich über einen Stickstoff an den polymeren Träger gebunden, sondern über den Schwefel. Dieser schwefelgebundene Thioharnstoff wird Boc geschützt und anschließend in einer Mitsunobu Reaktion mit primären Alkoholen umgesetzt. Aminolyse (Amine oder Ammoniak) liefert dann die gewünschten Guanidine [Dodd und Wallace, 1998].

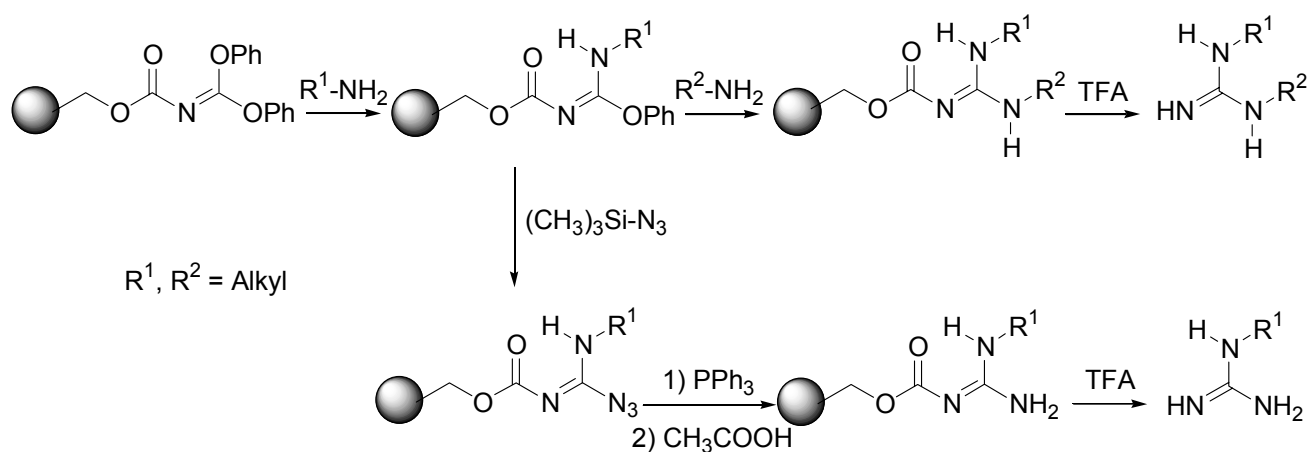


Schema 1-11

1.2.3 Verwendung von polymergebundenem Diphenylimidocarbonat

Eine weitere Methode zur Synthese von mono- und disubstituierten Guanidinen wurde an unserem Lehrstuhl entwickelt. SCHALKHAUSSER gelang es, ausgehend von polymergebundenem Diphenylimidocarbonat eine Reihe von *N,N'*-disubstituierten Guanidinen herzustellen. Im ersten Schritt wird das Harz mit einer Aminkomponente versetzt. Man erhält polymergebundenen Isoharnstoff, der mit Hilfe einer weiteren Aminkomponente in das entsprechende polymergebundene Guanidin überführt werden kann [Schalkhaußer, 1998] (Formelschema 1-12).

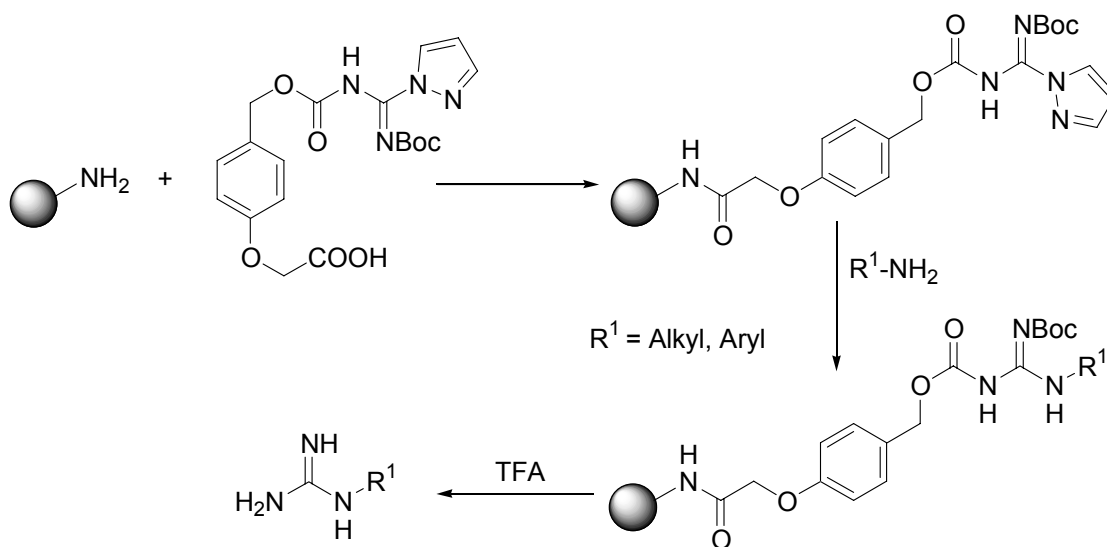
Ersetzt man in dieser Synthesesequenz die erste Aminkomponente durch Trimethylsilylazid, so erhält man ein polymergebundenes Azid. Dieses primär gebildete Azidoformamidin reagiert mit Triphenylphosphin unter Abspaltung von Stickstoff zum entsprechenden Phosphinimin. Das gewünschte Guanidin entsteht bei der Hydrolyse mit 70 %iger Essigsäure und braucht nur noch mit Trifluoressigsäure vom Harz abgespalten zu werden [Graichen, 1999].



Formelschema 1-12

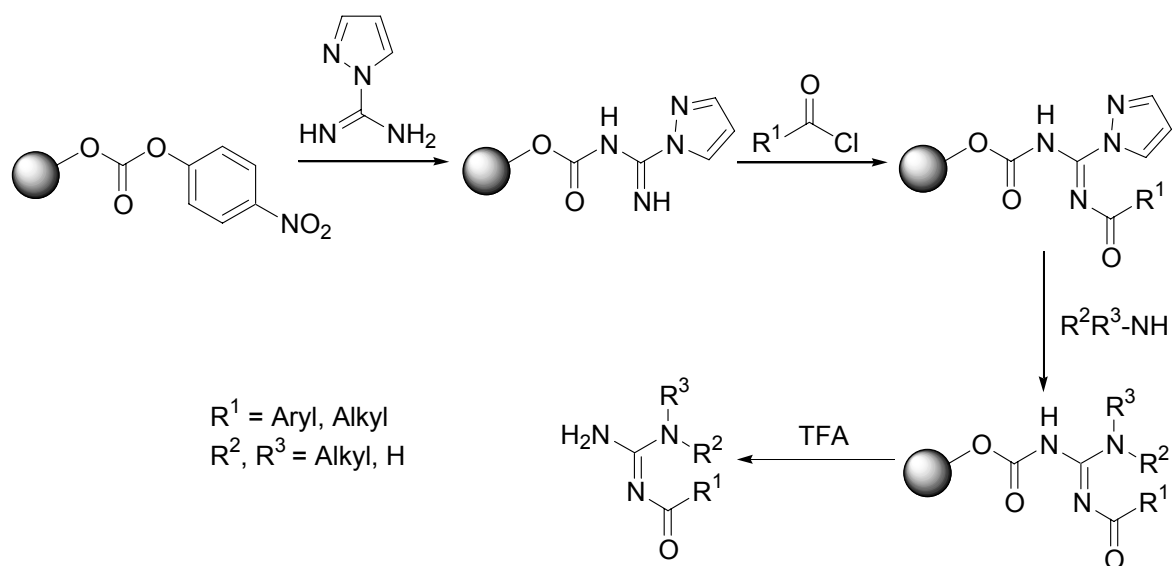
1.2.4 Verwendung von polymergebundenem 1*H*-pyrazol-1-carboxamidin

Anstelle von polymergebundenem *S*-Methylisothioharnstoff kann auch polymergebundenes 1*H*-pyrazol-1-carboxamidin als Guanylierungsmittel verwendet werden. Zur Synthese einer Bibliothek von *N*-monosubstituierten Guanidinen entwickelten PATEK et al. einen neuen säurelabilen Linker, der ausgehend von käuflicher 4-(Hydroxymethyl)phenoxyessigsäure in einer fünfstufigen Reaktion im Kolben synthetisiert und anschließend mit TentaGel Harz verknüpft wird. Der auf diese Weise modifizierte polymere Träger kann nun mit verschiedenen Aminen umgesetzt werden. Dadurch erhält man polymergebundene Guanidine, die mit Trifluoressigsäure vom polymeren Träger abgespalten werden können [Patek et al., 2000] (Formelschema 1-13).



Formelschema 1-13

Auf ähnliche Weise konnten GHOSH et al. *N*-Acyl-*N'*-alkylguanidine herstellen. Ausgehend von *p*-Nitrophenylcarbonat Wang Harz wird durch Umsetzung mit 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin polymergebundenes Pyrazolcarboxamidin synthetisiert. Die anschließende Umsetzung mit Acylierungsreagenzien (Säurechloriden) liefert polymergebundene acylierte Guanylierungsreagenzien. Die Reaktion mit Aminen führt schließlich zu polymergebundenen disubstituierten Guanidinen, die mit Trifluoressigsäure vom Harz abgespalten werden können [Ghosh et al. 2001] (Formelschema 1-14).



Formelschema 1-14

2 Problemstellung

Aufgrund der Bedeutung der Guanidingruppe als Pharmakophor vieler Pharmaka und der Schwierigkeiten, die sich bei der Synthese und in den anschließenden Reinigungsschritten ergeben können, gewinnen Methoden zur Herstellung solcher Substanzen an polymeren Trägern zunehmend an Interesse. Bei den meisten Festphasensynthesen von guanidinhaltigen Verbindungen erfolgt gleich, nachdem das Zielmolekül am Harz synthetisiert wurde, die Abspaltung vom polymeren Träger. Weitere Strukturvariationen werden an den polymergebundenen Guanidinen meist nicht vorgenommen. Es sind nur wenige Reaktionen an polymeren Trägern beschrieben, bei denen sowohl Variationen am Guanidinsystem als auch Strukturvariationen in anderen Molekülteilen durchgeführt werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, sowohl N^G -unsubstituierte als auch N^G -akzeptorsubstituierte Argininamide mit Y_1 -antagonistischer Aktivität mittels Festphasensynthese zugänglich zu machen. Eine sehr große Anzahl dieser (*R*)-Argininamide wurde von HUTZLER bereits auf konventionellem Weg in Lösung synthetisiert [Hutzler, 2001]. Da bei dieser Substanzklasse, die sich von dem Y_1 -Antagonisten BIBP 3226 ableitet, an drei Positionen des Arginingrundgerüsts Variationen möglich sind, stellt ihre Synthese an polymeren Trägern einen vielversprechenden Ansatz und eine besonders interessante Herausforderung dar.

Daher soll die Möglichkeit geschaffen werden, durch Strukturvariationen am polymergebundenen Arginingrundgerüst zu einer Substanzbibliothek dieser Wirkstoffklasse zu kommen. Klassische Methoden der Festphasenpeptidsynthese sind auf die Verlängerung der Aminosäuresequenz C-terminal am Polymer fixierter Peptidfragmente ausgelegt. Arginin wird dabei zunächst in N^G -geschützter Form eingesetzt und bleibt schließlich am Guanidinsystem unverändert. Zur Herstellung von Y_1 -Antagonisten der Argininamid-Reihe ist es dagegen erforderlich, eine Synthesemethode zu entwickeln, die es ermöglicht, die Arginingrundstruktur an N^α , Carboxylgruppe und Guanidinsystem zu variieren (Abbildung 2-1).

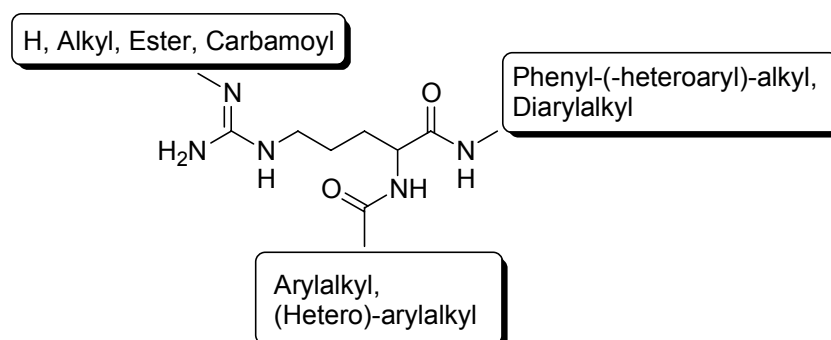


Abbildung 2-1

Zur Herstellung entsprechender Substanzbibliotheken erscheint daher die Verankerung der Guanidingruppe des Arginingerüsts an der Festphase als die attraktivste Vorgehensweise. Da zum Aufbau der Argininamide mehrere Reaktionsschritte am polymeren Träger durchgeführt werden, ist es notwendig, die Ankergruppe und die im Reaktionsverlauf verwendeten Schutzgruppen aufeinander abzustimmen. Beide müssen zueinander orthogonal, d. h. unter unterschiedlichen Bedingungen abspaltbar, sein. Zur Darstellung von argininhaltigen Tripeptiden lösten ZHONG et al. dieses Problem durch Verwendung eines Sulfonyl-Linkers und der Schutzgruppen Boc und OMe (Abbildung 2-2).

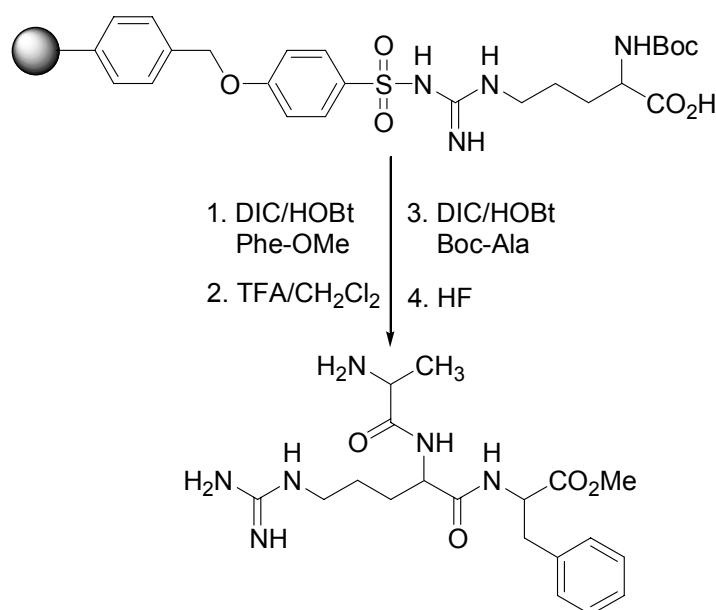


Abbildung 2-2

Das polymergebundene Boc-geschützte Arginin wird mit OMe-geschütztem Phenylalanin zu einem Dipeptid umgesetzt. Nach der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure erfolgt dann die Amidierung mit Boc-geschütztem Alanin.

Da sich der Sulfonyl-Linker Trifluoressigsäure gegenüber als inert erweist, kann man hier von Orthogonalität bezüglich Linker und verwendeten Schutzgruppen sprechen. Die hier aufgezeigte Synthese scheint auf den ersten Blick eine interessante Möglichkeit zu sein, um die gewünschten Verbindungen am polymeren Träger zu synthetisieren. Sie hat jedoch zwei entscheidende Nachteile:

Die Abspaltung des Tripeptids vom polymeren Träger im letzten Schritt ist nur mit Fluorwasserstoff möglich. Bekanntlich greift diese Säure u.a. Glas an, so dass eine Durchführung der Reaktion in den üblichen Glasfritten nicht möglich wäre. Außerdem können

durch die Verankerung des Guanidins am Sulfonyllinker an dieser Position keine Strukturvariationen mehr durchgeführt werden. Neben seiner eigentlichen Funktion fungiert der Sulfonyl-Linker hier zusätzlich als Guanidinschutzgruppe, so dass nur an zwei Positionen Variationen möglich sind.

Da der Einsatz einer Fluorwasserstoff-resistenten Reaktionsapparatur einen erheblichen Aufwand bedeutet und die Substanzen aufgrund des Sulfonyl-Linkers nur an zwei Stellen im Arginingrundgerüst variiert werden können, ist es erforderlich eine neue Synthesemethode zu entwickeln. Bevor aber an den Aufbau von Substanzbibliotheken zu denken ist, muss ein geeigneter Linker synthetisiert und die Schutzgruppenstrategie auf ihn abgestimmt werden. Mit Hilfe dieses eigens synthetisierten Linkers, des geeigneten polymeren Trägers und der optimierten Schutzgruppenstrategie sollten zunächst die von AIGLSTORFER entwickelten NPY-Antagonisten mittels Festphasensynthese zugänglich gemacht werden. Darauf aufbauend sollten N^G -akzeptorsubstituierte (*R*)-Argininamide [Hutzler, 2001], die potentesten derzeit bekannten nichtpeptidischen Y_1 -Rezeptorantagonisten, an der Festphase synthetisiert werden.

Um zu überprüfen, ob die speziell für NPY-Antagonisten der Argininamid-Reihe entwickelte neue Methode allgemein für die Festphasensynthese von Peptiden einsetzbar ist, sollten exemplarisch auf diesem Weg eine Reihe von Tri- und Pentapeptiden dargestellt werden. Der Aufbau dieser Peptide erfolgte jeweils ausgehend von am Guanidinsystem mit dem Polymer verankerten Arginin.

Schließlich sollte noch, ausgehend von den am Guanidinsystem acylierten Argininamiden, untersucht werden, ob sich nach dem von hutzler beschriebenen allgemeinen Syntheschema [Hutzler, 2001] eine Verbindung darstellen lässt, die am Guanidinsystem eine über einen Spacer verankerte freie Aminogruppe trägt, welche sich zur Herstellung von Radioliganden für den Y_1 -Rezeptor z. B. durch Derivatisierung mit dem bolton-hunter-Reagenz eignet.

3. Chemischer Teil

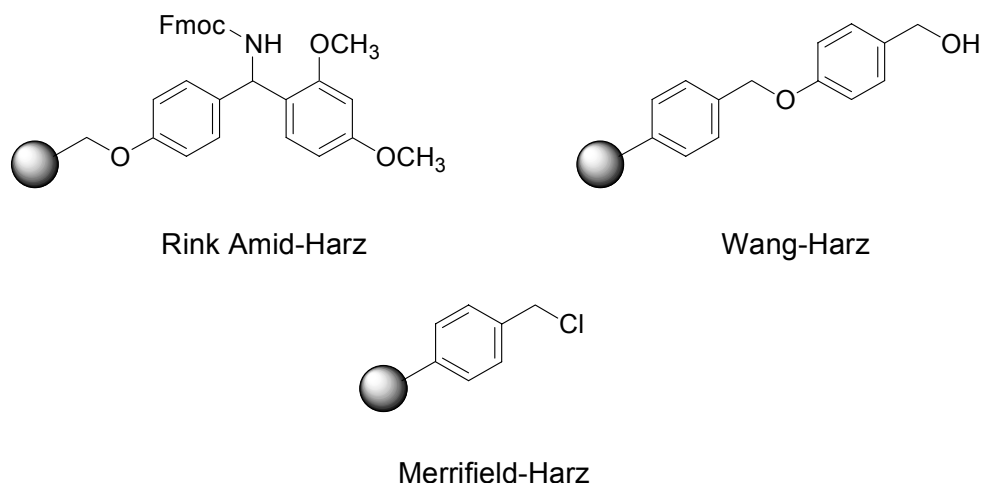
Das Repertoire an fester Phase durchführbarer Reaktionen hat in den letzten Jahren rapide zugenommen. Dennoch ist eine Übertragung der Reaktionen von der flüssigen auf die feste Phase nicht einfach möglich, häufig müssen neue Reaktionssequenzen gefunden werden [Ellingboe, 1998].

Ausschlaggebend für den Erfolg einer organischen Synthese an fester Phase ist die richtige Wahl des Trägermaterials sowie der daran gekoppelten Ankergruppen. Kombinatorische Synthesen an fester Phase beinhalten grundsätzlich mindestens drei Schritte. Zuerst wird eine Ankergruppe, die als Bindeglied zwischen der Polymermatrix und dem aufzubauenden Molekül dient, an die feste Phase gekoppelt [Gordon und Balasubramanian, 1999]. Quellfähige Harze (z.B. quervernetztes Polystyrol) bilden das polymere Trägermaterial. Dann wird das Produkt über eine speziell für die Festphasenreaktion entwickelte Synthesesequenz schrittweise aufgebaut, wobei es durch die Ankergruppe an die feste Phase gebunden bleibt. Unter definierten Bedingungen erfolgt zum Schluss die Abspaltung des Produkts vom Träger [Seligmann et al., 1998].

Die Struktur der Ankergruppe beeinflusst maßgeblich die Funktionalität des an ihnen stufenweise aufgebauten Moleküls, da unter moderaten Bedingungen eine Sollbruchstelle im Ankermolekül gebildet wird, über die das Produkt abgespalten wird. Dabei enthalten die Produkte die funktionelle Gruppe der Ankergruppe, an die sie gebunden waren [Ohlstein und Ruffolo, 2000].

Die Auswahl an Trägermaterialien ist limitiert, da Festphasensynthesen bisher hauptsächlich für die Peptidchemie optimiert wurden [Guillier et al., 2000]. Somit ist es erforderlich, auf die jeweiligen, meist ebenfalls zu entwickelnden Reaktionssequenzen, speziell zugeschnittene Träger und Ankergruppen zu entwerfen und zu synthetisieren [Comely und Gibson, 2001].

Die Darstellung der in Einleitung und Problemstellung angesprochenen Argininamide und Peptide sollte durch Festphasensynthese an verschiedenen polymeren Trägermaterialien (Merrifield-Harz, Rink Amid-Harz, Wang-Harz) ermöglicht werden (Formelschema 3-1).



Formelschema 3-1: Verwendete polymere Träger

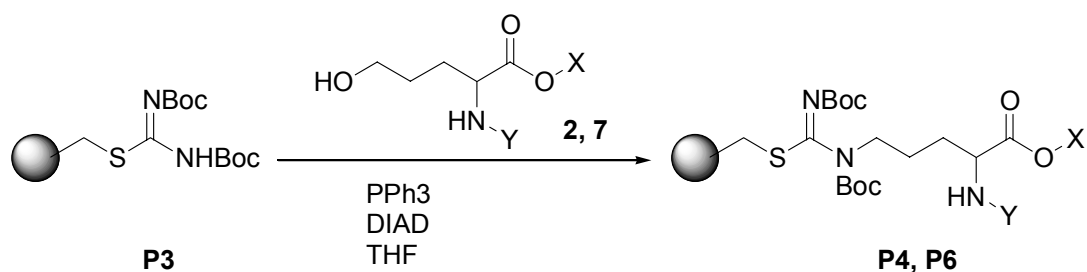
3.1 Synthese von Argininamiden am Merrifield-Harz

Zur Darstellung der Argininamide wird das chlormethylierte Merrifield-Harz mit Thioharnstoff und Di-*tert*-butyldicarbonat umgesetzt [Dodd und Wallace, 1998]. Auf diese Weise erhält man polymergebundenen *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)isothioharnstoff, der mit eigens zum Aufbau des Arginingrundgerüsts synthetisierten δ -Hydroxy- α -aminosäuren in einer MITSUNOBU-Reaktion [Mitsunobu et al., 1967] umgesetzt wird. DODD und WALLACE verwenden bei ihrer Synthese von mono-*N*-alkylierten Guanidinen an Merrifield-Harz strukturell sehr einfache Alkohole, an denen nach ihrer Umsetzung mit dem Polymer keine Strukturvariationen mehr vorgenommen werden können. Indem in dieser Arbeit die „einfachen“ Alkohole durch δ -Hydroxyaminosäuren ersetzt werden, ergibt sich erstmals die Möglichkeit, weitere Reaktionsschritte am so modifizierten Merrifield-Harz durchzuführen.

3.1.1 Darstellung der verwendeten Linker (δ -Hydroxy- α -aminosäuren)

Zu diesem Zweck wurden zwei unterschiedlich geschützte δ -Hydroxy- α -aminosäuren synthetisiert, die gemäß dem von DODD und WALLACE beschriebenen Syntheseprotokoll mit entsprechend modifiziertem Merrifield-Harz umgesetzt werden (Formelschema 3-2). Als Schutzgruppen für die α -Aminofunktion wurden die *tert*-Butoxycarbonylgruppe (Boc), die unter sauren Bedingungen abgespalten wird und gegenüber Basen und Hydrogenolyse stabil ist [Schnabel et al., 1971; Sakai et al., 1992], und die Fluorenylmethoxycarbonylgruppe

(Fmoc), die unter basischen Bedingungen abgespalten wird [Atherton et al., 1987] und gegen Säuren und Hydrogenolyse inert ist, verwendet. Zum Schutz der Carboxylgruppe wurde der *tert*-Butylester hergestellt, der die gleichen Eigenschaften bezüglich der Säure- bzw. Basenstabilität wie die Boc-Schutzgruppe aufweist [Greene and Wuts, 1998].



Nr.	2, P4	7, P6
X		
Y		

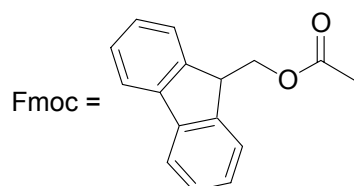
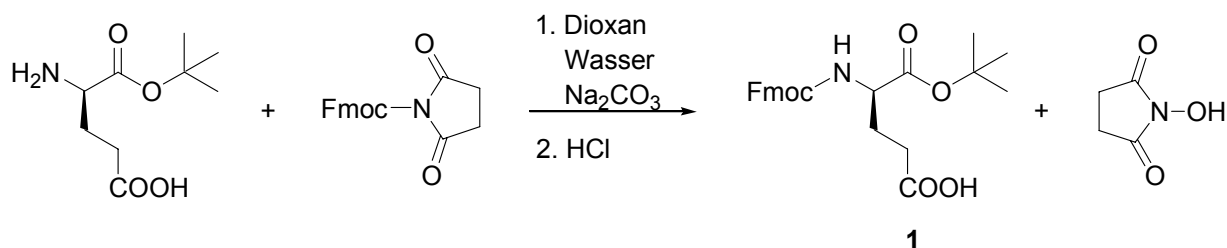
Formelschema 3-2: Umsetzung von modifiziertem Merrifield-Harz mit den synthetisierten δ -Hydroxy- α -aminosäuren

3.1.1.1 Synthese von (*R*)-2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-5-hydroxypentansäure-*tert*-butylester (2) ausgehend von (*R*)-Glutaminsäure- α -*tert*-butylester

3.1.1.1.1 Herstellung von (*R*)-*N*-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)glutaminsäure- α -*tert*-butylester (1)

Der käufliche (*R*)-Glutaminsäure- α -*tert*-butylester wird in 10 %iger Natriumcarbonat-Lösung suspendiert und mit Fmoc-succinimid, gelöst in Dioxan, bei Raumtemperatur umgesetzt. Anschließend schüttelt man die Reaktionsmischung mit Wasser und Diethylether aus, säuert mit 1 N Salzsäure an und schüttelt nochmals mit Essigsäureethylester aus. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt [Lapatsanis, 1983]. Man erhält die gewünschte

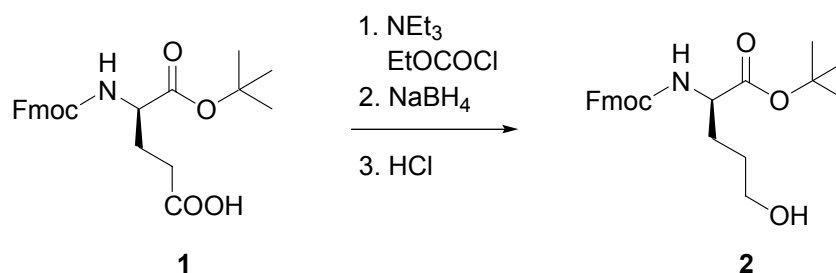
Fmoc-geschützte Aminosäure (**1**) in sehr guten Ausbeuten (Formelschema 3-3).



Formelschema 3-3

3.1.1.1.2 Herstellung von (*R*)-2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-5-hydroxypentansäure-*tert*-butylester (**2**)

Die Carbonsäure **1** wird in absolutem THF 45 min mit Triethylamin und Ethylchlorformiat gerührt. Der ausgefallene weiße Feststoff wird abfiltriert und die klare Lösung, die das gebildete gemischte Anhydrid enthält, wird langsam zu einer wässrigen Lösung von Natriumborhydrid gegeben. Nach Ansäuern und Extraktion mit Diethylether wird das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt [Ramaiinngam und Woodard, 1988]. Man erhält den Alkohol **2** als farbloses zähes Öl in guten Ausbeuten (Formelschema 3-4).



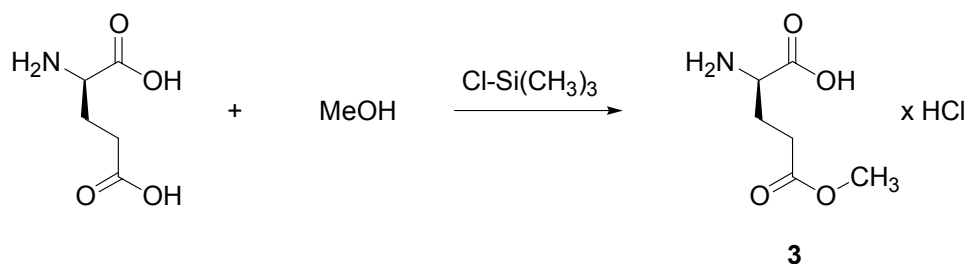
Formelschema 3-4

3.1.1.2 Synthese von (*R*)-2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-5-hydroxypentansäure-*tert*-butylester (**7**) ausgehend von (*R*)-Glutaminsäure

Für die Synthese der Hydroxyaminosäure **7** wurde aus Kostengründen nicht der (*R*)-Glutaminsäure- α -*tert*-butylester sondern die wesentlich preiswertere ungeschützte (*R*)-Glutaminsäure verwendet.

3.1.1.2.1 Darstellung von (*R*)-Glutaminsäure- γ -methylester (**3**)

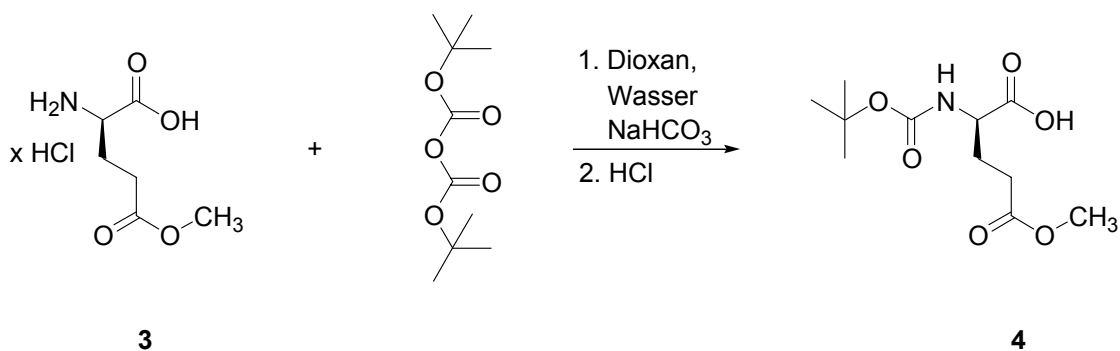
(*R*)-Glutaminsäure wird in absolutem Methanol gelöst und mit Chlortrimethylsilan versetzt. Man rührt sechs Minuten bei Raumtemperatur, engt die Lösung ein und gibt Essigsäureethylester zu, bis ein weißer Feststoff ausfällt (Formelschema 3-5). Dieser wird abgesaugt und kann ohne weitere Reinigung verwendet werden. Chlortrimethylsilan liefert hier die zur Veresterung benötigte Säure. Ähnliche Reaktionen mit HCl-Gas, verlaufen langsamer und mit schlechteren Ausbeuten [Brook und Chan, 1983].



Formelschema 3-5

3.1.1.2.2 Synthese von (*R*)-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)glutaminsäure- γ -methylester (**4**)

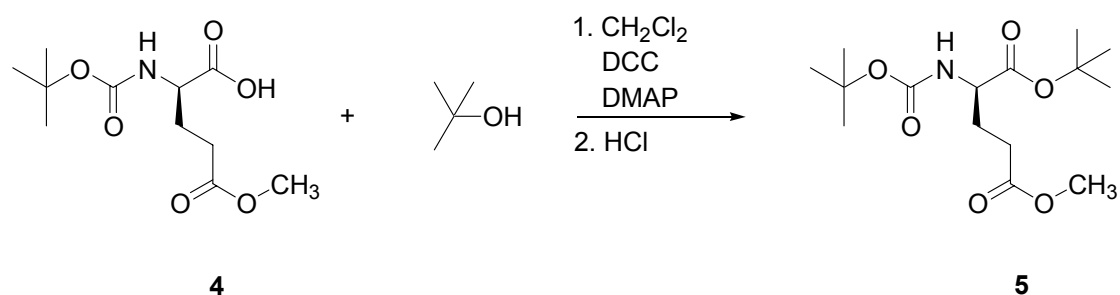
Zum Schutz der α -Aminofunktion wird hier die *tert*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppe verwendet. Sie wird durch Umsetzung der Aminosäure **3** mit Di-*tert*-butyl-dicarbonat (Boc₂O) in Dioxan/wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung eingeführt. Die Mischung wird mit Diethylether gewaschen, angesäuert und anschließend mit Essigsäureethylester ausgeschüttelt [Shimamoto et al., 1991]. Die Verbindung **4** wird in quantitativer Ausbeute erhalten und braucht nicht weiter gereinigt zu werden (Formelschema 3-6).



Formelschema 3-6

3.1.1.2.3 Darstellung von (R)-N-(*tert*-Butoxycarbonyl)glutaminsäure- α -*tert*-butyl- γ -methyl-ester (5)

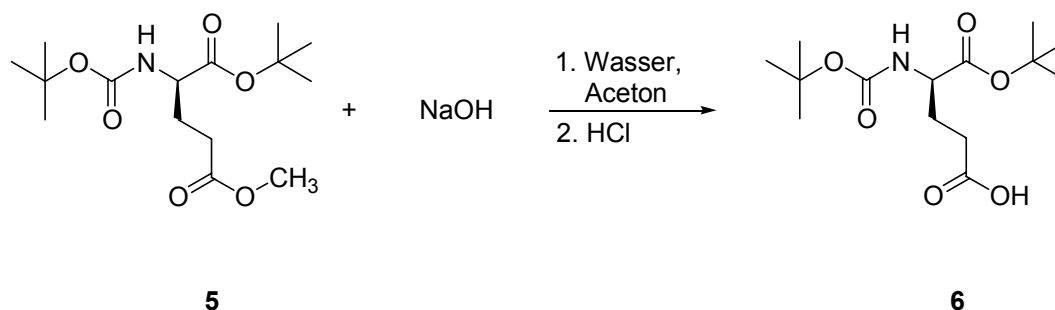
Die freie α -Carboxylfunktion von 4 wird nun als *tert*-Butylester geschützt. Dazu löst man die Glutaminsäure 4 in Methylenchlorid und verestert unter Zugabe von 4-(Dimethylamino)pyridin (Katalysator) und *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid mit *tert*-Butanol. Der entstandene Dicyclohexylharnstoff wird abgesaugt, das Filtrat in Diethylether aufgenommen und gewaschen. Das Rohprodukt kann durch Säulenchromatographie gereinigt werden [Ramaingam und Woodard, 1988]. Man erhält die vollständig geschützte Glutaminsäure 5 als zähes Öl in guten Ausbeuten (Formelschema 3-7).



Formelschema 3-7

3.1.1.2.4 Spaltung des Methylesters von **5** zum (*R*)-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)glutaminsäure- α -*tert*-butylester (**6**)

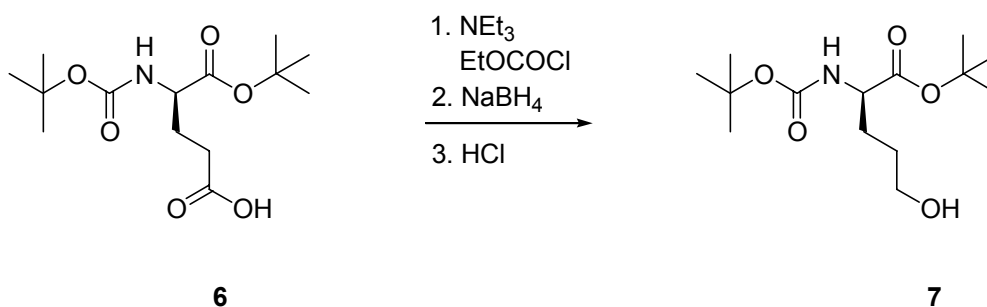
Im Gegensatz zum *tert*-Butylester kann die Methylestergruppe von **5** unter milden alkalischen Bedingungen gespalten werden. **5** wird in einer Mischung aus Aceton und Wasser gelöst, auf 0 °C abgekühlt und tropfenweise mit Natronlauge versetzt. Die Zugabe der Base erfolgt unter strikter pH-Kontrolle (pH 8), da es bei einem höheren pH-Wert zur Racemisierung der Glutaminsäure kommen könnte [Ramaiingam und Woodard, 1988]. Man engt die Lösung ein, versetzt mit Wasser und schüttelt mit Diethylether aus. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels i. Vak. erhält man **6** in sehr guten Ausbeuten (Formelschema 3-8).



Formelschema 3-8

3.1.1.2.5 Herstellung von (*R*)-2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-5-hydroxypentansäure-*tert*-butylester (**7**)

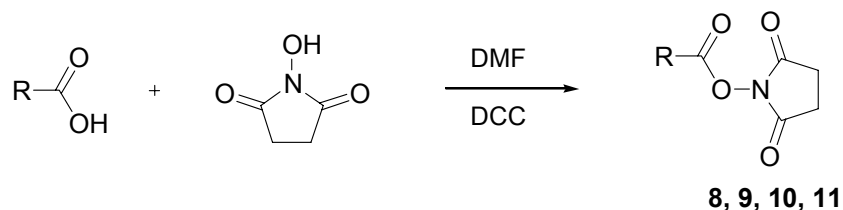
Die Reduktion von **6** zu **7** (Formelschema 3-9) erfolgt analog zu der unter 3.1.1.1.2 beschriebenen Methode durch Reduktion eines in situ hergestellten gemischten Anhydrids mit Natriumborhydrid.



Formelschema 3-9

3.1.2 Synthese der Arylalkansäuresuccinimidylester 8-11

Zur N^α -Acylierung der polymergebundenen Argininderivate (vgl. 6.2.3, Schritt 8) mit Diphenyl-, Cyclohexylphenyl- und Bis(4-chlorphenyl)essigsäure sowie 2,2-Diphenylpropionsäure wurden die entsprechenden aktivierten Ester benötigt. Dazu wurden die Carbonsäuren zunächst mit *N*-Hydroxysuccinimid verestert (**8-11**). Die Darstellung der aktivierten Ester stellt neben der Azid-, gemischten Anhydrid- und Carbodiimid-Methode eine weitere Möglichkeit zur Aktivierung der Carboxylgruppe in Carbonsäuren dar. Dabei wurde nach dem von ANDERSON beschriebenen Verfahren die Arylalkansäuren mit äquimolaren Mengen *N*-Hydroxysuccinimid und *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid in abs. DMF umgesetzt [Anderson et al., 1964]. Der ausgefallene *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt, und nach Umkristallisation aus Methanol konnten die gewünschten Acylierungsreagenzien **8-11** in reiner Form und guten Ausbeuten erhalten werden (Formelschema 3-10). Die Reaktivität der *N*-Hydroxysuccinimidester gegenüber Nucleophilen ist nicht nur ihrem Anhydridcharakter, sondern auch dem elektronenziehenden Effekt des dem Estersauerstoff benachbarten *N*-Atoms zuzuschreiben [Bodansky, 1993].



Nr.	8	9	10	11
R				

Formelschema 3-10

3.1.3 Festphasensynthese am Merrifield-Harz

Für die Durchführung aller in dieser Arbeit beschriebenen Festphasensynthesen wurde nach Plänen von SCHALKHAUSSER von der Glasbläserwerkstatt der Fakultät für Chemie und Pharmazie eine Stickstoff/Vakuumfritte mit thermostatisierbarem Außenmantel angefertigt (Abbildung 3-1). Das Harz sowie alle Lösungsmittel werden, soweit nötig unter Inertgas, von oben in die Reaktionskammer eingefüllt. Man verschließt die Apparatur mit einem Stopfen und schüttelt die gelartige Mischung bei geschlossenem Absperrhahn gegebenenfalls unter Thermostatisierung für die angegebene Zeit. Danach saugt man durch Anlegen von Vakuum am unteren Hahn das Lösungsmittel mit den enthaltenen überschüssigen Reaktanden und eventuell freigesetzten (Neben-)Produkten ab. Durch Zugabe von Lösungsmittel durch den oberen Schliff, erneutes Schütteln und Absaugen wird das Harz mehrmals nachgewaschen. Vor der Überprüfung auf Vollständigkeit der Reaktion wird das Harz zwei Stunden im Ölpumpenvakuum getrocknet.

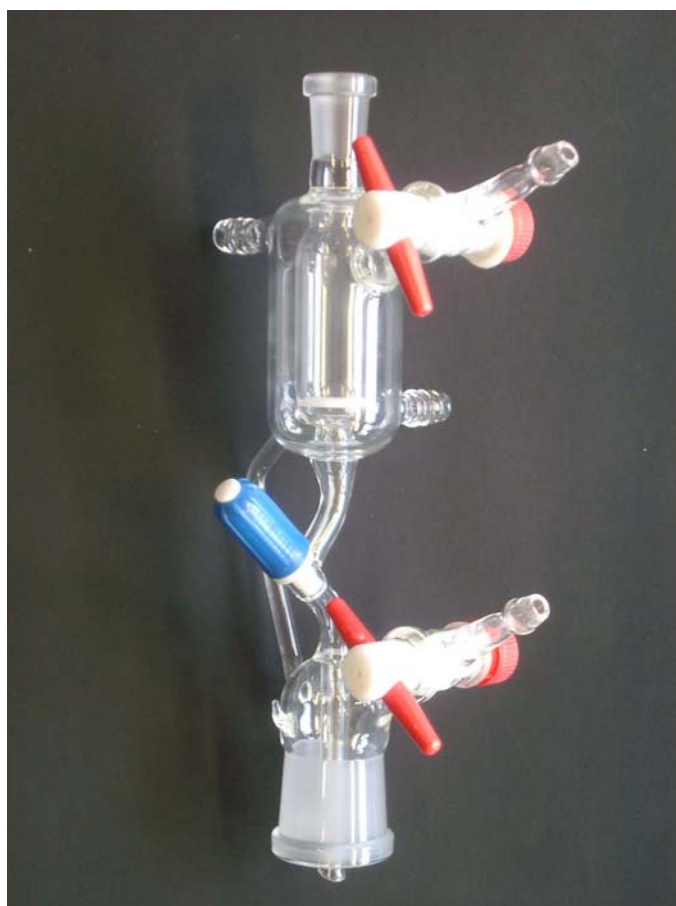


Abbildung 3-1: Reaktionsgefäß zur Durchführung der Festphasensynthese

Um mit einem möglichst geringen Chemikalienüberschuss arbeiten zu können, empfiehlt es sich, dafür zu sorgen, dass das Harz nach dem Einfüllen mit einem Überschuss an Lösungsmittel vorquillt. Durch kurzzeitiges Absaugen bei geöffnetem Absperrhahn entfernt man anschließend so viel Lösungsmittel, dass sich der Zwischenraum zwischen wieder geschlossenem Absperrhahn und Frittenboden vollständig mit Lösungsmittel füllt und das Harz gerade noch von Lösungsmittel bedeckt ist. Auf das so vorbereitete Harz trägt man die Reaktanden in möglichst konzentrierter Form auf.

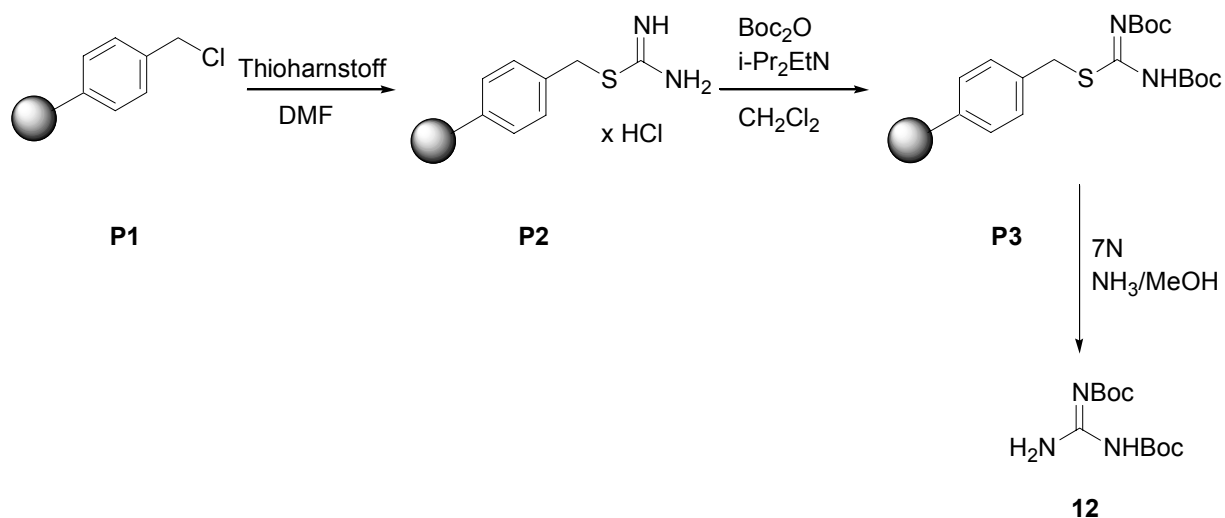
Überprüfung auf Vollständigkeit der Reaktionen am polymeren Träger:

Nach allen Reaktionen an polymeren Trägern, die das Entstehen bzw. Verschwinden einer freien Aminogruppe bewirken, wurde mit dem von KAISER und Mitarbeitern für die Festphasensynthese entwickelten Ninhydrin-Test auf Vollständigkeit der Reaktion geprüft [Kaiser et al., 1970]. Durch eine einfache Farbreaktion mit dem Ninhydrin-Reagenz können freie Aminogruppen am polymeren Träger nachgewiesen werden. Damit lässt sich sehr leicht der Erfolg von Kupplungsreaktionen an der Aminfunktion bzw. die Abspaltung von Amin-Schutzgruppen überprüfen. Der Nachweis ist äußerst sensitiv: eine mindestens 99 %ige *N*-Acylierung muss stattgefunden haben, um einen negativen Ninhydrin-Test anzuzeigen. Mit Hilfe dieses Tests ist daher eine präzisere Beurteilung eines erfolgreichen Syntheseschrittes möglich als anhand der aufgenommenen FT-IR-Spektren.

3.1.3.1 Herstellung von polymergebundenem *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)isothioharnstoff (P3**)**

Der polymergebundene *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)isothioharnstoff (**P3**) stellt das zentrale Reagenz in der Festphasensynthese von mono-*N*-alkylierten Guanidinen nach DODD und WALLACE dar. Die Umsetzung von Merrifield-Harz mit dem fünffachen molaren Überschuss an Thioharnstoff in DMF bei 75 °C liefert nach 16 Stunden das polymergebundene Isothiuroniumsalz (**P2**). Die beiden freien Aminogruppen von **P2** werden in einem Schritt Boc-geschützt. Dazu wird **P2** mit Di-*tert*-butyldicarbonat (sechsfacher Überschuss) und Diisopropylethylamin (elffacher Überschuss) in Methylenchlorid bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach 40 Stunden erhält man die Verbindung **P3** [Dodd und Wallace, 1998]. Die Vollständigkeit beider Umsetzungen wurde jeweils durch den Kaiser-Test bestätigt [Kaiser et al., 1970]. Zur Identifikation des Zwischenproduktes wurde der polymergebundene *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)isothioharnstoff **P3** mit 7 N methanolischer Ammoniaklösung versetzt

(Formelschema 3-11). Nach 12 Stunden konnte Bis(*tert*-butoxycarbonyl)guanidin (**12**) in sehr guten Ausbeuten erhalten werden.

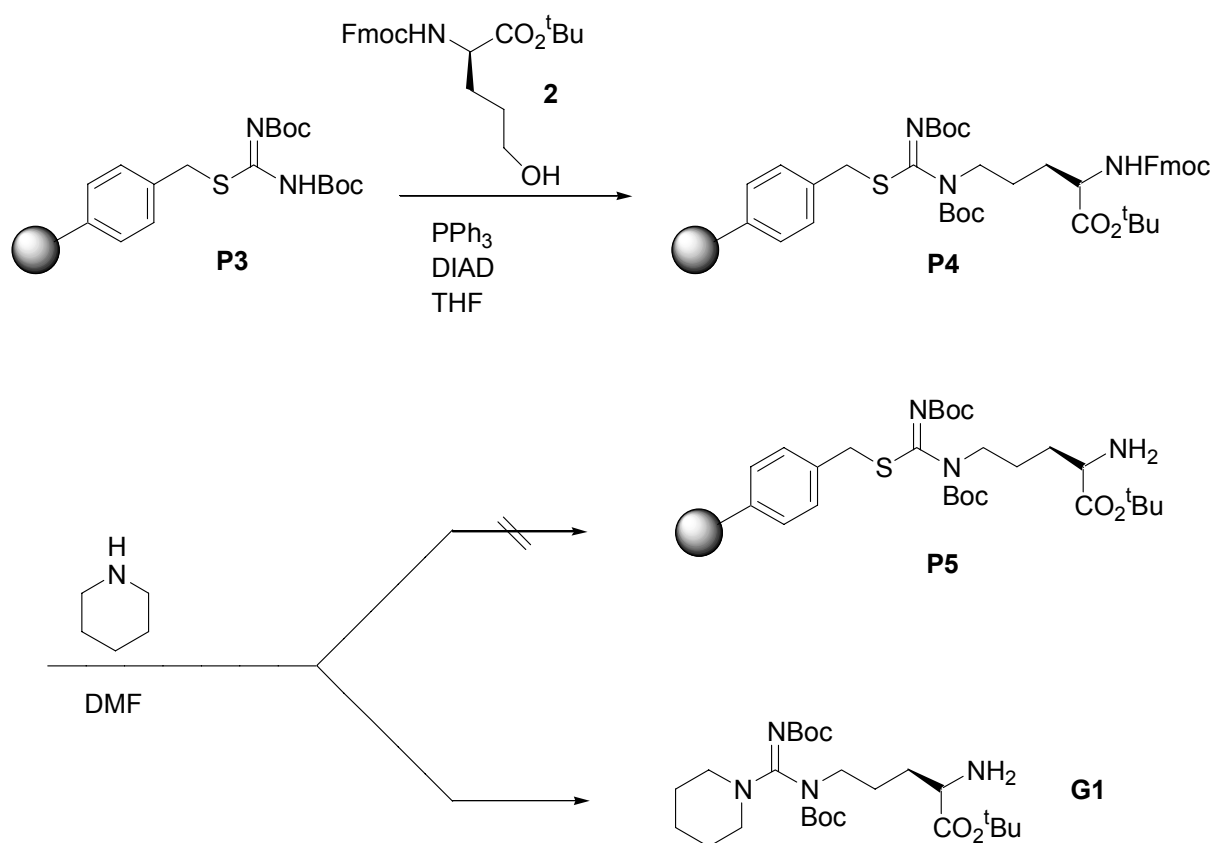


Formelschema 3-11

3.1.3.2 Herstellung und Reaktionsverhalten von polymergebundenem (*R*)-5-[Bis(Boc)-isothioureido]-2-(Fmoc-amino)pentansäure-*tert*-butylester (**P4**)

(*R*)-2-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-5-hydroxypentansäure-*tert*-butylester (**2**) verfügt mit der Fmoc- und der *tert*-Butylester-Schutzgruppe über zwei zueinander orthogonale Schutz-gruppen, was die geplanten nachfolgenden Synthesen am polymeren Träger erleichtern sollte.

Das Harz **P3** wird jeweils mit dem fünffachen molaren Überschuss an **2**, Triphenylphosphin (PPh₃) und Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) in THF für 20 Stunden geschüttelt. Durch diese MITSUNOBU-Reaktion [Mitsunobu et al., 1967] erhält man die Verbindung **P4** (Formelschema 3-12). Um zu **P5** zu gelangen, sollte im nächsten Schritt die Fmoc-Schutzgruppe von der α -Aminofunktion entfernt werden. Die bekannteste Methode zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe ist die Umsetzung des zu entschützenden Substrats mit einer Lösung von Piperidin in DMF. Diese Bedingungen führen hier aber nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Anscheinend verursacht der extreme Piperidinüberschuss nicht nur eine Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe, sondern gleichzeitig eine Abspaltung der Anker Verbindung vom Harz. Das disubstituierte Guanidin **G1** konnte massenspektroskopisch identifiziert werden. Auch die Umsetzung mit Tetrabutylammoniumfluorid [Ueki und Amemiya, 1987] anstelle von Piperidin führt nicht zum gewünschten polymergebundenen Zwischenprodukt **P5**.



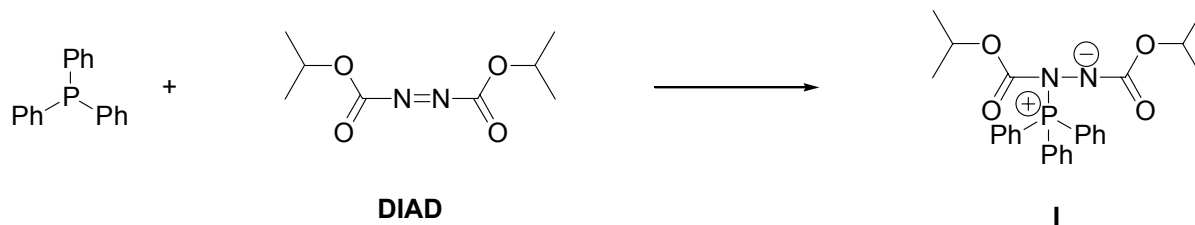
Formelschema 3-12

3.1.3.3 Festphasensynthese des Argininamids 18 am Merrifield Harz

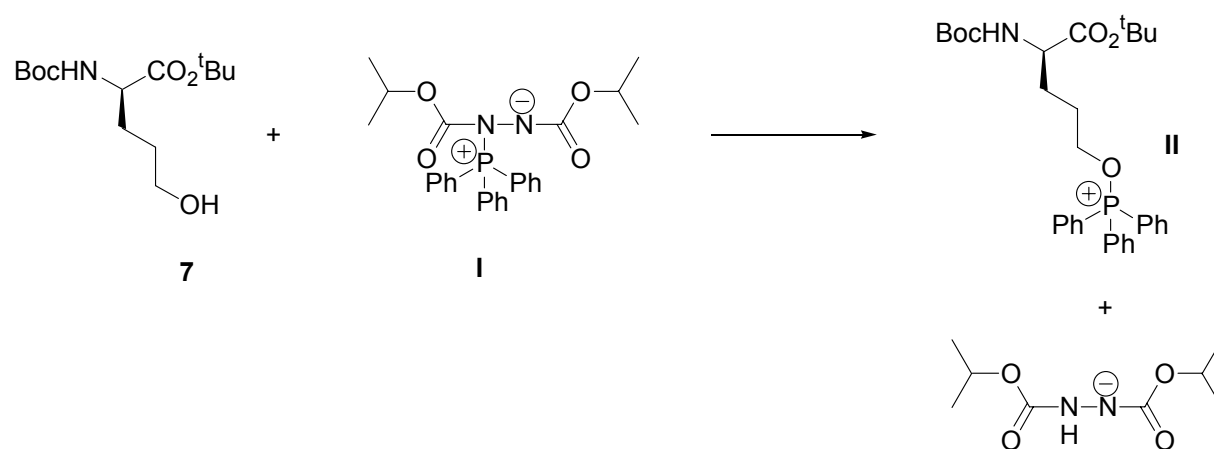
Da sich der Linker **2** mit der Schutzgruppenkombination Fmoc/^tBu als ungeeignet für die geplante Synthesesequenz erwies, wurde (*R*)-2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-5-hydroxypentansäure-*tert*-butylester (**7**) als Linker verwendet. Dieser wurde, analog zu dem Linker **2**, in einer MITSUNOBU-Reaktion [Mitsunobu et al., 1967] mit dem Harz **P3** verknüpft.

Die MITSUNOBU-Reaktion läuft folgendermaßen ab (Formelschema 3-13):

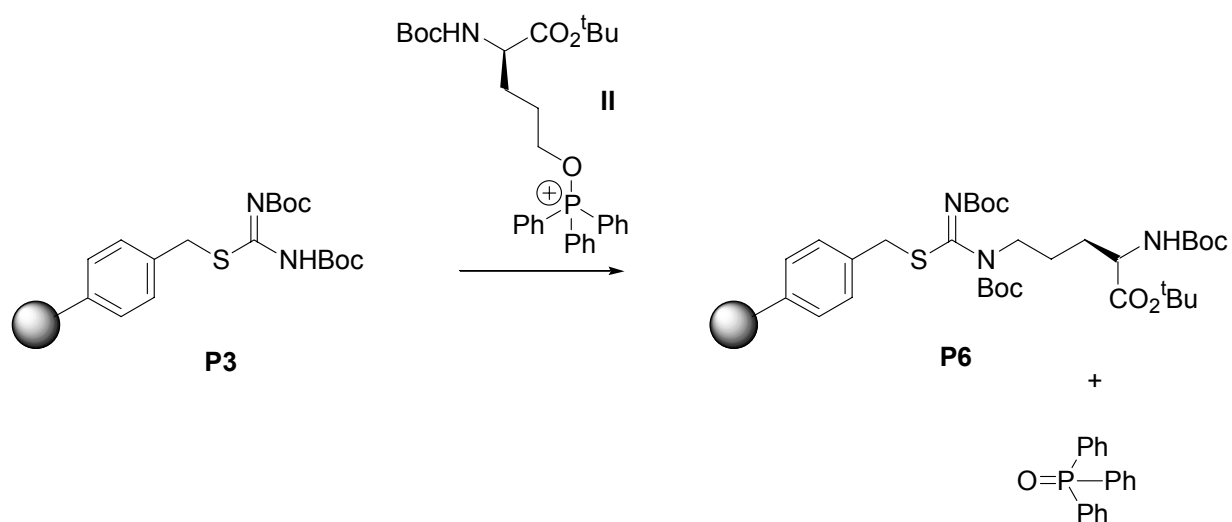
Schritt 1: Bildung eines Zwitterions



Schritt 2: Aktivierung des Alkohols



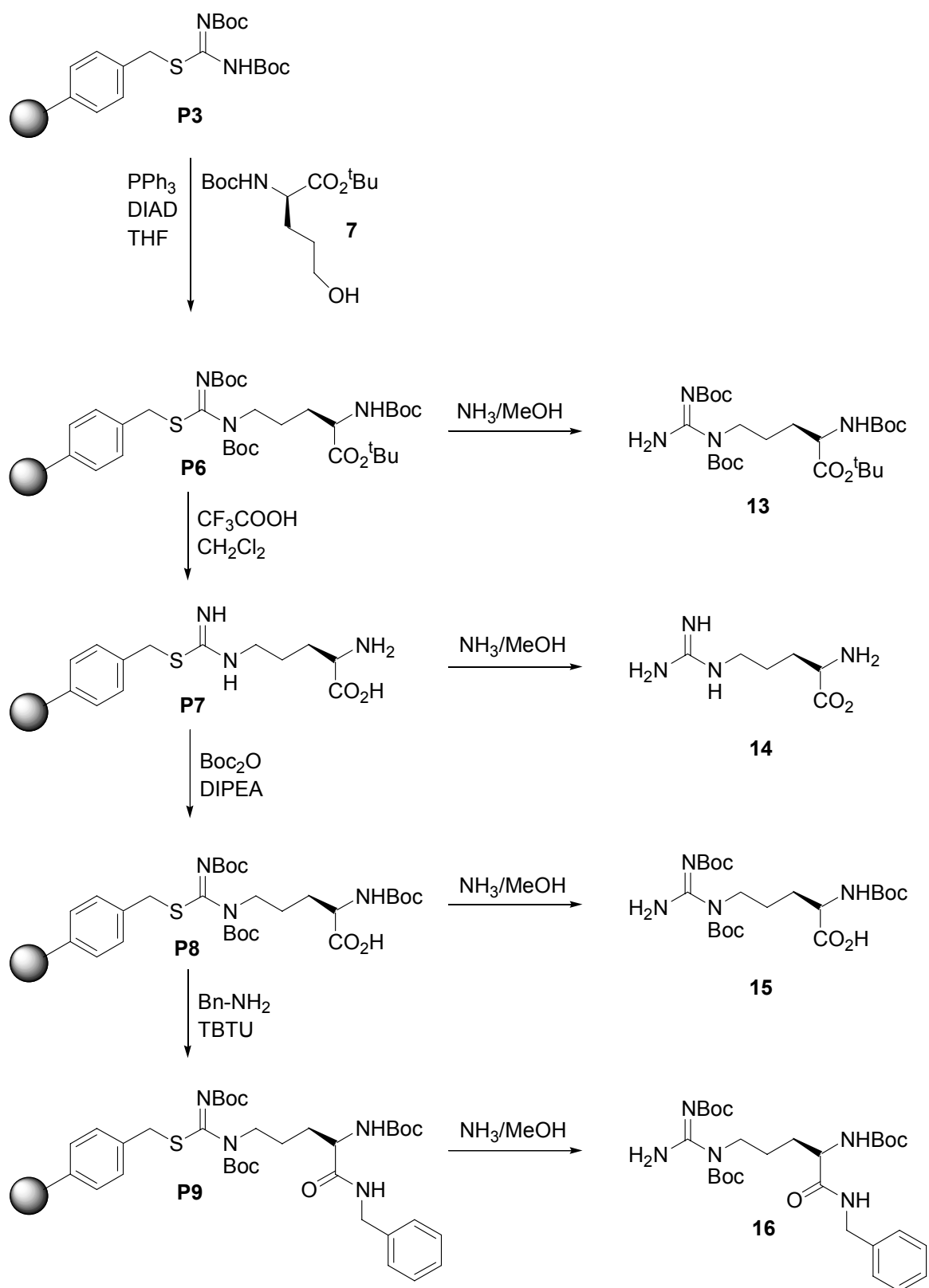
Schritt 3: S_N2-Reaktion



Formelschema 3-13

In Schritt 1 reagieren DIAD und Triphenylphosphin zu einem zwitterionischen Addukt (**I**). Dieses Addukt bewirkt in Schritt 2 die Aktivierung des primären Alkohols **7**. Die aktivierte Spezies (**II**) reagiert in Schritt 3 mit dem polymergebundenen *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)-isothioharnstoff (**P3**) in einer S_N2-Reaktion unter Abspaltung von Triphenylphosphinoxid. Man erhält das gewünschte Zwischenprodukt **P6**.

Zur besseren Charakterisierung der in der nachfolgenden Synthesesequenz auftretenden Zwischenprodukte wird jeweils eine Probe des polymergebundenen Intermediats mit Ammoniak behandelt und auf diese Weise analog zu Bis(*tert*-butoxycarbonyl)guanidin (**12**) (vgl. Formelschema 3-11) vom Träger abgespalten (Formelschema 3-14).



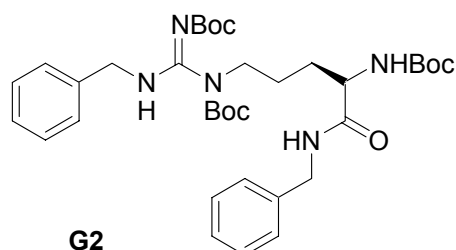
Formelschema 3-14

Vom polymeren Zwischenprodukt **P6** kann nach Abspaltung mit NH_3/MeOH der dreifach Boc-geschützte Arginin-*tert*-butylester **13** erhalten werden (Formelschema 3-14).

Von **P6** werden durch Umsetzung mit 50 %iger TFA die drei Boc-Schutzgruppen und die *tert*-Butyl-Schutzgruppe entfernt. Man erhält die polymere Verbindung **P7**, die nach Ammonolyse (*R*)-Arginin **14** liefert.

Die freien Aminogruppen von **P7** werden im nächsten Schritt wieder Boc-geschützt. Nun bleibt nur noch die Carboxylgruppe ungeschützt (Verbindung **P8**). Die Behandlung von **P8** mit NH_3/MeOH liefert die dreifach Boc-geschützte Verbindung **15**.

Mit Hilfe von TBTU als Kupplungsreagenz wird **P8** mit Benzylamin zum Amid **P9** umgesetzt. Die beiden Komponenten werden im fünffachen Überschuss zugegeben, wobei sich der hohe Überschuss der Aminkomponente als Nachteil erweist. Neben der gewünschten Reaktion zu **P9** kommt es auch zur Abspaltung der Verbindung **G2** (Formelschema 3-15, massenspektroskopisch nachgewiesen).

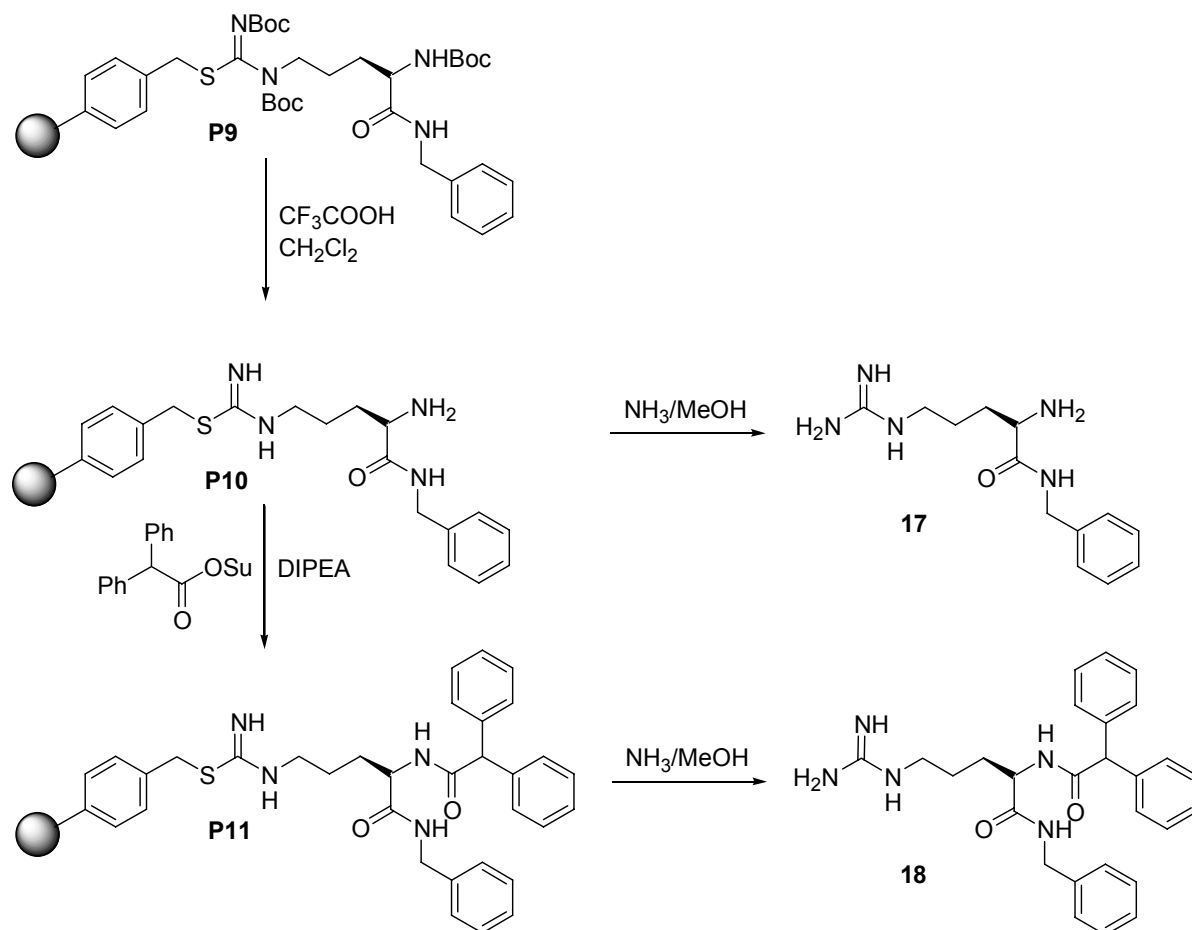


Formelschema 3-15

Diese Nebenreaktion ist die Hauptursache für die sehr niedrige Ausbeute von 8 % Verbindung **16** (bezogen auf die Beladung des eingesetzten Harzes) nach Behandlung von **P9** mit methanolischer Ammoniaklösung. Die Ausbeute an **16** konnte weder durch Variation der Benzylaminkonzentration noch durch Veränderung der Reaktionstemperatur und der Reaktionsdauer verbessert werden (Formelschema 3-15).

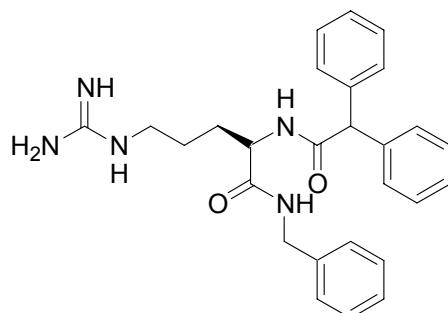
Ungeachtet der schlechten Ausbeute nach Amidierung von **P8** mit Benzylamin wurde der Syntheseweg mit **P9** fortgesetzt (Formelschema 3-16). Durch Abspaltung der drei Boc-Gruppen von **P9** entsteht **P10** quantitativ, wie die Ausbeute (99%) an (*R*)-*N*-(phenylmethyl)argininamid (**17**) nach Ammonolyse von **P10** beweist.

Die *N*^α-Acylierung von **P10** mit Diphenylelessigsäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-ylester (**8**) liefert **P11**. Als Hilfsbase wird DIPEA verwendet. Beide Komponenten werden in fünffachem molaren Überschuss eingesetzt. Nachdem man 48 Stunden bei 40 °C geschüttelt hat, werden die überschüssigen Reagenzien durch Waschen entfernt und eine Ammonolyse zu (*R*)-*N*^α-Diphenylacetyl-*N*-(phenylmethyl)argininamid (**18**) durchgeführt (Formelschema 3-16). Die Ausbeute beträgt nach chromatographischer Reinigung 4%, bezogen auf die Beladung des eingesetzten Harzes **P1**.



Formelschema 3-16

Prinzipiell sind die von UFFRECHT und AIGLSTORFER entwickelten NPY-Antagonisten mit Arginin-Partialstruktur [Uffrecht, 1996 und Aiglstorfer, 1999] ebenfalls auf diesem Weg durch Festphasensynthese zugänglich.



Formelschema 3-17: An der Festphase synthetisierter NPY Y₁-Antagonist

Allerdings sind die Ausbeuten mehr als unbefriedigend. Der Grund hierfür ist die bereits bei Raumtemperatur zu große Labilität des Linkers bei Verwendung primärer Amine.

Aus diesem Grund ist es nötig, alternative Synthesestrategien bzw. andere polymere Träger zu verwenden.

3.2 Synthese von Argininamiden am Rink Amid-Harz

Eine weitere Möglichkeit zur Festphasensynthese von Guanidinen stellt die Umsetzung einer polymergebundenen Aminogruppe mit einem Isothiocyanat zum entsprechenden Thioharnstoff [Schneider et al., 1998], gefolgt von S-Methylierung und Substitution mit primären Aminen dar. Man gelangt auf diesem Weg zu den entsprechenden polymergebundenen Guanidinen.

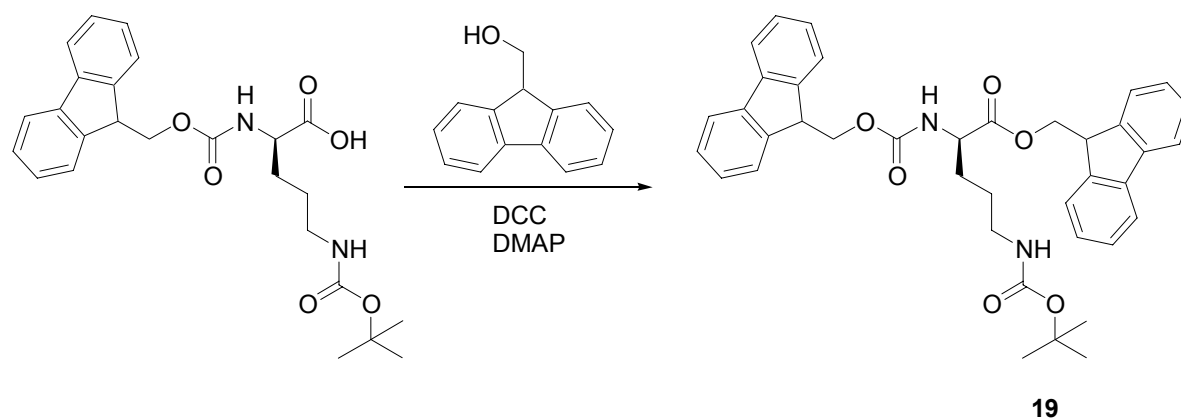
Das gängigste polymere Trägermaterial für diese Art von Umsetzungen ist das Rink Amid-Harz. Die an diesem Polymer dargestellten Verbindungen können mit Säuren (z.B. Trifluoressigsäure) abgespalten werden.

Für die Darstellung der Argininamide am Rink Amid-Harz wird ein mit geeigneten Schutzgruppen versehenes Ornithinderivat benötigt. Als Schutzgruppen für die α -Aminfunktion eignen sich wegen der Säurelabilität des Harzes nur die Benzoyloxycarbonyl (Z)- und die 9-Fluorenylmethoxycarbonylschutzgruppe (Fmoc). Die Z-Schutzgruppe wird üblicherweise hydrogenolytisch abgespalten, was allerdings in den hier verwendeten Stickstoffriten technisch nicht durchführbar ist. Somit kommt nur die basenlabile [Atherton et al., 1987] Fmoc-Schutzgruppe in Frage. Zum Schutz der Carboxylfunktion wird diese als 9-Fluorenylmethylester (Fm) geschützt [Han und Chorev, 1999]. Die Fm-Schutzgruppe weist die gleichen Stabilitätscharakteristika auf wie die Fmoc-Schutzgruppe. Beide sind daher nicht orthogonal zueinander.

3.2.1 Synthese von (*R*)-*N* ^{α} -(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)ornithin-(9-fluorenylmethyl)ester (20)

3.2.1.1 Veresterung von (*R*)-*N* ^{α} -Fmoc-*N* ^{δ} -Boc-ornithin mit 9-Hydroxymethylfluoren

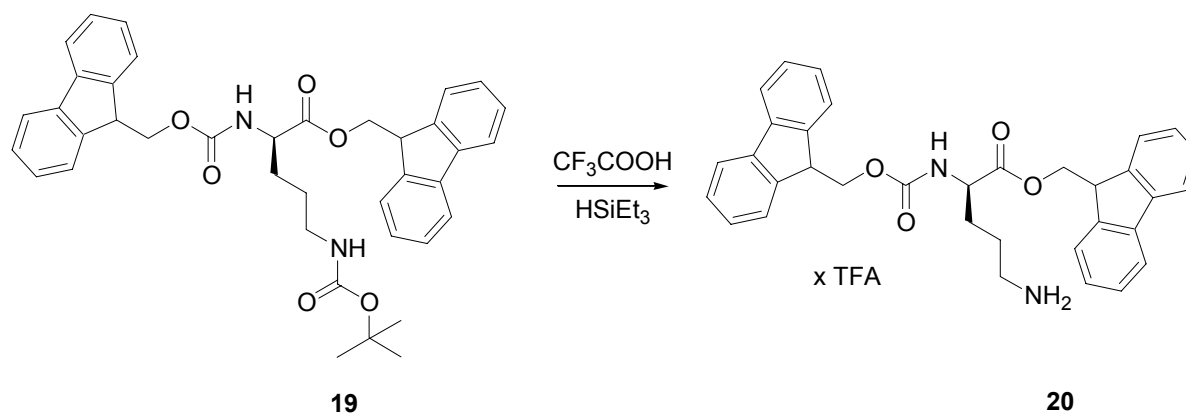
Das käufliche (*R*)-*N* ^{α} -Fmoc-*N* ^{δ} -Boc-ornithin wird zusammen mit 9-Hydroxymethylfluoren, 4-(Dimethylamino)pyridin und Dicyclohexylcarbodiimid in Dichlormethan gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Dicyclohexylharnstoff wird abgesaugt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie gereinigt [Han, 1999]. Man erhält den (*R*)-*N* ^{α} -Fmoc-*N* ^{δ} -Boc-ornithin-(9-fluorenylmethyl)ester (**19**) als farbloses zähes Harz in guten Ausbeuten (Formelschema 3-18).



Formelschema 3-18

3.2.1.2 Abspaltung der Boc-Schutzgruppe von (*R*)-*N*^α-Fmoc-*N*^δ-Boc-ornithin-(9-fluorenylmethyl)ester (**19**)

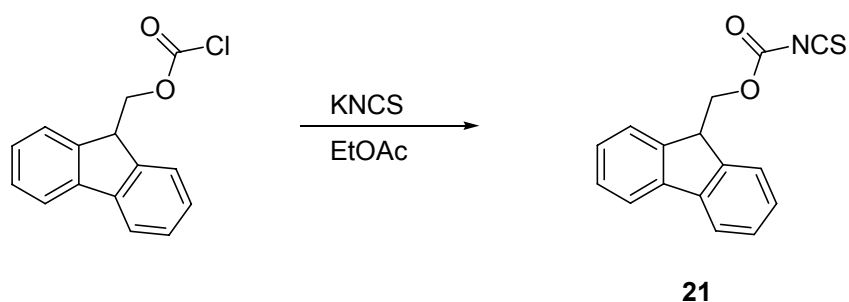
Verbindung **19** wird in Methylenchlorid gelöst und mit Trifluoressigsäure und Triethylsilan versetzt. Nach zwei Stunden dampft man die Lösung ein und erhält quantitativ den (*R*)-*N*^α-Fmoc-ornithin-(9-fluorenylmethyl)ester als Trifluoracetat (**20** x TFA) [Mehta, 1992] (Formelschema 3-19).



Formelschema 3-19

3.2.2 Synthese von Fluorenylmethoxycarbonylisothiocyanat (**21**)

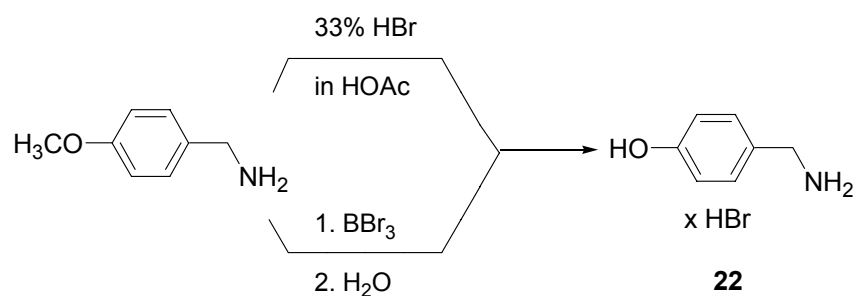
Zur Darstellung von polymergebundenem Thioharnstoff am Rink Amid-Harz wird als Edukt u.a. Fluorenylmethoxycarbonylisothiocyanat (**21**) benötigt. Die Darstellung erfolgt nach einer von KEARNEY beschriebenen Methode [Kearney et al., 1998]. Fluorenylmethoxycarbonylchlorid wird in wasserfreiem Essigsäureethylester gelöst und unter Stickstoffatmosphäre langsam zu einer 0 °C kalten Suspension von trockenem Kaliumthiocyanat in wasserfreiem Essigsäureethylester getropft. Nach zehn Stunden zieht man das Lösungsmittel ab und erhält das Isothiocyanat **21** nach säulenchromatographischer Aufreinigung in 80 %iger Ausbeute (Formelschema 3-20).



Formelschema 3-20

3.2.3 Synthese von 4-Hydroxybenzylamin (**22**)

Zur Amidierung der polymergebundenen Ornithinderivate wird 4-Hydroxybenzylamin (**22**) benötigt. Das primäre Amin kann durch Etherspaltung von 4-Methoxybenzylamin mit Bromwasserstoffsäure in Eisessig hergestellt werden. **22** ist ebenso zugänglich durch eine Etherspaltung mit der Lewis-Säure Bortribromid (Formelschema 3-21).



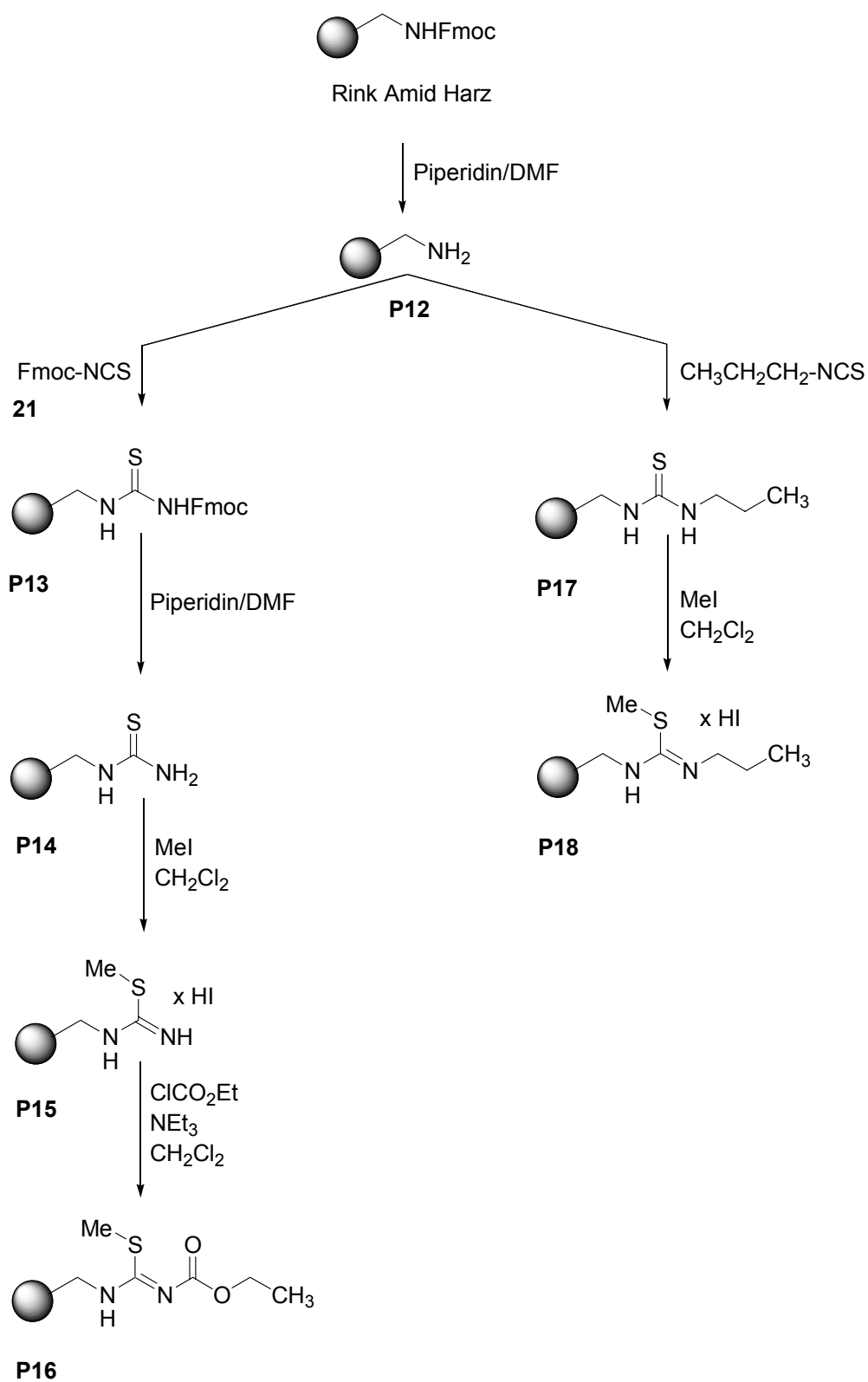
Formelschema 3-21

Die freie Base von **22** wird aus einer Lösung von **22** • HBr in möglichst wenig destilliertem Wasser durch Einstellung eines pH-Wertes von 9 mit wässriger Ammoniaklösung erhalten. **22** kristallisiert dabei aus.

3.2.4 Darstellung von polymergebundenen *N*-Alkoxycarbonyl- und *N*-Alkyl-S-methylisothioharnstoffen (**P16**, **P18**)

Ausgangsverbindung für die Synthese der beiden Verbindungen **P16** und **P18** ist Rink Amid-Harz. Im ersten Schritt wird die Fmoc-Schutzgruppe des Amid-Harzes mit Piperidin abgespalten (**P12**) (Formelschema 3-22).

Um zur Verbindung **P16** zu gelangen, wird die Aminogruppe von **P12** zunächst mit Fluorenylmethoxycarbonylisothiocyanat (**21**) umgesetzt (**P13**). Anschließend wird die neu eingeführte Fmoc-Schutzgruppe wieder abgespalten [Kearney et al., 1998] und der polymergebundene Thioharnstoff **P14** durch Zugabe von Methyljodid S-methyliert (**P15**). Die Acylierung mit Chlorameisensäureethylester in Gegenwart von zwei Äquivalenten Triethylamin verläuft nach der Methode von LIN und GANESAN [Lin und Ganesan, 1998] und liefert den *N*-Ethoxycarbonyl-substituierten S-Methylisothioharnstoff **P16** (Formelschema 3-22).



Formelschema 3-22

Schneller gelangt man zum polymergebundenen S-Methyl-*N*-propylisothioharnstoff **P18**. Käufliches Propylisothiocyanat wird mit **P12** in Methylenchlorid umgesetzt (**P17**). Der Thioharnstoff **P17** wird ebenfalls mit Methyljodid behandelt, und man gelangt zum S-Methylisothioharnstoff **P18** [Li et al., 2001] (Formelschema 3-22). Auf die Abspaltung der Zwischenstufen vom Polymer wurde hier verzichtet, da es sich bei allen Umsetzungen um literaturbekannte Synthesen handelt.

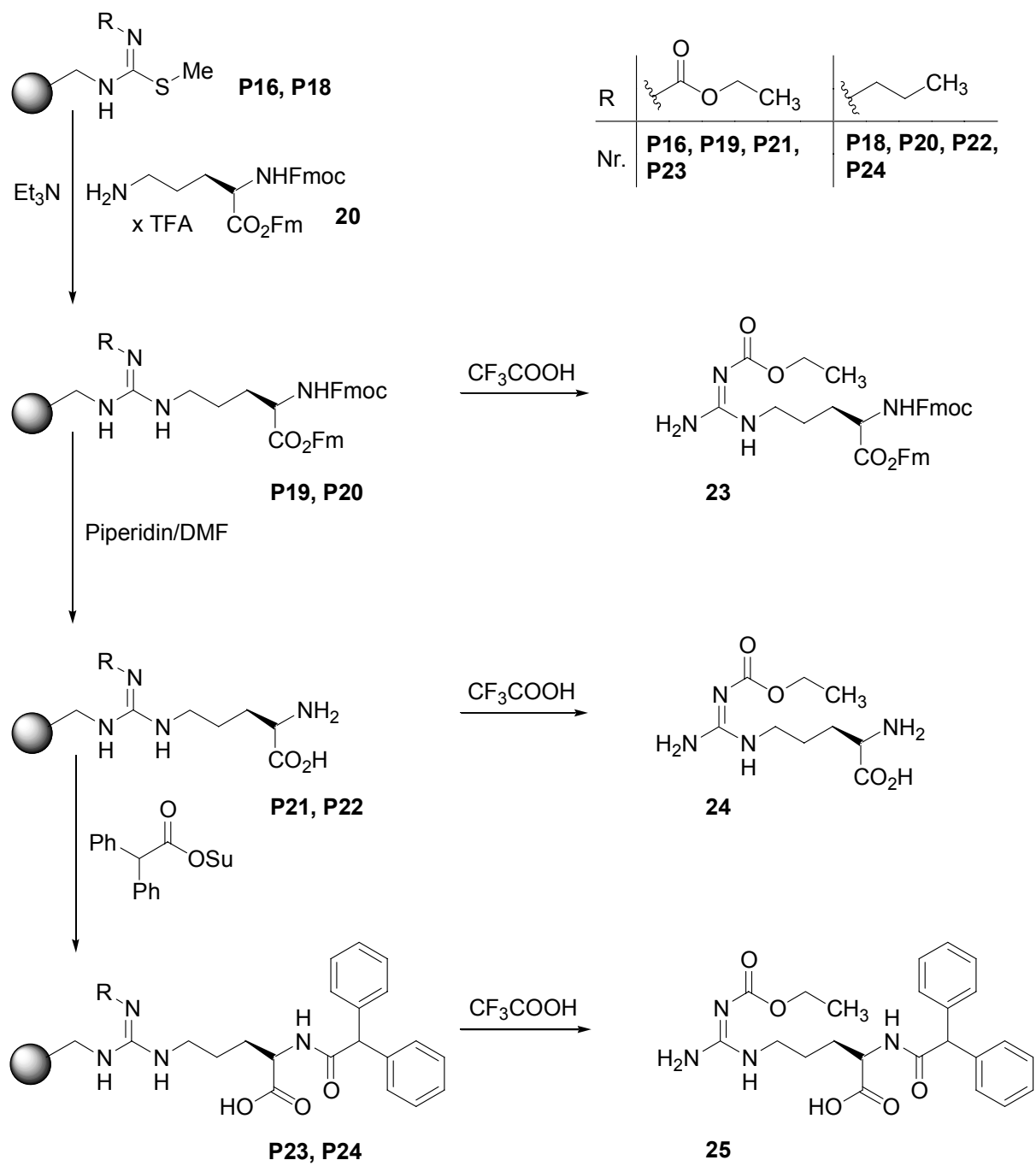
3.2.5 Synthese der N^G -alkyl- bzw. N^G -estersubstituierten Argininamide **26** und **27**

Die nachfolgende Synthesesequenz wurde mit den Harzen **P16** und **P18** durchgeführt. Zur Kontrolle des Reaktionsverlaufs wurden exemplarisch die Zwischenprodukte **23-25** aus den Verbindungen **P19**, **P21** und **P23** abgespalten und charakterisiert (Formelschema 3-23).

Die polymergebundenen S-Methylisothioharnstoffe **P16** und **P18** werden in Acetonitril mit dem fünffachen molaren Überschuss an (*R*)- N^α -Fmoc-ornithin-(9-fluorenylmethyl)ester (**20**) (eingesetzt als Trifluoracetat) und Triethylamin (sechsfacher Überschuss) geschüttelt. Die Aminolyse der jeweiligen S-Methylisothioharnstoffe zu den polymeren Produkten **P19** und **P20** wurde bei 40 °C über 24 Stunden durchgeführt. Nach den üblichen Reinigungsschritten kann das zweifach geschützte Argininderivat **23** mit Trifluoressigsäure nach der Methode von LIN und GANESAN [Lin und Ganesan, 1998] vom Harz **P19** abgespalten werden.

Im nächsten Schritt werden beide Schutzgruppen von **P19** und **P20** entfernt. Die Umsetzung mit Piperidin in DMF ergibt die N^α -ungeschützten Verbindungen **P21** und **P22**. **P21** liefert nach Abspaltung und Reinigung (*R*)- N^G -Ethoxycarbonylarginin (**24**) in sehr guter Ausbeute.

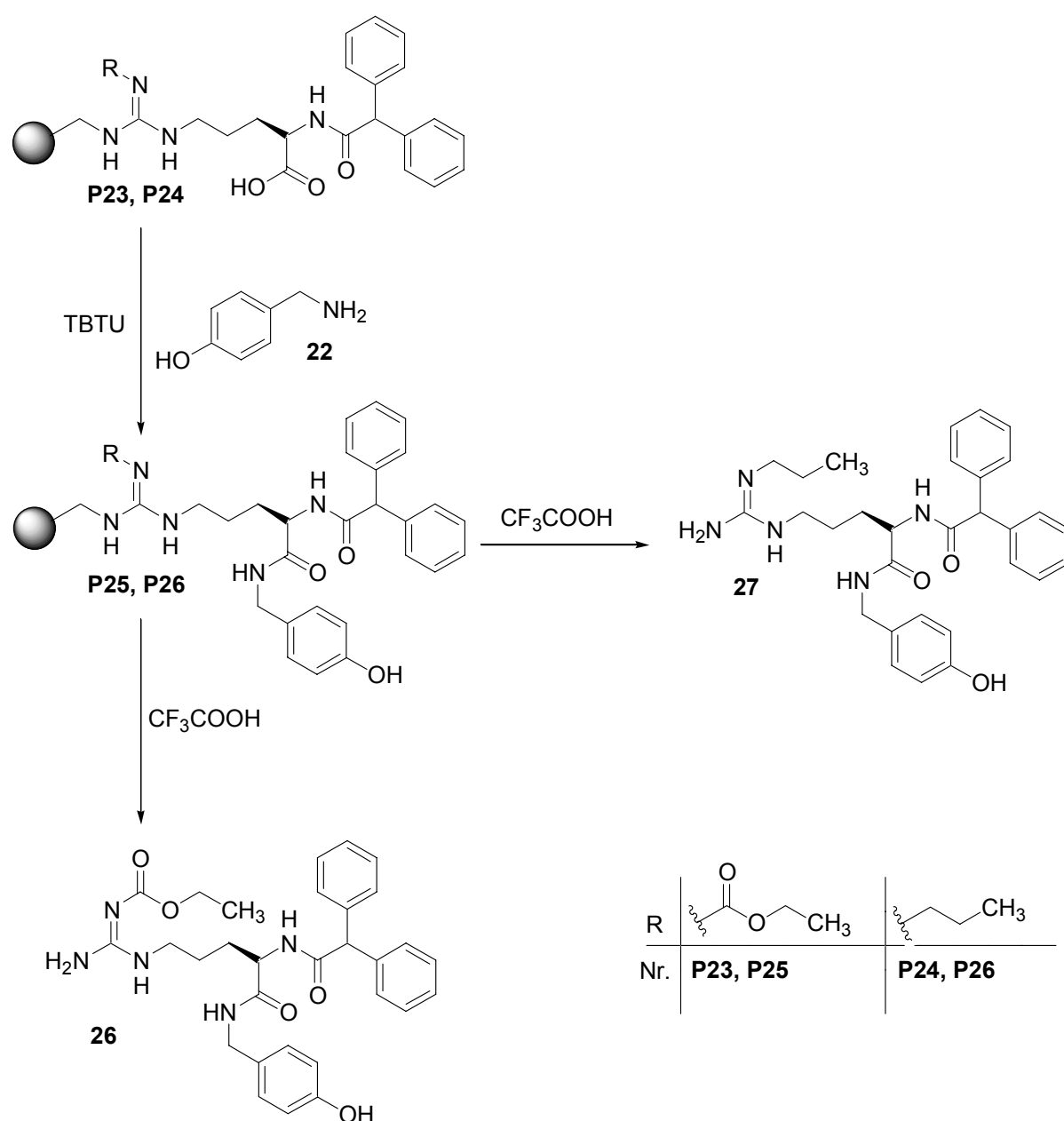
Mit Diphenylessigsäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-ylester (**8**) kann nun in Analogie zu den Synthesen am Merrifield-Harz (vgl. Kapitel 3.1.3.3, Formelschema 3-16) die α -Aminogruppe acyliert werden. Dazu wird **8**, gelöst in DMF, in fünffachem Überschuss zu **P21** und **P22** gegeben, anschließend wird 48 Stunden bei 40 °C geschüttelt. Man erhält **P23** und **P24**. Exemplarisch wurde **P23** mit Trifluoressigsäure versetzt. Auf diese Weise konnte (*R*)- N^α -Diphenylacetyl- N^G -ethoxycarbonylarginin (**25**) in befriedigender Ausbeute erhalten werden (Formelschema 3-23).



Formelschema 3-23

Mit Hilfe von TBTU als Kupplungsreagenz werden im nächsten Schritt **P23** und **P24** mit 4-Hydroxybenzylamin (**22**) zu **P25** und **P26** amidiert (Formelschema 3-24). Die beiden Reaktanden werden im fünffachen Überschuss zugegeben, wobei sich der hohe Überschuss der Aminkomponente diesmal, im Gegensatz zu Amidierung am Merrifield-Harz (vgl. Kapitel 3.1.3.3, Formelschema 3-16) nicht als Nachteil erweist. So konnte beispielsweise eine Aminolyse der Estergruppe von **P25** nicht nachgewiesen werden.

Mit Trifluoressigsäure werden die gewünschten Produkte **26** und **27** vom Polymer abgespalten. Nach chromatographischer Reinigung erhält man **26** mit 18 %iger und **27** sogar mit 37 %iger Ausbeute bezogen auf das ursprünglich eingesetzte Rink-Amid Harz (Formelschema 3-24).



Formelschema 3-24

Die höhere Ausbeute an Verbindung **27** im Vergleich zu **26** dürfte auf den abweichenden Syntheseweg zurückzuführen sein. Um zum N^G -estersubstituierten Argininamid **26** zu gelangen, musste das Harz **P15** mit Chlorameisensäureethylester acyliert werden (Formelschema 3-22). Es könnte sein, dass die dabei freiwerdende Salzsäure nicht schnell genug von der Hilfsbase (Triethylamin) neutralisiert werden kann, so dass es zu einer teilweisen Abspaltung vom Harz auf dieser Stufe kommt. Da zur Synthese der Verbindung **27** kein Chlorameisensäureethylester benötigt wird, könnte hier der Grund für die stark voneinander abweichenden Ausbeuten liegen.

Allerdings stellt die Ausbeute von 18 % bei der Synthese von **26** immerhin eine Verbesserung um den Faktor 4 verglichen mit der Synthese am Merrifield-Harz (vgl. Kapitel 3.1.3.3, Formelschema 3-16) dar. Eine weitere Steigerung der Ausbeute ist denkbar, wenn man Umsetzungen wie die von **P15** mit Chlorameisensäureethylester vermeidet.

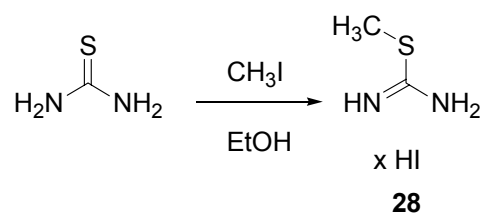
3.3 Synthese von argininhaltigen Peptiden und Argininamiden am Wang-Harz

Um die Umsetzung des polymergebundenen S-Methylisothioharnstoffs mit Chlorameisensäureester oder Säurechloriden zu *N*-Alkoxycarbonyl- bzw. *N*-Acetyl-S-methylisothioharnstoffen zu umgehen, bietet es sich an, die entsprechend substituierten S-Methylisothioharnstoffe in Lösung zu synthetisieren und erst anschließend mit einem geeigneten Harz zu verknüpfen. Geeignete polymere Träger dafür sind Wang-Harze mit aktivierten Estergruppen (Imidazol-, Succinimidyl- oder 4-Nitrophenyl Wang-Harze). Für die nachfolgenden Synthesen am polymeren Träger wurde das 4-Nitrophenylcarbonat Wang-Harz verwendet.

3.3.1 Synthese der substituierten S-Methylisothioharnstoffe

3.3.1.1 Herstellung von S-Methylisothiuroniumiodid (**28**)

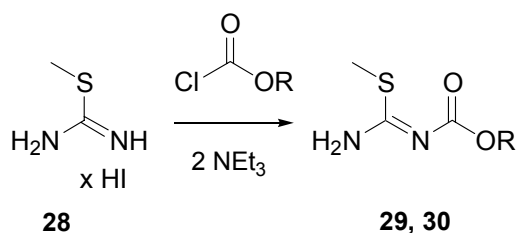
Die Ausgangsverbindung für fast alle im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Guanylierungsreagenzien stellt S-Methylisothioharnstoff (**28**) dar. Thioharnstoff wird mit Methyljodid in Ethanol im Sinne einer S_N2-Reaktion in den S-Methylisothioharnstoffhydroiodid (**28**) überführt (Formelschema 3-25).



Formelschema 3-25

3.3.1.2 Synthese der S-Methylisothioharnstoff-N-carbonsäureester 29 und 30

Aus S-Methylisothiuroniumiodid (**28** • HI) wird in situ mit Triethylamin die Base freigesetzt, und anschließend wird mit einem Äquivalent Chlorameisensäureester unter Verbrauch eines weiteren Äquivalents an Triethylamin acyliert [Lin, 1975]. Nach dieser Methode werden die N-acylierten S-Methylisothioharnstoffe **29** und **30** hergestellt (Formelschema 3-26).

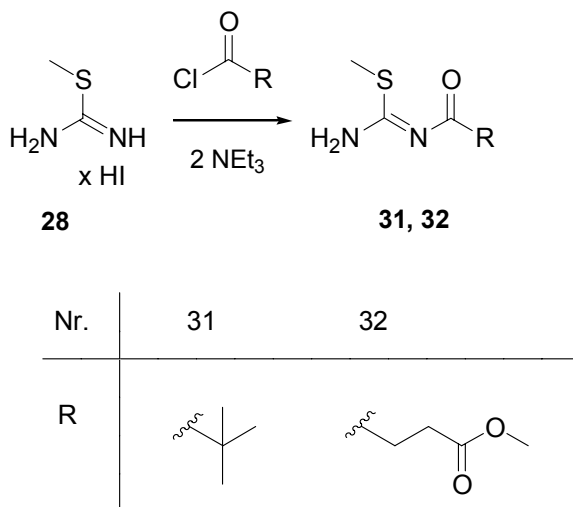


Nr.	29	30
R	Me	Bn

Formelschema 3-26

3.3.1.3 Synthese der N-Acyl-S-methylisothioharnstoffe 31 und 32

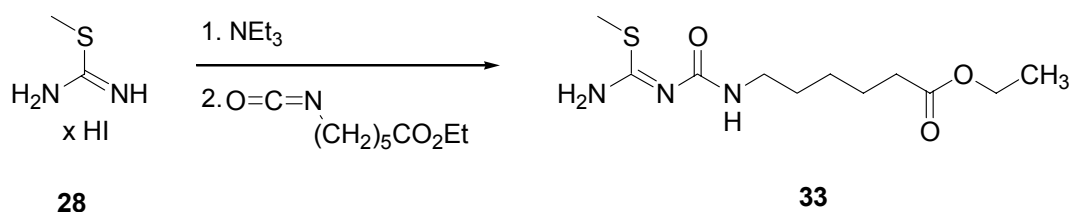
Die käuflichen Edukte 2,2-Dimethylpropionsäurechlorid (Pivalinsäurechlorid) und Bernsteinsäuremethylesterchlorid werden analog 3.3.1.2 mit S-Methylisothioharnstoff **28** und Triethylamin umgesetzt (Formelschema 3-27)



Formelschema 3-27

3.3.1.4 Herstellung des aminocarbonylsubstituierten S-Methylisothioharnstoffs 33

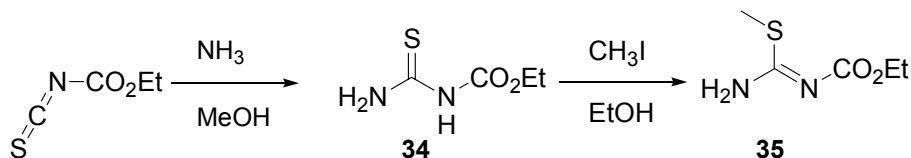
Zur Herstellung des carbamoylsubstituierten S-Methylisothioharnstoffs **33** wird analog zur Darstellung der N-Alkoxycarbonyl-S-methylisothioharnstoffe **29** und **30** aus **28** • HI mit Triethylamin die Base in situ freigesetzt, anschließend wird mit käuflichem 6-Isocyanatohexansäureethylester acyliert (Formelschema 3-28). Die Verbindung **33** wird durch Säulenchromatographie gereinigt.



Formelschema 3-28

3.3.1.5 Synthese von N-Ethoxycarbonyl-S-methylisothioharnstoff (35)

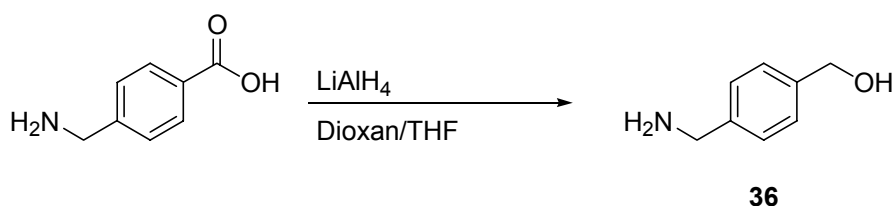
Zur Darstellung von N-Ethoxycarbonyl-S-methylisothioharnstoff (**35**) wird aus Ethoxycarbonylisothiocyanat mit Ammoniak in methanolischer Lösung der entsprechende Thioharnstoff **34** hergestellt, welcher durch Umsetzung mit Iodmethan in Ethanol in N-Ethoxycarbonyl-S-methylisothioharnstoff **35** überführt wird [Kempter et al., 1979] (Formelschema 3-29).



Formelschema 3-29

3.3.2 Synthese von 4-Aminomethylbenzylalkohol (**36**)

Als zusätzliches Amidierungsreagenz wurde 4-Aminomethylbenzylalkohol (**36**) hergestellt. Damit sollten weitere Strukturvariationen am C-Terminus der synthetisierten Argininamide durchgeführt werden. Dazu wird Aminomethylbenzoesäure in einer THF/Dioxan-Mischung mit Lithiumaluminiumhydrid reduziert. Nach wässriger Aufarbeitung wird das Rohprodukt anschließend säulenchromatographisch gereinigt [Yu and Taylor, 1999] (Formelschema 3-30).

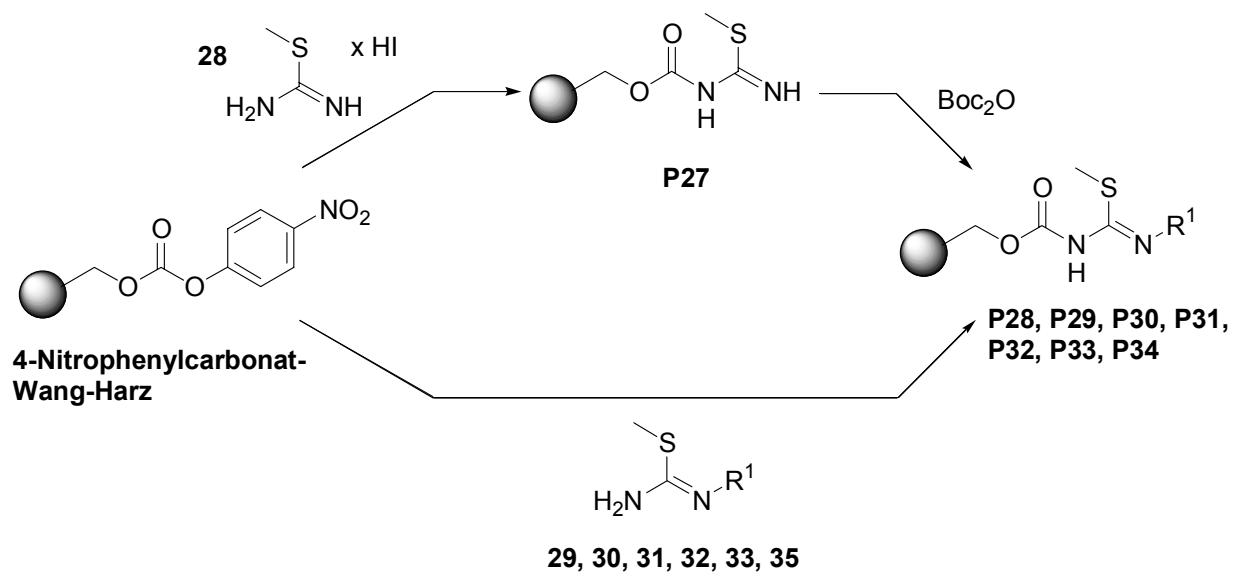


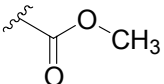
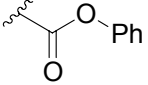
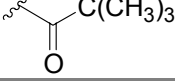
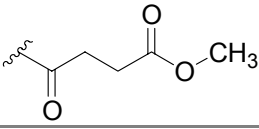
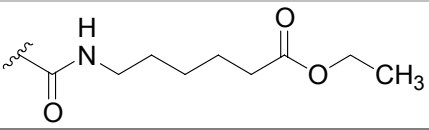
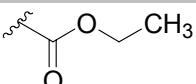
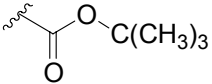
Formelschema 3-30

3.3.3 Darstellung der argininhaltigen Peptide und Argininamide

3.3.3.1 Synthese von polymergebundenen substituierten S-Methylisothioharnstoffen am Wang-Harz

Die Syntheseroute zur Darstellung der Isothioharnstoffe wird je nach Zielmolekül variiert. Zur Herstellung der monosubstituierten Argininamide und der Tri- und Pentapeptide wurde das 4-Nitrophenylcarbonyl Wang-Harz zunächst mit S-Methylisothioharnstoff (**28** • HI) und Triethylamin behandelt. Anschließend erfolgt die Umsetzung mit Boc_2O zum Boc-geschützten S-Methylisothioharnstoff. Zur Synthese der disubstituierten Argininamide wurde das Wang-Harz mit den entsprechenden substituierten S-Methylisothioharnstoffen **29-33**, **35** (vgl. 3.3.1) umgesetzt (Formelschema 3-31).

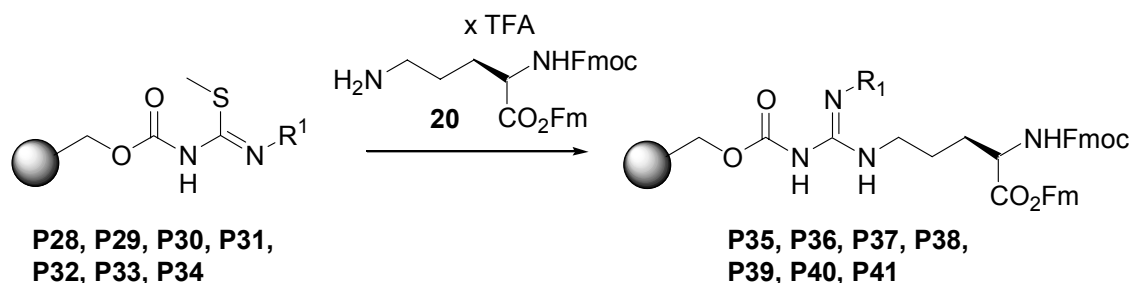


Nr.	R ¹
29, P28	
30, P29	
31, P30	
32, P31	
33, P32	
35, P33	
P34	

Formelschema 3-31

3.3.3.2 Umsetzung der polymergebundenen S-Methylisothioharnstoffe P28-P34 mit dem Ornithinlinker 20

Die polymergebundenen zweifach-geschützten N^G -substituierten Arginine **P35-P41** werden durch Aminolyse der jeweiligen S-Methylisothioharnstoffe **P28-P34** bei 40 °C in Acetonitril erhalten (Formelschema 3-32). Nach 24 Stunden ist die Umsetzung beendet. Wie bei der von HUTZLER beschriebenen Synthese von N^G -substituierten Argininamiden in Lösung können auch hier neben den gewünschten Guanidinen Harnstoffe entstehen [Hutzler, 2001]. Bei der Synthese am polymeren Träger werden diese Nebenprodukte allerdings sofort abgespalten und können durch die üblichen Waschschritte entfernt werden. Exemplarisch wurde hier die Verbindung **23** von **P40** abgespalten und charakterisiert (vgl. Formelschema 3-23).

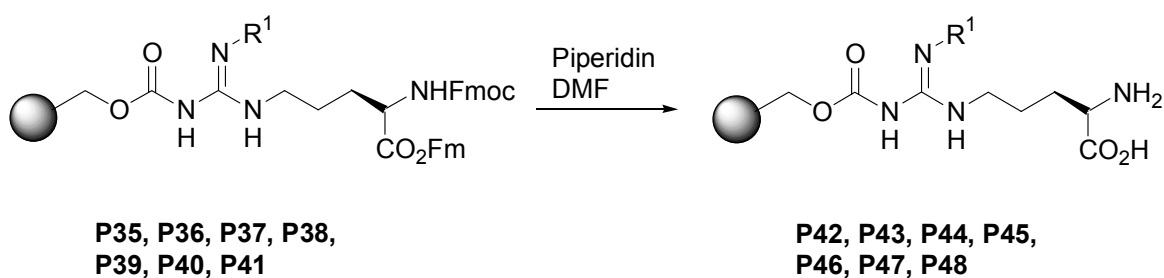


Nr.	R ¹
P28, P35	
P29, P36	
P30, P37	
P31, P38	
P32, P39	
P33, P40	
P34, P41	

Formelschema 3-32

3.3.3.3 Abspaltung der Fmoc/Fm-Schutzgruppen von den Polymeren P35-P41

Zur Acylierung bzw. Amidierung der polymergebundenen N^G -substituierten Arginine an der α -Aminofunktion bzw. der α -Carboxylfunktion ist es notwendig, die zuvor an diesen Positionen eingeführten Fmoc- und Fm-Schutzgruppen von **P35-P41** wieder abzuspalten. Die Abspaltung beider Schutzgruppen gelingt mit einer Lösung von Piperidin in DMF. Nach einer Reaktionszeit von 12 Stunden sind beide Schutzgruppen vollständig entfernt (Formelschema 3-33). Exemplarisch wurde hier die Verbindung **24** von **P47** abgespalten und charakterisiert (vgl. Formelschema 3-23).



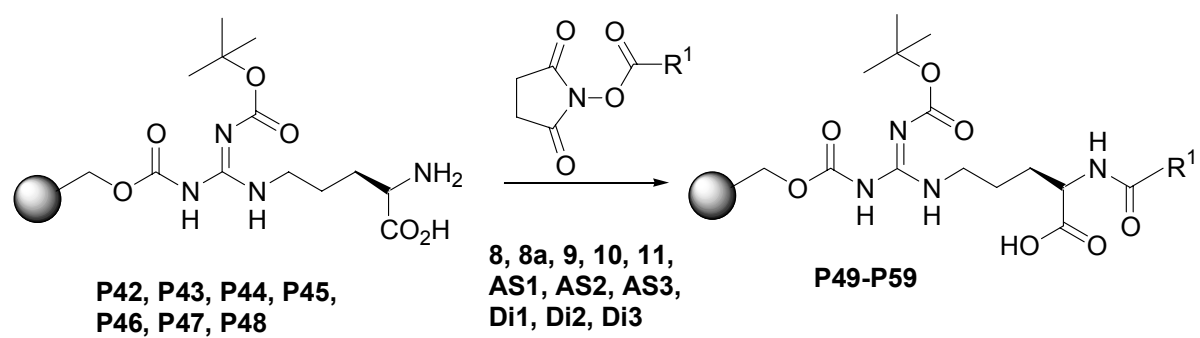
Nr.	R ¹
P35, P42	
P36, P43	
P37, P44	
P38, P45	
P39, P46	
P40, P47	
P41, P48	

Formelschema 3-33

3.3.3.4 N^α -Acylierung der polymergebundenen Argininderivate

Zur N^α -Acylierung der polymergebundenen Argininderivate **P42-P48** werden die zuvor synthetisierten *N*-Hydroxysuccinimidester **8-11** oder käufliche Aminosäuren und Dipeptide (als Hydroxysuccinimidester aktiviert) verwendet. Für diesen Syntheseschritt ist die Umsetzung mit reaktiven Carbonsäurederivaten notwendig. Eine Aktivierung in situ mit TBTU, HBTU oder anderen Aktivierungsmitteln würde zu viele Nebenreaktionen, wie beispielsweise Umsetzungen an der Carboxylgruppe des Arginins, verursachen.

Die aktivierten Ester **8-11** und die aktivierten Aminosäuren und Dipeptide reagieren mit den α -Aminogruppen von **P42-P48** in absolutem DMF bei 40 °C innerhalb von 48 Stunden zu den gewünschten Argininderivaten **P49-P59** (Formelschema 3-34) und **P60-P71** (Formelschema 3-35). Exemplarisch wurde hier die Verbindung **25** von **P61** abgespalten und charakterisiert (vgl. Formelschema 3-23).

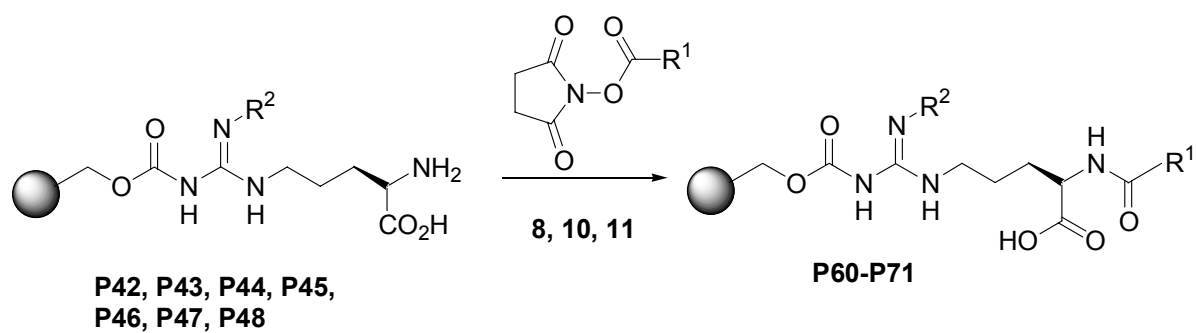


Nr.	R ¹
8,P49	
8a,P50	
9,P51	
10,P52	

Nr.	R ¹
AS1,P53	
AS2,P54	
AS3,P55	

Nr.	R ¹
Di1,P56	
Di2,P57	
Di3,P58	
Di4,P59	

Formelschema 3-34

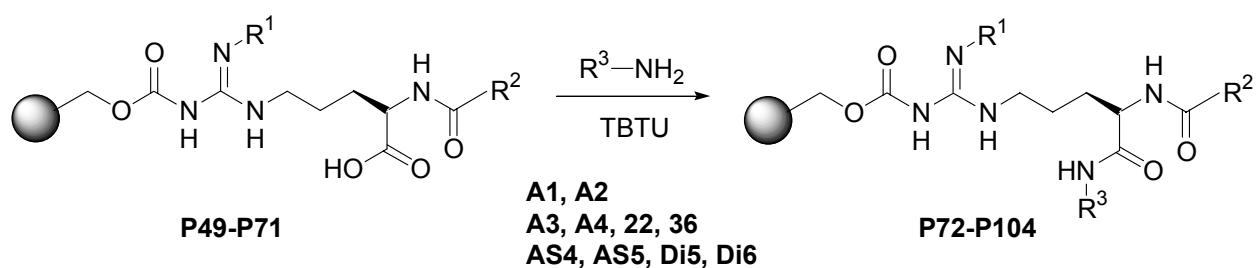


Nr.	R ²	R ¹
P60	-CO ₂ -CH ₂ CH ₃	
P61	-CO ₂ -CH ₃	
P62	-CO ₂ -CH ₂ Ph	
P63	-CO ₂ -NH-(CH ₂) ₅ -CO ₂ -CH ₂ CH ₃	
P64	-CO ₂ -CH ₃	
P65	-CO ₂ -CH ₂ CH ₃	
P66	-CO ₂ -CH ₂ Ph	
P67	-CO-C(CH ₃) ₃	
P68	-CO-C(CH ₃) ₃	
P69	-CO ₂ -CH ₂ Ph	
P70	-CO ₂ -CH ₃	
P71	-CO ₂ -CH ₂ CH ₃	

Formelschema 3-35

3.3.3.5 Amidierung der polymergebundenen Argininderivate

Zur Amidierung der polymergebundenen Argininderivate **P49-P71** wurden das Kupplungsreagenz TBTU (2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat), die Amine **A1-A4**, **22**, **36**, die Aminosäuren **AS4**, **AS5** und die Dipeptide **Di5**, **Di6** verwendet (Formelschema 3-34 und 3-35). Die Umsetzung findet bei Raumtemperatur in DMF statt. Nach 24 Stunden ist die Amidierung beendet. Exemplarisch wurde die Verbindung **26** von **P91** abgespalten und charakterisiert (vgl. Formelschema 3-23).

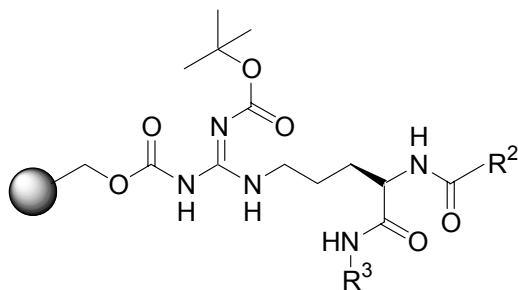


Nr.	R ³
A1	
A2	
A3	
22	
36	
A4	

Nr.	R ³
AS4	
AS5	
Di5	
Di6	

Formelschema 3-36

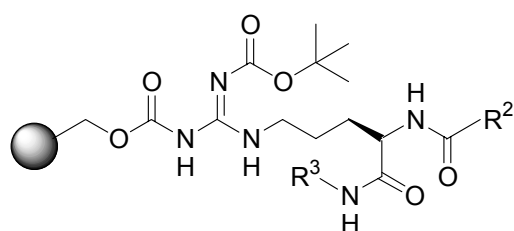
Tabelle 3-1 zu **Formelschema 3-36**: Polymergebundene *N*^G-*tert*-Butoxycarbonylargininamide



Nr.	R ²	R ³
P72		
P73		
P74		
P75		

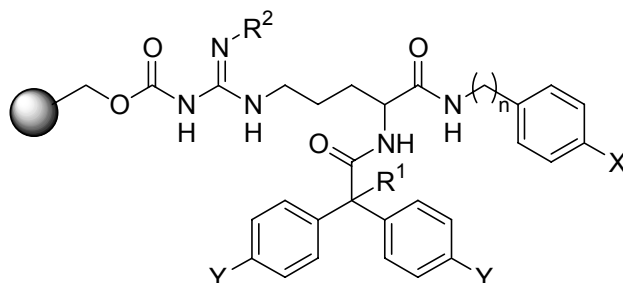
Nr.	R ²	R ³
P76		
P77		
P78		

Tabelle 3-2 zu Formelschema 3-36: Polymergebundene Tri- und Pentapeptide



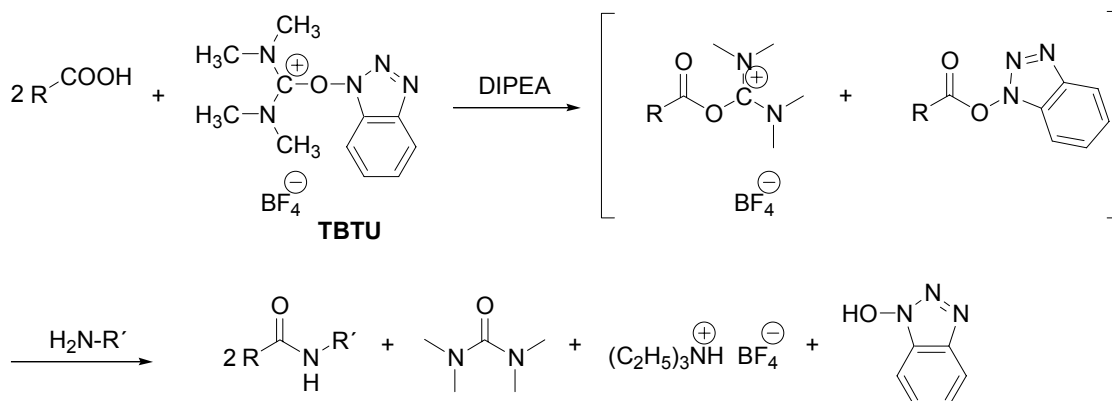
Nr.	R ²	R ³	Nr.	R ²	R ³
P79			P85		
P80			P86		
P81			P87		
P82			P88		
P83			P89		
P84			P90		

Tabelle 3-3 zu Formelschema 3-36: Polymergebundene N^G -substituierte Argininamide



Nr.	Y	X	n	R ¹	R ²
P91	H	-OH	1	H	-CO-OCH ₂ CH ₃
P92		H			-CO-NH-(CH ₂) ₅ -CO ₂ CH ₂ CH ₃
P93		-CH ₂ OH		-CH ₃	-CO-C(CH ₃) ₃
P94	Cl			H	-CO-OCH ₂ CH ₃
P95	H		2	-CH ₃	-CO-OCH ₂ Ph
P96					-CO-OCH ₃
P97					-CO-OCH ₂ CH ₃
P98	H		1	H	-CO-OCH ₃
P99					-CO-OCH ₂ CH ₃
P100					-CO-OCH ₂ Ph
P101	Cl	-CH ₂ OH	1	H	-CO-OCH ₃
P102					-CO-OCH ₂ CH ₃
P103					-CO-OCH ₂ Ph
P104					-CO-C(CH ₃) ₃

TBTU hat sich in der Festphasenchemie als ausgezeichnetes Aktivierungsreagenz, das die Racemisierung während der Säureamidbildung reduziert, bewährt [Knorr et al., 1989]. Die Amidierung unter Verwendung von TBTU in Gegenwart der tertiären Base NEt₃ erfolgt gemäß dem im Formelschema 3-37 dargestellten Mechanismus [Dourtoglou et al., 1984].

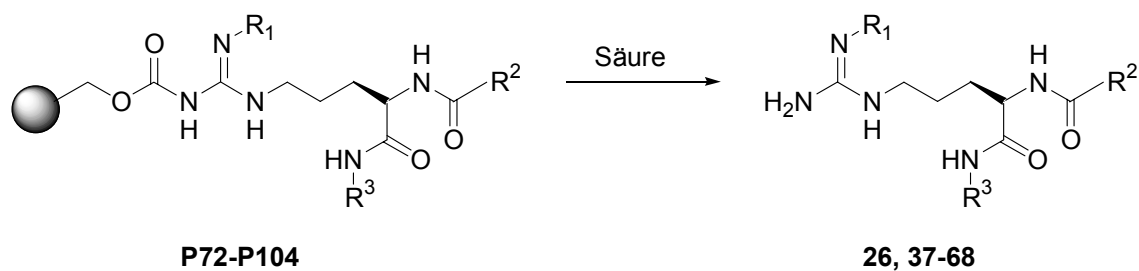


Formelschema 3-37

Als Zwischenstufen werden hierbei die aktiven Ester des Hydroxybenzotriazols und des Tetramethylisothioharnstoffs gebildet.

3.3.3.6 Abspaltung der Argininderivate 26, 37-68 vom Polymer

Die Abspaltung der Zielverbindungen gelingt durch Behandlung der polymergebundenen Substanzen **P72-P104** mit Säure (Formelschema 3-38). Um zu überprüfen, ob die Art der verwendeten Säure Einfluss auf die Ausbeuten hat, wurden die Argininderivate mit unterschiedlichen Säuren bei Raumtemperatur von den Harzen abgespalten. Reaktionszeiten von 16-24 Stunden erwiesen sich als optimal. Kürzere Reaktionszeiten führen aufgrund unvollständiger Abspaltung zu Ausbeuteverlusten, längere Reaktionszeiten bewirken keine Ausbeutesteigerung.



Formelschema 3-38

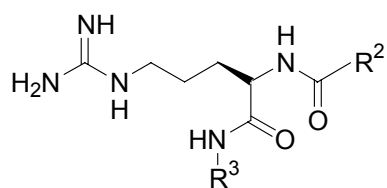
Als Säuren wurden Essigsäure (konz), 10 % HBr in Essigsäure, 7N Salzsäure in Methanol und 95 %ige Trifluoressigsäure verwendet. Zum Vergleich sind im nachfolgenden für einige Argininderivate die Abspaltbedingungen und die Ausbeuten aufgeführt. Je nach verwendeter Säure liegen die Produkte als Acetate, Hydrobromide, Hydrochloride oder Trifluoracetate vor.

Tabelle 3-4: Vergleich von Ausbeute (bezogen auf die Beladung des eingesetzten Harzes) und Bedingung für die Abspaltung der Argininderivate

Nr.	verwendete Säure	Ausbeute [%]	Nr.	verwendete Säure	Ausbeute [%]
43	CH ₃ CO ₂ H	19	41	7N HCl in MeOH	32
45		14	42		34
63		23	44		41
38	10% HBr/CH ₃ CO ₂ H	17	40	95% CF ₃ CO ₂ H	38
48		18	46		33
55		12	64		36

Aufgrund der wesentlich höheren Ausbeuten bei der Abspaltung mit Trifluoressigsäure und Salzsäure (ca. Faktor 2) wurden diese Säuren bevorzugt verwendet.

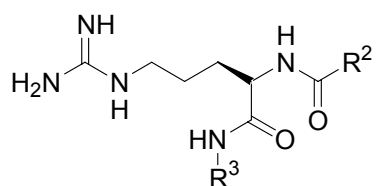
Tabelle 3-5 zu Formelschema 3-38: *N*^G-Unsubstituierte Argininamide



Nr.	R ²	R ³
37		
38		
39		
40		

Nr.	R ²	R ³
41		
42		
43		

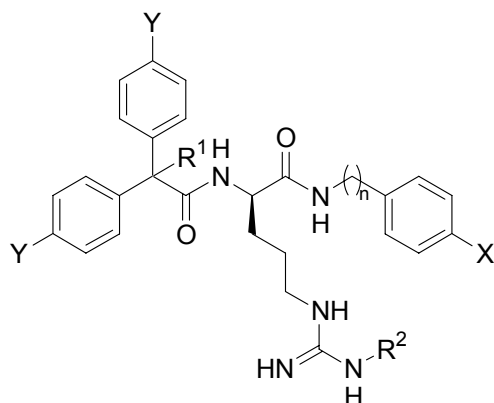
Tabelle 3-6 zu Formelschema 3-38: Argininhaltige Tri- und Pentapeptide



Nr.	R ²	R ³
44		
45		
46		
47		
48		
49		

Nr.	R ²	R ³
50		
51		
52		
53		
54		
55		

Tabelle 3-7 zu Formelschema 3-38: N^G -Akzeptorsubstituierte Argininamide



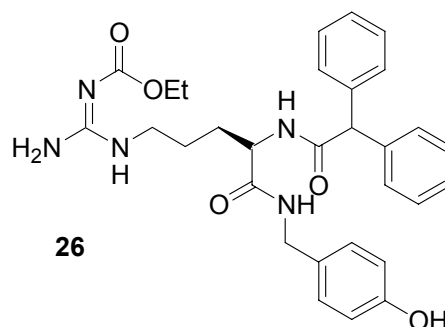
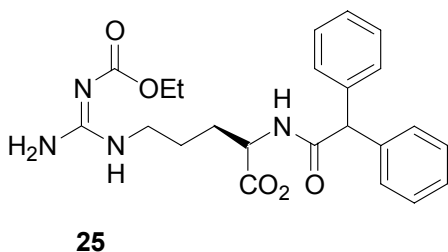
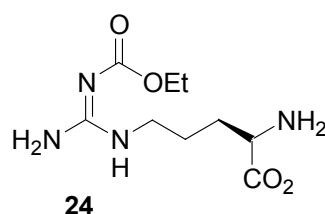
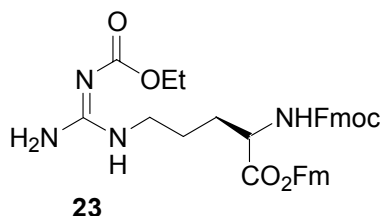
Nr.	Y	X	n	R ¹	R ²
26	H	-OH	1	H	-CO-OCH ₂ CH ₃
56		H			-CO-NH-(CH ₂) ₅ -CO ₂ CH ₂ CH ₃
57		-CH ₂ OH		-CH ₃	-CO-C(CH ₃) ₃
58	Cl			H	-CO-OCH ₂ CH ₃
59	H		2	-CH ₃	-CO-OCH ₂ Ph
60					-CO-OCH ₃
61					-CO-OCH ₂ CH ₃
62		H	1	H	-CO-OCH ₃
63					-CO-OCH ₂ CH ₃
64					-CO-OCH ₂ Ph
65	Cl	-CH ₂ OH	1	H	-CO-OCH ₃
66					-CO-OCH ₂ CH ₃
67					-CO-OCH ₂ Ph
68					-CO-C(CH ₃) ₃

3.3.4 Vergleich der Ausbeuten an abgespaltenen Zwischenprodukten

Um den Reaktionsverlauf besser verfolgen und die Intermediate exemplarisch charakterisieren zu können, wurden vom Rink Amid- bzw. Wang-Harz Vorstufen der Verbindung **26** abgespalten (Tabelle 3-8). Das Argininamid **26** wurde an beiden Harzen synthetisiert, um die Ausbeuten der einzelnen Syntheseschritte am Rink-Amid bzw. Wang-Harz vergleichen zu können. Die Ausbeuteunterschiede sind somit nur in der Reaktionsführung am Harz selbst begründet. Etwaige stereochemische Einflüsse, die bei unterschiedlichen Vergleichsverbindungen auftreten könnten, spielen hier keine Rolle.

Tabelle 3-8: Überblick über die Ausbeuten (bezogen auf die Beladung des eingesetzten Harzes) an abgespaltenen Zwischenprodukten

Nr.	Rink-Amid-Harz	Wang-Harz	Ausbeute (Rink-Amid-Harz)	Ausbeute (Wang-Harz)
23	P19	P40	73%	84%
24	P21	P47	72%	81%
25	P23	P62	43%	52%
26	P24	P91	18%	31%

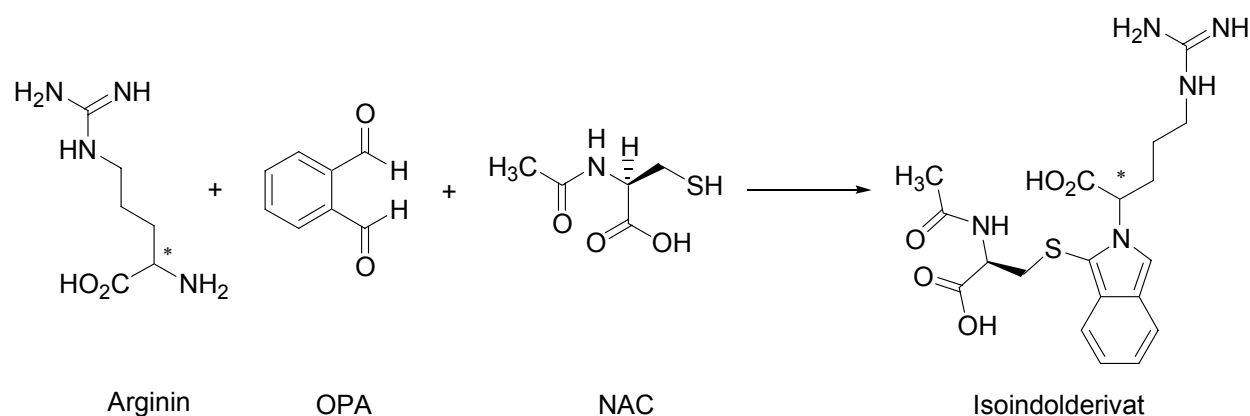


Leider konnte bei den Reaktionen an den polymeren Trägern die Z-Schutzgruppe nicht eingesetzt werden. Die hier verwendeten Glasfritten sind für Reaktionen unter Wasserstoffatmosphäre (zur hydrogenolytischen Abspaltung der Schutzgruppe) nicht geeignet. Bei Verwendung der Z-Schutzgruppe hätte man keine völlig ungeschützten polymergebundene Argininderivate **P42-P48** mit aktivierten Säuren acylieren müssen, so dass wahrscheinlich wesentlich höhere Ausbeuten zu erreichen gewesen wären.

Die Ausbeuten der vom Wang-Harz abgespaltenen Verbindungen liegen durchschnittlich um 10 % höher als die der Rink Amid-Harz-Verbindungen. Hier hat offenbar die Tatsache, dass keine Säurechloride bzw. Chlorameisensäureester am Wang-Harz direkt einwirken, einen positiven Einfluss auf die Ausbeute. Somit ist die Syntheseroute über das Wang-Harz nicht nur kürzer, sondern auch chemisch effizienter.

3.3.5 HPLC-Untersuchung der Argininamide

Da die Konfiguration der Argininamide von entscheidender Bedeutung für ihre Y₁-antagonistische Wirkung ist [Rudolf et al., 1994], wurde untersucht, ob es im Verlauf der Synthese zur Racemisierung des Argininbausteins gekommen war. Dies lässt sich nach Derivatisierung der N^α-unsubstituierten Aminosäuren mit o-Phthaldialdehyd (OPA) und dem chiralen *N*-Acetyl-(*L*)-cystein (NAC) durch Reversed-Phase HPLC analog dem von SCHUSTER für Amine etablierten Verfahren überprüfen [Schuster, 1998]. Durch saure Hydrolyse mit 0.1 M Salzsäure wurde aus den Argininamiden zunächst die Aminosäure in Freiheit gesetzt. Durch Derivatisierung von Arginin mit OPA und enantiomerenreinem NAC wurden diastereomere Isoindolderivate gebildet (vgl. Experimenteller Teil), die an achiralen stationären Phasen getrennt werden können (Formelschema 3-39).



Formelschema 3-39

Da die gebildeten Isoindolderivate sehr stark fluoreszieren, lassen sie sich mit sehr hoher Sensitivität detektieren. Zur Reversed-Phase HPLC-Untersuchung der diastereomeren Reaktionsprodukte wurde analog dem von BRÜCKER beschriebenen Verfahren 40 mM Natriumacetatpuffer pH = 6.5 und Acetonitril als mobile Phase verwendet. Um die Retentionszeit von (*R*)- und (*S*)-Arginin zu ermitteln, wurde zunächst racemisches Arginin vermessen und anschließend mit dem aus (*S*)-Arginin hergestellten Derivat gespiket (siehe Abbildung 3-2).

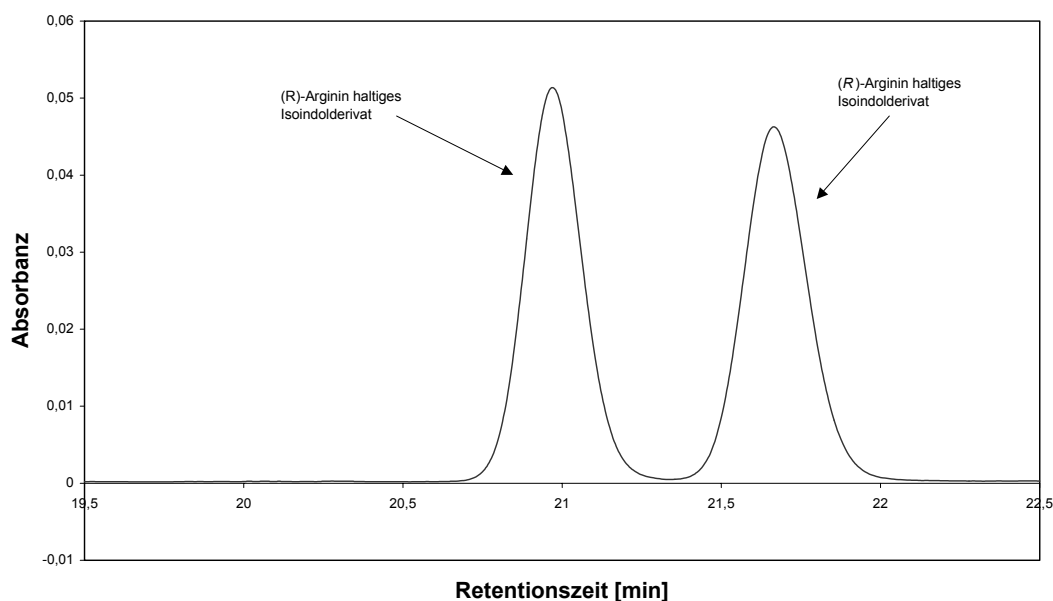


Abbildung 3-2: Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Isoindolderivate von racemischem Arginin gespiket mit dem entsprechenden Derivat des (*S*)-Arginins

Damit konnte gezeigt werden, dass das Derivat des (*S*)-Enantiomers ($t_{R1} = 20.97$ min) vor dem des (*R*)-Enantiomers ($t_{R2} = 21.67$ min) der Aminosäure eluiert wird. Anschließend wurden die exemplarisch ausgewählten Argininamide **38**, **43**, **46**, **50**, **60**, **68** mit HPLC untersucht und durch Spiken mit den aus racemischem Arginin hergestellten diastereomeren Derivaten die Peaks der Aminosäure identifiziert (Abb 3-3 und 3-4). Von jeder Verbindung wurde, bezogen auf (*R*)-Arginin, der Enantiomerenüberschuss % ee mittels HPLC bestimmt (Tabelle 3-9).

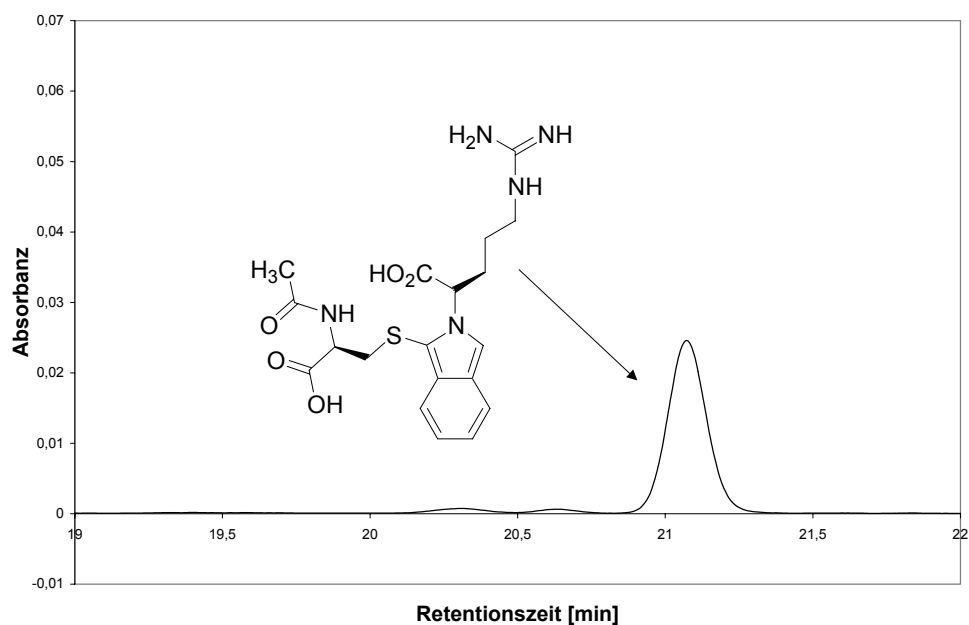


Abbildung 3-3: Ausschnitt aus dem Chromatogramm des aus Argininamid **43** nach Hydrolyse und Derivatisierung mit OPA/NAC erhaltenen Isoindolderivates von (*R*)-Arginin

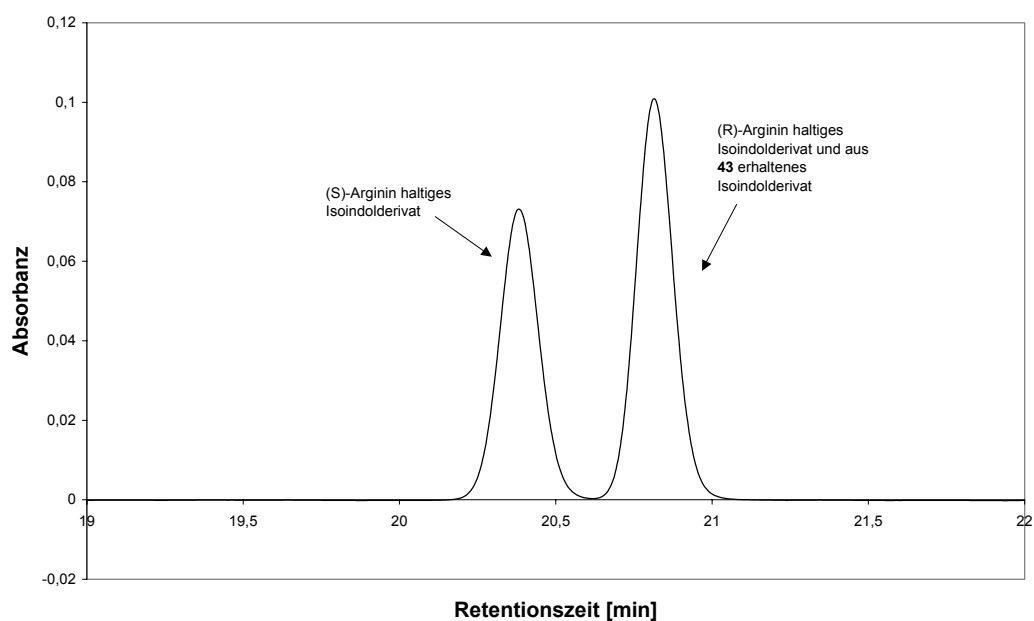


Abbildung 3-4: Ausschnitt aus dem Chromatogramm des aus Argininamid **43** durch Hydrolyse erhaltenen Stereoisomeren, gespiket mit racemischem Arginin (nach Derivatisierung mit OPA/NAC)

Tabelle 3-9: HPLC-Untersuchung der Argininamide **38**, **43**, **46**, **50**, **60**, **68** nach Hydrolyse und Derivatisierung mit OPA/NAC. Die angegebenen Retentionszeiten beziehen sich auf die diastereomeren Argininderivate.

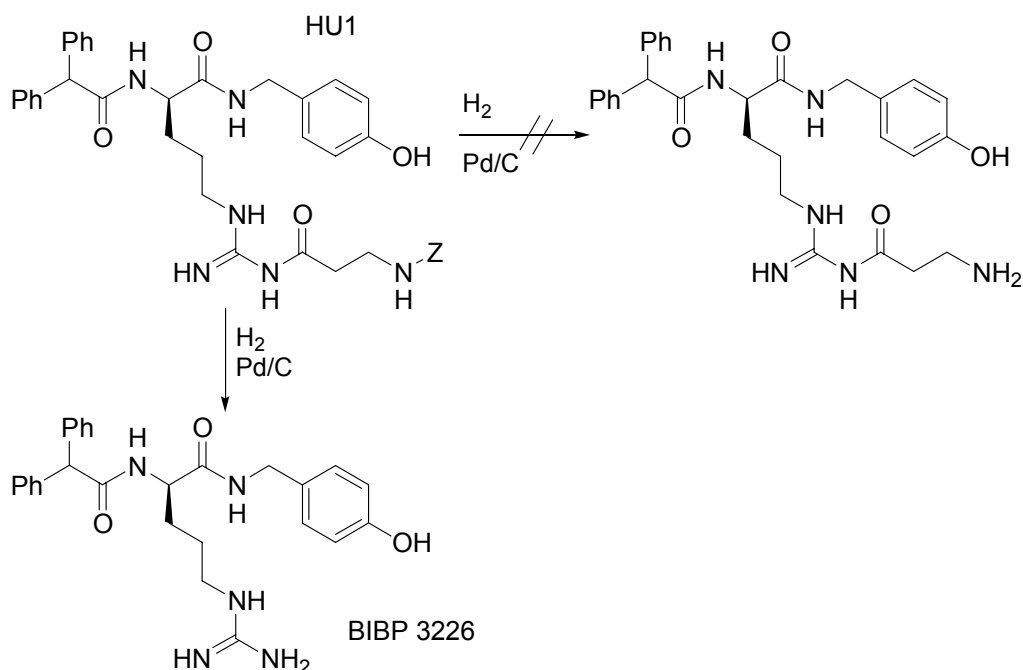
Nr.	t _{R1} [min]	t _{R2} [min]	Enantiomerenüberschuß ee (R) % ^{a)}
R/S-Arg	20.97	21.65	0
38	20.57	21.03	90.44
43	20.65	21.09	94.57
46	20.61	21.11	93.94
50	20.73	21.18	90.86
60	20.66	21.14	93.18
68	20.53	21.00	90.07

a)bezogen auf (R)-Arginin – bestimmt anhand der Peakfläche für die diastereomeren Derivate

Anhand der durchgeführten HPLC-Untersuchungen konnte somit gezeigt werden, dass die untersuchten Argininamide bzw. Peptide **38**, **43**, **46**, **50**, **60**, **68** für das enthaltene Arginin mindestens einen Enantiomerenüberschuss von 90 % aufweisen, während beispielsweise Argininamide, die von UFFRECHT ausgehend von *N*^G-Nitroargininmethylester synthetisiert wurden, nahezu quantitativ racemisiert waren. Vermutlich hat dieser Racemisierungsschritt (bezogen auf die Argininpartialstruktur) bei der basischen Esterhydrolyse stattgefunden [Uffrecht, 1996]. Unter Verwendung von polymeren Trägern zur Darstellung der Argininamide und Peptide ist es somit gelungen, nahezu ausschließlich und damit racemisierungsfrei (bezogen auf die Argininpartialstruktur) die (*R*)-Argininderivate zu erhalten. Vergleichbares gelang AIGLSTORFER durch Verwendung des *N*^α-Boc-*N*^G-nitroarginins zur Darstellung von Argininamiden in Lösung [Aiglstorfer, 1999].

3.4 Untersuchungen zur Darstellung eines Y_1 -Rezeptor-selektiven Radioliganden ausgehend von (*R*)-Argininamiden

Aufgrund der hohen Y_1 -Rezeptor-Affinität der N^G -substituierten Argininamide, die K_i -Werte im niedrigen picomolaren Bereich erreichen, scheint diese Stoffklasse besonders interessant zur Herstellung von Radioliganden. Da es sich gezeigt hat, dass selbst relativ große N^G -Substituenten toleriert werden, ohne dass die Y_1 -antagonistische Aktivität verloren geht, bestand eine Strategie in der Einführung einer Aminoalkanoylgruppe. Die Aminogruppe lässt sich mit käuflichen Markierungsreagenzien wie BOLTON-HUNTER-Reagenz oder 3H -Propionsäurederivaten acylieren. Zum Schutz dieser freien Aminogruppe auf den vorhergehenden Synthesestufen sollte sich die Boc-Schutzgruppe eignen. In vorangegangenen Untersuchungen von HUTZLER [Hutzler, 2001] wurde versucht, die freie Aminogruppe des Spacers mit der Z-Schutzgruppe zu schützen. Die hydrogenolytische Abspaltung der Z-Schutzgruppe von **HU1** gelang jedoch nicht. Die Reaktion lieferte überraschenderweise quantitativ das Argininamid **BIBP 3226** (Formelschema 3-40).



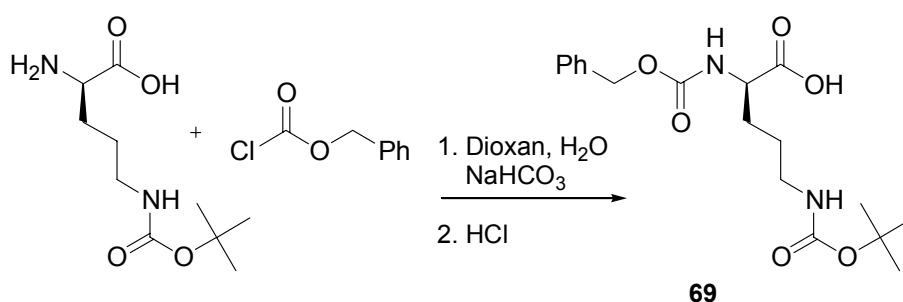
Formelschema 3-40

3.4.1 Synthese von (*R*)-*N*^α-Diphenylacetyl-*N*-[(4-hydroxyphenyl)methyl]ornithinamid

Zur Herstellung substituierter Ornithinamide benötigt man auch hier zwei zueinander orthogonale Schutzgruppen an *N*^α und *N*^δ. Dafür verwendet man zweckmäßigerweise die *tert*-Butoxycarbonylgruppe (Boc), die unter sauren Bedingungen abgespalten wird und gegenüber Basen und Hydrogenolyse stabil ist [Schnabel et al., 1971; Sakai et al., 1992], sowie die Benzyloxycarbonylschutzgruppe (Z), die hydrogenolytisch abgespalten werden kann [Bergmann et al., 1932] und gegenüber Basen und Säuren stabil ist. Die *N*^δ-geschützten Ornithine sind kommerziell verfügbar (Fa. Bachem). Auf den Kauf von *N*^α,*N*^δ-di-geschützten Ornithinen wurde aus Kostengründen verzichtet.

3.4.1.1 Herstellung von (*R*)-*N*^α-Benzyloxycarbonyl-*N*^δ-*tert*-butoxycarbonylornithin (**69**)

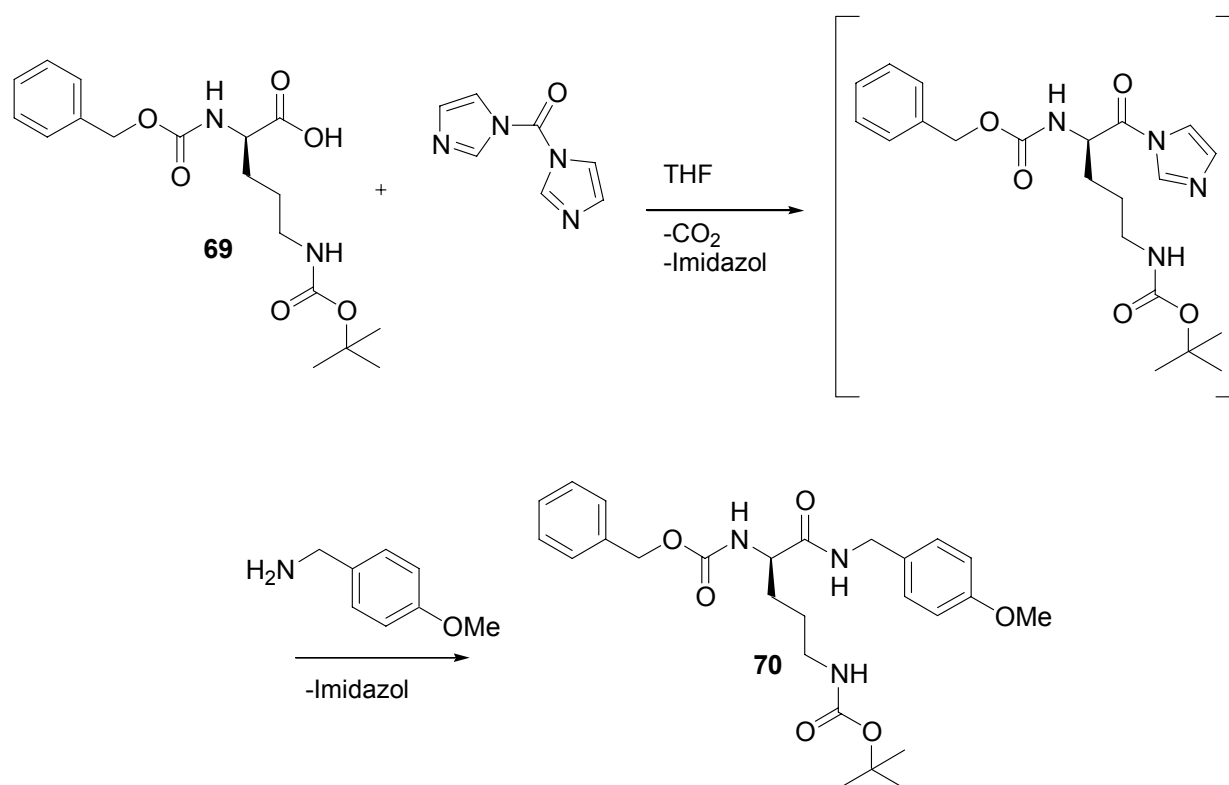
Zur Synthese von (*R*)-*N*^α-Benzyloxycarbonyl-*N*^δ-*tert*-butoxycarbonylornithin (**69**) wird analog zu der von BERGMANN et al. [Bergmann et al., 1932] beschriebenen Methode zu einer Suspension von (*R*)-*N*^δ-*tert*-Butoxycarbonylornithin in 1,4-Dioxan und Wasser Natriumhydrogencarbonat gegeben, anschließend wird Chlorameisensäurebenzylester unter Kühlung zugetropft. Nach Einengen, Ansäuern (unter strikter pH-Kontrolle bis pH = 6) und Extraktion mit Essigester wird **69** in fast quantitativer Ausbeute erhalten (Formelschema 3-41).



Formelschema 3-41

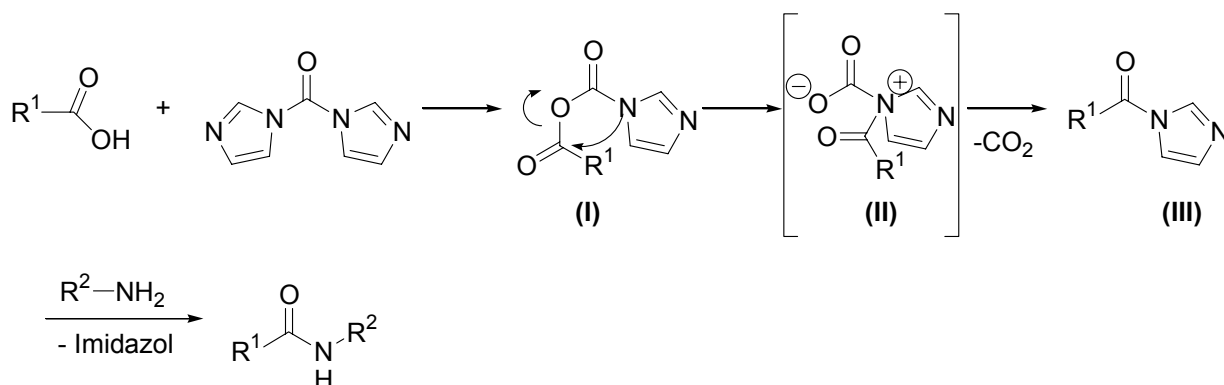
3.4.1.2 Herstellung von (*R*)-*N*^α-Benzyloxycarbonyl-*N*^δ-*tert*-butoxycarbonyl-*N*-[(4-methoxyphenyl)methyl]ornithinamid (**70**)

Zur Amidierung von **69** kann *N,N'*-Carbonyldiimidazol (CDI) als Kupplungsreagenz eingesetzt werden. Im Eintopfverfahren wird dabei die Carbonsäure bei Raumtemperatur mit CDI unter CO₂-Abspaltung in das Imidazolid überführt, das nicht isoliert, sondern sofort bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Amin weiter umgesetzt wird [Staab et al., 1962]. Da Imidazolide wie CDI oder die intermediär gebildeten Ornithylimidazolide hydrolyseempfindlich sind, muss die Reaktion in absoluten Lösungsmitteln durchgeführt werden [Paul et al., 1960]. Bei äquimolarem Einsatz der Reaktionspartner in absolutem Tetrahydrofuran (THF) oder Dichlormethan und nach Entfernen des gebildeten Imidazols durch Ausschütteln mit Wasser und anschließender säulenchromatographischer Reinigung kann das entstandene Amid **70** in guten Ausbeuten isoliert werden (Formelschema 3-42).



Formelschema 3-42

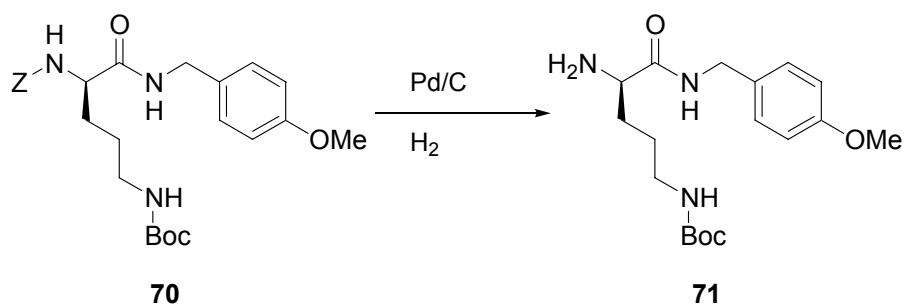
Bei der Umsetzung von Carbonsäuren mit *N,N'*-Carbonyldiimidazol (CDI) wird zunächst ein gemischtes Anhydrid (I) gebildet. Durch intramolekulare Substitution entsteht die Zwischenstufe (II), die rasch unter Decarboxylierung zum *N*-Acylimidazol (III) weiter reagiert (Formelschema 3-43) [Staab et al., 1960]. Das gebildete Imidazolid (III) zeichnet sich durch hohe Reaktivität gegenüber Nucleophilen aus und lässt sich direkt in einer Eintopfreaktion mit den Aminkomponenten umsetzen.



Formelschema 3-43

3.4.1.3 Herstellung von (*R*)-*N*^δ-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*-[(4-methoxyphenyl)methyl]ornithinamid (71)

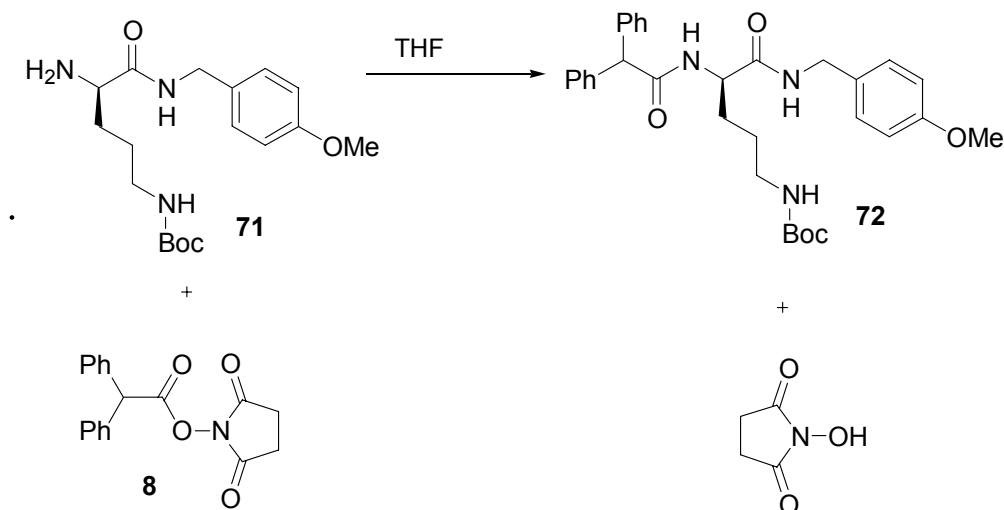
Die Benzyloxycarbonylgruppe von **70** wird in methanolischer Lösung mit Palladium/Aktivkohle (10 %) als Katalysator hydrogenolytisch abgespalten. Die Hydrierung wird im Autoklaven bei einem Wasserstoffdruck von 5 bar durchgeführt. Die Reinheit des erhaltenen Rohprodukts **71** ist für weitere Umsetzungen hoch genug, auf eine Aufreinigung wird deshalb verzichtet (Formelschema 3-44).



Formelschema 3-44

3.4.1.4 N^α -Acylierung des N^δ -geschützten Ornithinamids (**71**)

Die Acylierung des (*R*)-Ornithinamids **71**, welches als freie Base vorliegt, mit dem zuvor synthetisierten *N*-Hydroxysuccinimidester **8** liefert das (*R*)-Ornithinamid **72** (Formelschema 3-45). Diese Umsetzung wird in absolutem THF durchgeführt.



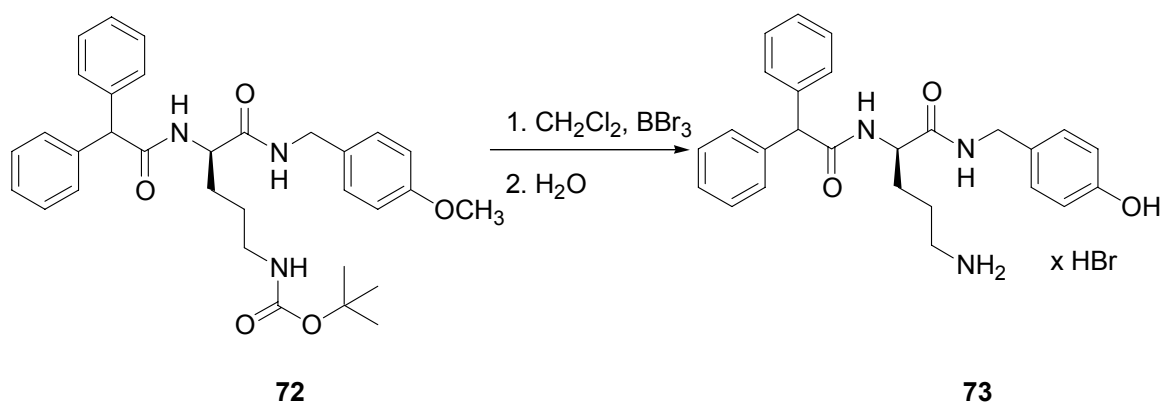
Formelschema 3-45

Nach Aufnahme der Produkte in Essigsäureethylester wird das Amid **72** säulenchromatographisch gereinigt. Man erhält das gewünschte Produkt in guten Ausbeuten.

3.4.1.5 Herstellung des Ornithinamids **73**

Um die zeitraubende Synthese der freien Base von 4-Hydroxybenzylamin (**22**) zu vermeiden, wurde der hier gezeigte Syntheseweg unter Einsatz von 4-Methoxybenzylamin über die Verbindung **72** gewählt.

Die phenolische OH-Gruppe wird durch eine Etherspaltung unter sehr milden Bedingungen mit BBr_3 erhalten [Mcomie et al., 1973]. BBr_3 spaltet als Lewis-Säure auch die Boc-Schutzgruppe ab [Felix, 1974], so dass beide Schutzgruppen, Methylether und Boc, in einem Schritt abgespalten werden. Nach Hydrolyse, Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung wird **73** in guten Ausbeuten erhalten (Formelschema 3-46).

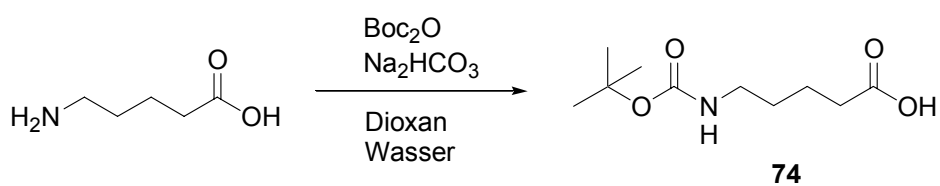


Formelschema 3-46

3.4.2 Herstellung von *N*-[5-(*tert*-Butoxycarbonylamino)pentanoyl]-*S*-methylisothioharnstoff

3.4.2.1 Synthese von 5-(*tert*-Butoxycarbonylamino)pentansäure (74)

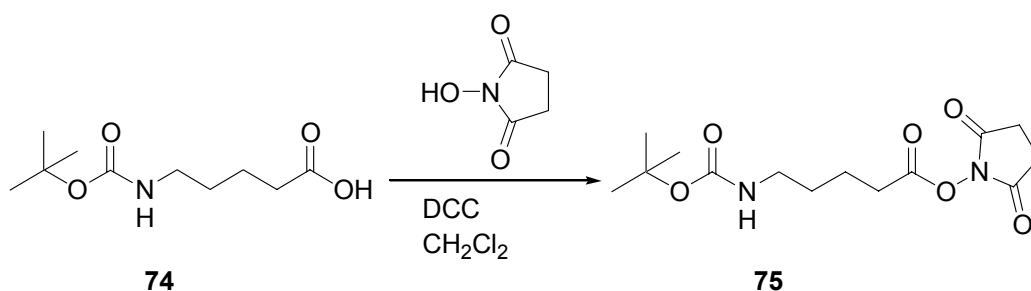
5-Aminopentansäure wird 24 Stunden bei Raumtemperatur in einer Dioxan/Wasser-Lösung von Natriumhydrogencarbonat und Di-*tert*-butyldicarbonat gerührt. Nach wässriger Aufarbeitung erhält man die Boc-geschützte Aminosäure (Formelschema 3-47) als farbloses Öl.



Formelschema 3-47

3.4.2.2 Herstellung von 5-(*tert*-Butoxycarbonylamino)pentansäuresuccinimidylester (75)

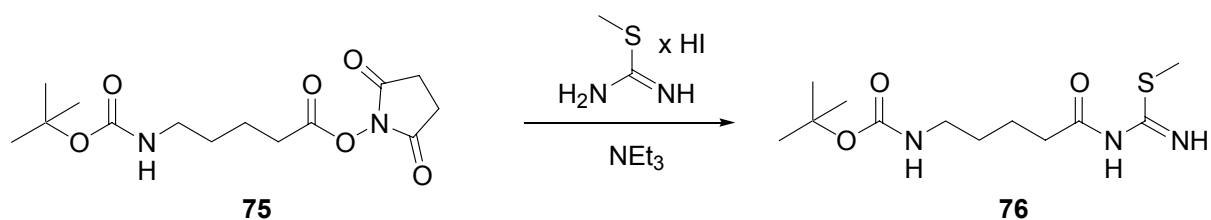
Die Boc-geschützte Säure **74** und *N*-Hydroxysuccinimid werden in Methylenchlorid gelöst und im Eisbad auf 5 °C abgekühlt. Anschließend gibt man DCC, gelöst in Methylenchlorid, tropfenweise dazu [Doughty et. al, 1993] (Formelschema 3-48). Nach 16 Stunden wird das ausgefallene Material abgesaugt, das Filtrat i. Vak. eingedampft und das erhaltene weiße amorphe Rohprodukt aus Ether/Hexan (1:1) umkristallisiert. Man erhält **75** in guten Ausbeuten.



Formelschema 3-48

3.4.2.3 Synthese von *N*-[5-(*tert*-Butoxycarbonylamino)pentanoyl]-*S*-methylisothioharnstoff (76)

S-Methylisothioharnstoff **28** • HI wird in Methylenchlorid gelöst und mit einem Äquivalent Triethylamin versetzt. Durch Zugabe von 5-(*tert*-Butoxycarbonylamino)pentansäuresuccinimidylester (**75**) wird der Isothioharnstoff acyliert [Adang et al., 1998] (Formelschema 3-49). Nach Ausschütteln mit Wasser erhält man das Guanylierungsreagenz als zähes farbloses Öl.

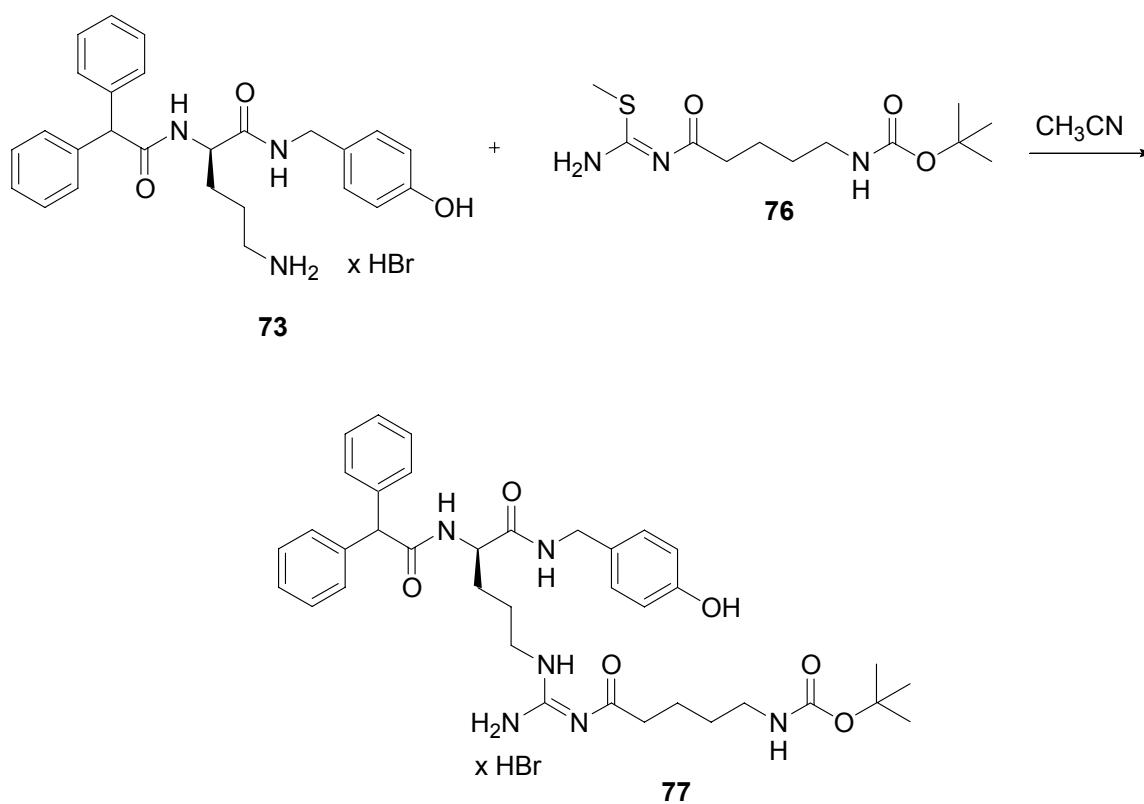


Formelschema 3-49

3.4.3 Darstellung von (R)-N^G-[5-(*tert*-Butoxycarbonylamino)pentanoyl-N^δ-diphenylacetyl-N-[(4-hydroxyphenyl)methyl]argininamid (77)

3.4.3.1 Aminolyse des N-Acyl-S-Methylisothioharnstoffs 76 mit dem Ornithinamid 73

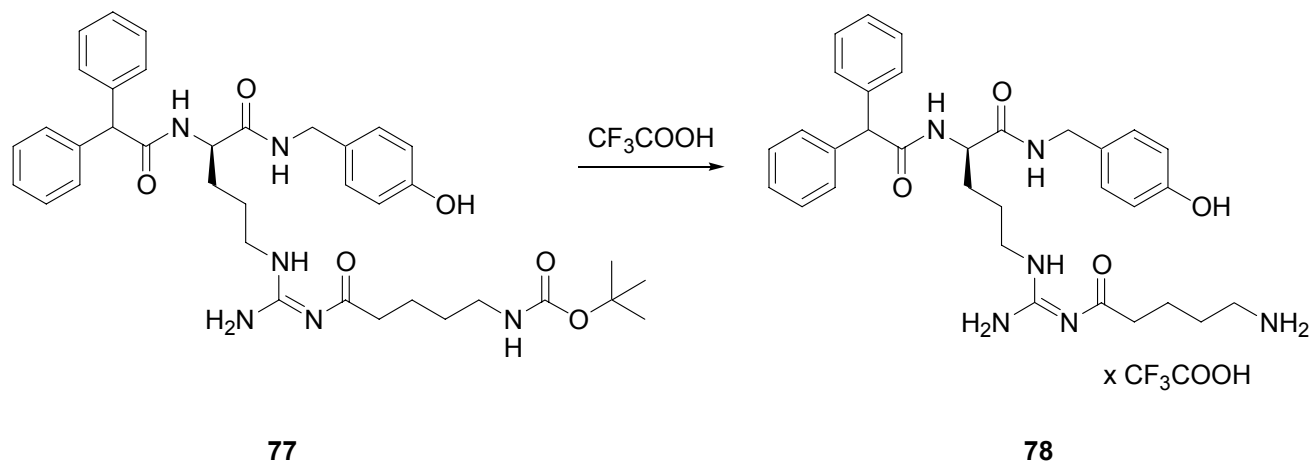
Das N^G-substituierte Argininamid **77** wird aus dem Boc-geschützten S-Methylisothioharnstoff **76** und **73** • HBr durch 20-stündiges Erhitzen in Acetonitril erhalten (Formelschema 3-50). Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Chloroform/Methanol (8:1) als Laufmittel. Das gewünschte Guanidin **77** wird in 27 % Ausbeute isoliert.



Formelschema 3-50

3.4.3.2 Abspaltung der Boc-Schutzgruppe vom Argininamid 77

Zur Acylierung des Argininamids **77** an der Aminogruppe des „Spacers“ ist es notwendig, die zuvor an dieser Position eingeführte Boc-Schutzgruppe wieder abzuspalten. Dies gelingt durch Ansäuern mit wasserfreier Trifluoressigsäure. Nach einer Reaktionszeit von einem Tag ist die Boc-Schutzgruppe vollständig abgespalten. (Formelschema 3-51).



Formelschema 3-51

3.4.4 Untersuchungen zur Darstellung potentieller Radioliganden

Für Radioligand-Bindungsstudien werden üblicherweise bevorzugt [³H]- oder [¹²⁵I]-markierte Rezeptoragonisten und –antagonisten eingesetzt. Für die Untersuchung der Gewebeverteilung von Rezeptoren in vivo eignen sich PET-Liganden, z. B. Substanzen die mit Fluor-18 markiert sind (Tab. 3-10).

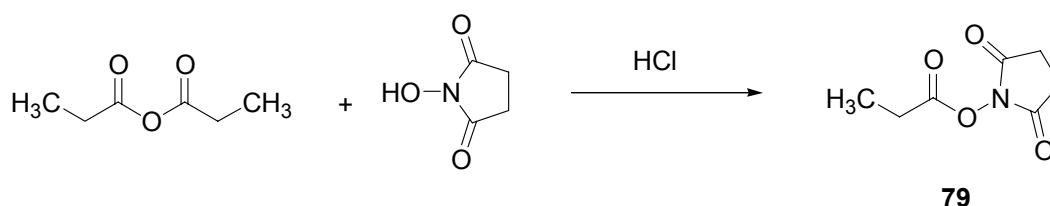
Tabelle 3-10: Radiochemische Eigenschaften von Tritium, Iod-125 und Fluor-18

Radioaktives Isotop	[³ H]	[¹²⁵ I]	[¹⁸ F]
Strahlung	β ⁻	γ	β ⁺
Halbwertszeit t _{1/2}	12.3 Jahre	60 Tage	110 min
spezifische Aktivität	2.96 x 10 ¹² Bq	8.14 x 10 ¹³ Bq	3.4 x 10 ¹¹ Bq

Tritium und Iod-125 können durch Acylierung einer Aminogruppe des Rezeptorliganden mit [³H]- Succinimidylpropionat oder mit dem BOLTON-HUNTER-Reagenz eingeführt werden. Bei Fluor-18 handelt es sich um ein in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) verwendetes radioaktives Isotop, das am Zyklotronbeschleuniger hergestellt wird. Ein großer Vorteil des künstlich erzeugten Fluor-18 ist die kurze Halbwertszeit ($t_{1/2} = 110$ min) und die damit verbundene relativ geringe Strahlenbelastung des Organismus. Die Fluor-18-Markierung kann z.B. durch Kondensation einer freien Aminogruppe mit para-Fluorbenzaldehyd und anschließende Reduktion mit Natriumcyanoborhydrid erfolgen. Um zu überprüfen, ob entsprechend modifizierte Argininamide noch über die gewünschten pharmakologischen Eigenschaften verfügen, wurde die Verbindung **78** mit kalten (d.h. nicht radioaktiv markierten) Reagenzien umgesetzt und auf Y₁-Antagonismus untersucht.

3.4.4.1 Herstellung von Succinimidylpropionat (79)

Propionsäureanhydrid (gleichzeitig Lösungsmittel) und *N*-Hydroxysuccinimid werden in Gegenwart einer katalytischen Menge Salzsäure unter Rückfluss erhitzt. Man lässt die braune Flüssigkeit auf Raumtemperatur abkühlen und führt verschiedene Wasch- und Extraktionsschritte durch, bis man schließlich ein farbloses Öl erhält. Das Öl wird mit Diethylether versetzt und 24 h bei –20 °C aufbewahrt. Man erhält weiße Kristalle, die mit Ether gewaschen und anschließend i. Vak getrocknet werden [Elliot et al., 1999] (Formelschema 3-52).



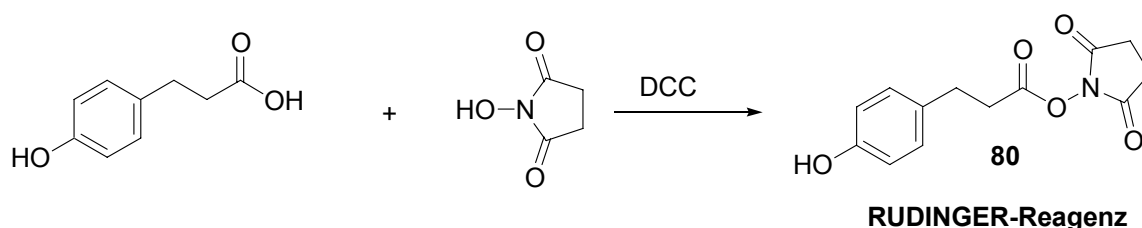
Formelschema 3-52

3.4.4.2 Herstellung von „kaltem“ BOLTON-HUNTER-Reagenz

Um Iod-125 in Proteine einzuführen, wird neben der direkten Iodierung, hauptsächlich von Tyrosinresten, häufig die Derivatisierung von primären Aminogruppen mit Succinimidyl-3-(4-hydroxy-3-[¹²⁵I]iodphenyl)propionat (BOLTON-HUNTER-Reagenz) herangezogen [Bolton und

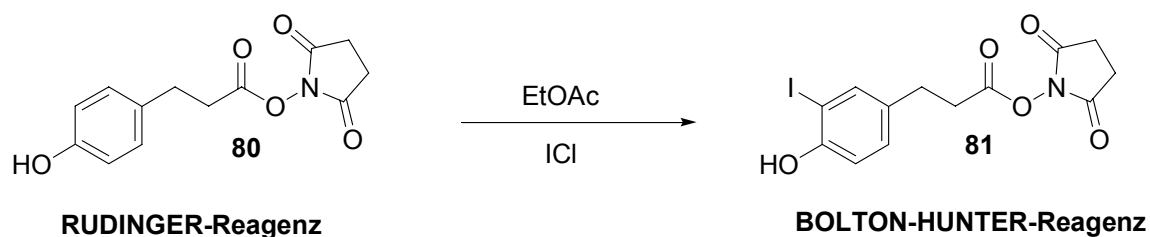
Hunter, 1973]. Die Reaktion mit BOLTON-HUNTER-Reagenz verläuft unter wesentlich milderen Bedingungen als eine direkte Iodierung, bei der es häufig zu Strukturveränderungen bzw. zu einer Vielzahl von Reaktionsprodukten kommt (McFarthing, 1992).

Zur Herstellung von BOLTON-HUNTER-Reagenz wird zuerst das RUDINGER-Reagenz (Succinimidyl-3-(4-hydroxyphenyl)propionat) (**80**) durch Umsetzung von *N*-Hydroxysuccinimid mit 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure in Dimethoxyethan synthetisiert [Rudinger und Ruegg, 1973] (Formelschema 3-53). Das ölige Rohprodukt ergibt nach zweimaliger Umkristallisation aus 2-Propanol ein weißes Pulver.



Formelschema 3-53

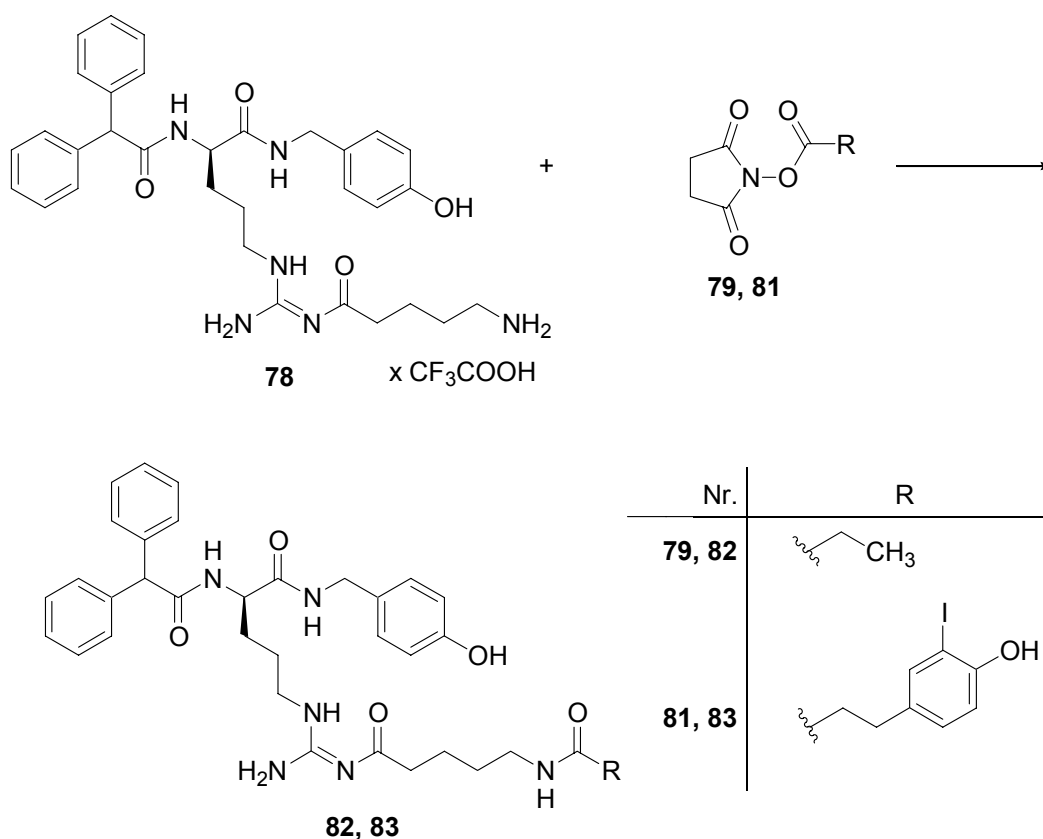
Das RUDINGER-Reagenz wird anschließend in Ethylacetat gelöst und tropfenweise mit einer Lösung von Iodmonochlorid in Ethylacetat (unter Lichtschutz) versetzt [O’Kennedy et al., 1989]. Das BOLTON-HUNTER-Reagenz (Succinimidyl-3-(4-hydroxy-3-iodphenyl)propionat, **81**) wird abfiltriert, gewaschen und i. Vak. getrocknet (Formelschema 3-54).



Formelschema 3-54

3.4.4.3 Darstellung der Propionsäure- bzw. BOLTON-HUNTER-modifizierten Argininamide **82** und **83**

Bei der Darstellung von Radioliganden ist es ein großer Vorteil, wenn die radioaktive Markierung erst im letzten Syntheseschritt erfolgt. Die Umsetzung des Argininamids **78** mit [^3H]-Succinimidylpropionat bzw. mit [^{125}I]-BOLTON-HUNTER-Reagenz wäre die letzte Stufe der Synthese mit Iod bzw. Tritium markierter NPY Y_1 -Rezeptorantagonisten des Arginintyps wie z.B. der Verbindungen **82** und **83**. Um die Durchführbarkeit der Reaktion und die Affinität der hergestellten Liganden zum Y_1 -Rezeptor prüfen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit die entsprechenden „kalten“ Substanzen synthetisiert. **78** wird mit **79** bzw. **81** und der Hilfsbase DIPEA 48 Stunden bei 40 °C gerührt. (Formelschema 3-55). Man erhält die Y_1 -Rezeptorliganden **82** und **83** nach chromatographischer Reinigung in ca. 50 % Ausbeute.

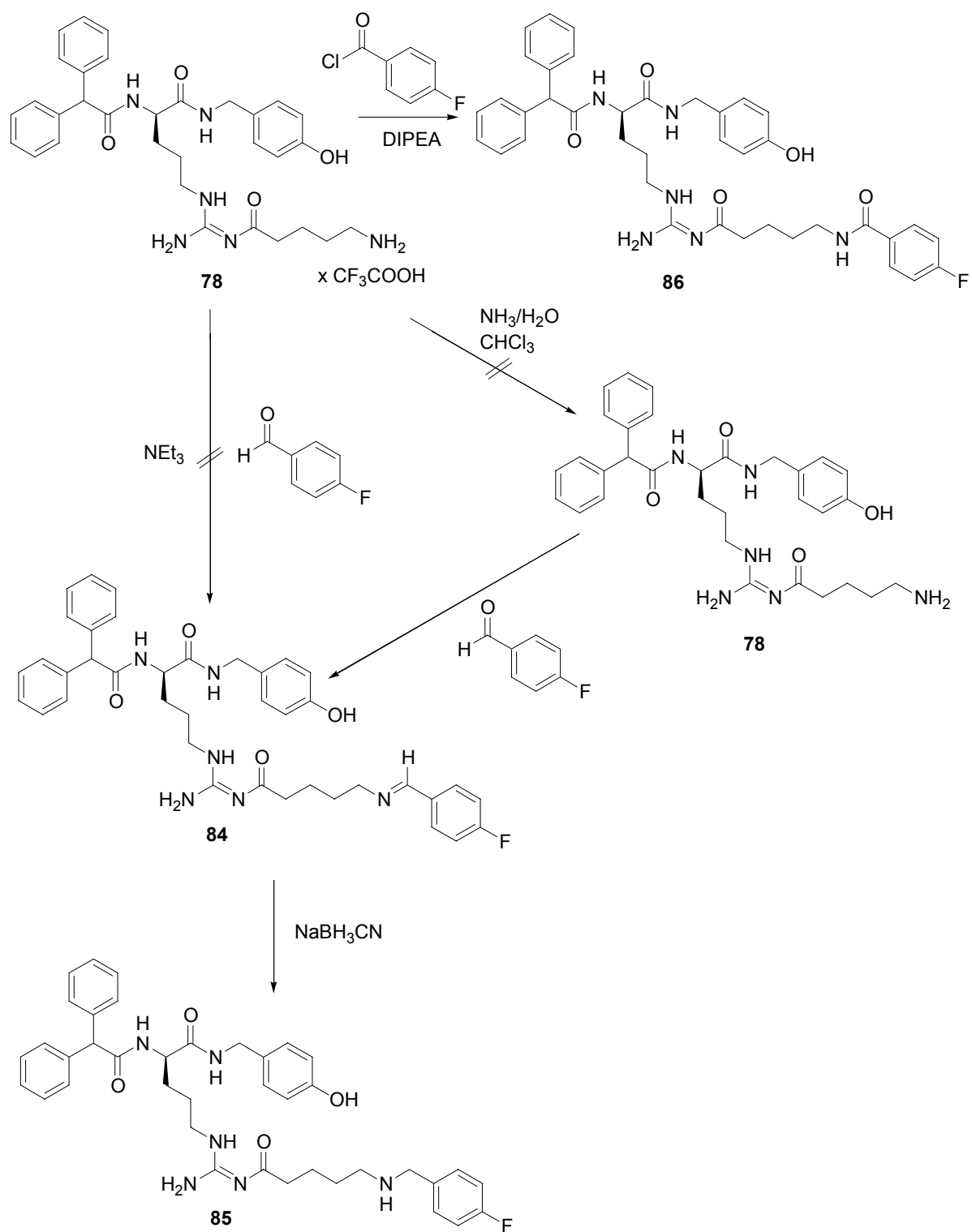


Formelschema 3-55

3.4.4.4 Synthese eines fluorierten Y₁-Rezeptorliganden

Zur Einführung eines Fluorsubstituenten in den Neuropeptid Y₁-Antagonisten **78** war eine zweistufige Reaktion geplant (Formelschema 3-56). Zuerst sollte das Imin **84** durch Kondensation von para-Fluorbenzaldehyd mit dem primären Amin **78** dargestellt werden. Aus der Reaktionsmischung muss dabei zur vollständigen und schnellen Umsetzung das entstehende Wasser entzogen werden. Dies kann durch azeotrope Destillation, mittels Molekularsieb oder Trockenmittel wie Natriumsulfat geschehen [Layer, 1963]. Deswegen wurde die Reaktion in wasserfreiem Methylenchlorid unter Zusatz von wasserfreiem Natriumsulfat durchgeführt. Anschließend sollte das entstandene Imin mit dem milden Reduktionsmittel Natriumcyanoborhydrid in wasserfreiem Methanol zum korrespondierenden Amin **85** reduziert werden.

Für die Umsetzung mit para-Fluorbenzaldehyd muss das Amin **78** als freie Base vorliegen. Dies ist aber aufgrund der vorangegangenen Schutzgruppenabspaltung mit Trifluoressigsäure nicht der Fall. Um die freie Base zu isolieren, wurde **78** in Chloroform gelöst und mit wässrigem Ammoniak neutralisiert. Allerdings konnte nach der anschließenden Extraktion der wässrigen Phase mit Chloroform das Amin nicht isoliert werden. Deswegen wurde versucht, die Base von **78** in situ, d.h. durch Zugabe von Triethylamin vor der Umsetzung mit para-Fluorbenzaldehyd, freizusetzen. Leider konnte das gewünschte Produkt **84** auch nach einer Reaktionszeit von 24 h nicht nachgewiesen werden. Da als Alternative zur Derivatisierung mit Fluorbenzaldehyd auch eine Amidierung in Frage kommt, wurde **78** mit 4-Fluorbenzoylchlorid und drei Äquivalenten Triethylamin in Methylenchlorid umgesetzt (Podona et al., 1994), um auf diese Weise zu dem fluorierten Antagonisten **86** zu gelangen (Formelschema 3-56).

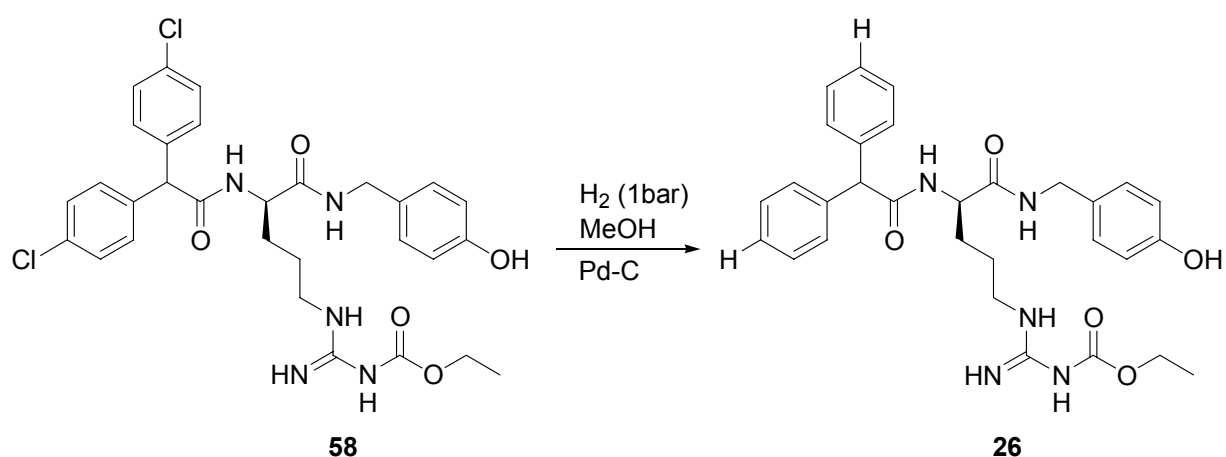


Formelschema 3-56

3.4.4.5 Voruntersuchungen zur Tritiierung durch hydrogenolytische Dehalogenierung

Eine präparativ einfache Möglichkeit, tritiierte NPY Y₁ Rezeptorantagonisten darzustellen, ist die hydrogenolytische Dehalogenierung von Argininamiden, die mit Chlor substituierte Phenylringe enthalten. Die am Aromaten gebundenen Chloratome können sehr leicht gegen Wasserstoff ausgetauscht werden. Dies zeigte sich bei dem Versuch, Argininamide ausgehend von *N*^G-Nitro-geschütztem Arginin zu synthetisieren [Aiglstorfer, 1999]. Bei der Hydrierung der Nitroarginine mit 5 bar Wasserstoff an Pd-Kohle wurden die Chloratome an den Phenylresten – in diesem Fall unerwünscht - quantitativ durch Wasserstoff substituiert. Unter den gleichen Bedingungen werden *N*^G-akzeptorsubstituierte Argininamiden zu den entsprechenden unsubstituierten Argininamiden deacyliert [Hutzler, 2001].

Um die Abspaltung des *N*^G-Substituenten zu vermeiden, wurde das Bis(4-chlorphenyl)-acetylargininamid **58** bei einem bar Wasserstoffdruck an Pd-C hydriert (Formelschema 3-57).



Formelschema 3-57

Unter Austausch der beiden Chloratome gegen Wasserstoff wurde dabei der Y₁-Antagonist **26** erhalten. Analog könnte **58** mit Tritium/Pd-C in einen zweifach tritiierten NPY Y₁-Rezeptorantagonisten überführt werden.

4 Pharmakologischer Teil

4.1 Bestimmung der Y_1 -antagonistischen Wirkung

4.1.1 Y_1 -Antagonismus an HEL-Zellen (Ca^{2+} -Assay)

Als Standardmodell zur pharmakologischen Untersuchung der synthetisierten Verbindungen auf Neuropeptid Y Y_1 -antagonistische Aktivität sind HEL-Zellen (human erythroleukemia cells) sehr gut geeignet. In der Membran dieser Zellen wurden Neuropeptid Y -Rezeptoren nachgewiesen, die sowohl für Bindungsstudien als auch für funktionelle Untersuchungen genutzt werden können. Die Stimulation mit NPY führt zu einer Hemmung der Bildung von zyklischem 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) durch die Adenylylzyklase sowie über eine Aktivierung des Phosphoinositolmetabolismus zu einem vorübergehenden Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels von 40 - 70 nM auf 200 - 250 nM [Motulsky und Michel, 1988]. Besitzt eine Testsubstanz Y_1 -antagonistische Aktivität, so wird die durch NPY induzierte Ca^{2+} -Freisetzung gehemmt.

Der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt lässt sich mit Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzindikatoren, wie z. B. Fura-2, bestimmen. Eingesetzt wird der lipophile Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2/AM), der die Zellmembran rasch zu durchdringen vermag und von intrazellulären Esterasen zum aktiven Ca^{2+} -Indikator Fura-2 gespalten wird (vgl. Abbildung 4-1).

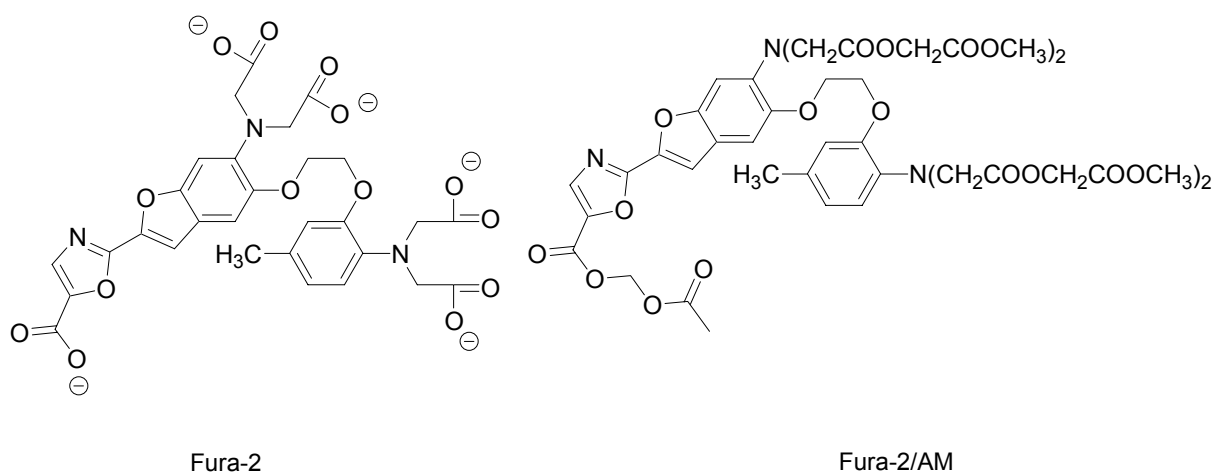


Abbildung 4-1: Struktur von Fura-2 und Fura-2/AM

Die Aufnahme des Acetoxymethylester (Fura-2/AM) in die Zellen wird durch Zusätze wie den Lösungsvermittler Pluronic F-127 und DMSO erleichtert. Ca^{2+} -freies Fura-2 und der Fura-2- Ca^{2+} -Komplex haben unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften. Daher werden die Proben durch ein Filterrad abwechselnd mit UV-Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm angeregt. Die Emission wird bei 510 nm gemessen. Bei einer Anregung mit 340 nm zeigt Fura-2 eine geringere Fluoreszenz als der Fura-2- Ca^{2+} -Komplex, d.h., je mehr Ca^{2+} komplexiert wird, umso intensiver wird die Fluoreszenz bei dieser Anregungswellenlänge. Bei einer Anregung mit 380 nm fluoresziert die Ca^{2+} -freie Form stärker als der Fura-2- Ca^{2+} -Komplex. Zur Auswertung wird das Verhältnis (R) der Fluoreszenzintensitäten bei den Anregungswellenlängen 340 und 380 nm herangezogen.

(1)

$$R = \frac{F_{340}}{F_{380}}$$

R wird umso größer, je mehr Ca^{2+} gebunden ist. Der Vorteil dieser Zwei-Wellenlängen-Methode besteht darin, dass R (zumindest theoretisch) unabhängig von der Farbstoffkonzentration und der Zellzahl ist [McCormack und Cobbold, 1991].

Mit Hilfe der Grynkiewicz-Gleichung kann R in die aktuelle Ca^{2+} -Konzentration umgerechnet werden [Grynkiewicz et al., 1988].

(2)

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \cdot \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \cdot \text{SFB}$$

In der Formel ist K_d die Dissoziationskonstante ($K_d = 224 \text{ nM}$) des Fura-2- Ca^{2+} -Komplexes. R_{\max} erhält man durch Zusatz von 0.2 %iger Digitoninlösung. SFB ist ein empirisch zu ermittelnder Faktor, der die Fluoreszenzbeiträge der beiden Fluorophore (Fura-2 und Fura-2- Ca^{2+} -Komplex) bei 380 nm berücksichtigt. Der Digitonin-Zusatz bewirkt Zellyse, so dass das gesamte Ca^{2+} von Fura-2 komplexiert wird und die Fluoreszenz den Maximalwert erreicht. R_{\min} erhält man durch Zusatz von EGTA, wobei das gesamte Ca^{2+} von dem Chelatbildner komplexiert wird, so dass keine fluoreszierenden Fura-2- Ca^{2+} -Komplexe gebildet werden können.

Da die Aufnahme kompletter Konzentrations-Wirkungskurven von NPY in Abwesenheit und in Gegenwart verschiedener Konzentrationen eines potentiellen Antagonisten mit erheblichem materiellen und zeitlichen Aufwand verbunden ist, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, für die hergestellten Substanzen zunächst die prozentuale Hemmung des durch 10 nM NPY induzierten Ca^{2+} -Signals zu bestimmen. Diese NPY-Konzentration bewirkt eine

submaximale Zunahme der Ca^{2+} -Konzentration, welche in jeder 3. Küvette ermittelt und als 100 %-Wert der Bestimmung der antagonistischen Aktivität der Testsubstanzen zugrunde gelegt wird. Der Antagonist wird in den Küvetten vor und nach dem 100 %-Wert getestet. Die Substanz wird dazu in einer geeigneten Konzentration (0.1 - 100 μM) vorgelegt, und genau 1 min später wird das Ca^{2+} -Signal mit 10 nM NPY ausgelöst. Zur Bestimmung des 0 %-Wertes (Kontrolle) gibt man nur das Lösungsmittel (Ethanol/Wasser im Verhältnis 1:1) zu. Aus dem Verhältnis der Signalthöhen wird die prozentuale Hemmung berechnet [Motulsky und Michel, 1988].

Da nicht alle Substanzen bei den gleichen Antagonistenkonzentrationen getestet werden konnten, wurde aus diesen „single-dose-Experimenten“ eine vergleichbare pharmakologische Kenngröße abgeleitet. Hierzu wurden IC_{50} -Werte bei wenigstens zwei verschiedenen Antagonistenkonzentrationen $[B]$, die den durch NPY stimulierten Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} zwischen 20 und 80 % hemmen, berechnet. Der mittlere prozentuale Hemmwert P mit einem SEM (standard error of mean) $< 10 \%$, errechnet aus mindestens drei an verschiedenen Tagen durchgeführten unabhängigen Experimenten, wurde gemäß folgender Gleichung logit-transformiert.

(3)

$$\text{logit}(P) = \log \frac{P}{100 - P}$$

Die IC_{50} -Werte ($\text{logit } P = 0$) wurden aus der Auftragung $\text{logit}(P)$ gegen $\log[B]$ mit der Steigung n gemäß Gleichung (4) durch eine lineare Regression bestimmt.

(4)

$$\log \frac{P}{100 - P} = n \cdot \log[B] - n \cdot \log \text{IC}_{50}$$

Die so ermittelten Wirkstärken sind für eine vergleichende Bewertung der untersuchten Substanzen geeignet.

4.1.2 Y₁-Radioligand-Bindungsassay an SK-N-MC-Zellen

Substanzen, die sich im Ca²⁺-Assay als potente Antagonisten erwiesen, wurden zusätzlich einem Y₁-Radioligand-Bindungsassay an intakten SK-N-MC-Zellen unterzogen. Nach der von GESSELE beschriebenen Methode (vgl. 6.6.2) wurden hierbei die IC₅₀-Werte für die Verdrängung von 1 nM [³H]Propionyl-pNPY bestimmt [Gessele, 1998].

4.2 Y₂-Radioligand-Bindungsassay an SMS-KAN-Zellmembranen

Um Informationen bzgl. der Rezeptorsubtyp-Selektivität zu erhalten, wurden einige der synthetisierten Verbindungen in Radioligand-Bindungsstudien auch auf Y₂- und Y₅-Affinität geprüft.

Die Y₂-Rezeptorbindungsstudien erfolgten analog der von BECK-SICKINGER beschriebenen Methodik [Beck-Sickinger et al., 1994] unter Verwendung von [³H]Propionyl-pNPY anstelle von "Bolton-Hunter"-modifiziertem NPY nach einem von GESSELE etablierten Versuchsprotokoll an SMS-KAN-Zellmembranen (vgl. 6.6.3) [Gessele, 1998].

4.3 Y₅-Radioligand-Bindungsassay an HEC-1B-Zellen

Die Y₅-Rezeptorbindungsstudien erfolgten an stabil mit dem humanen Y₅-Rezeptortransfizierten HEC-1B-Zellen nach einer von MOSER beschriebenen Methode [Moser, 1999; Moser et al., 2000]. Die Y₅-Affinität der Verbindungen wurde durch Verdrängung von 1 nM [³H]Propionyl-pNPY bestimmt (vgl. 6.6.4).

4.3.1 Berechnung von IC₅₀-Werten aus Kompetitionskurven im Radioligand-Bindungsassay

Die Berechnung der IC₅₀-Werte im Radioligand-Bindungsassay erfolgte auf der Grundlage der Hill-Gleichung. Dabei gilt: y = spezifisch gebundene Radioaktivität, x = Konzentration der Testsubstanz.

$$y = \text{Min} + ((\text{Max} - \text{Min}) / (1 + (x / x_{50})^{-P}))$$

Die spezifische Bindung des Radioliganden (totale Bindung – unspezifische Bindung) wurde als 100 %-Wert eingesetzt. Die Parameter Min, Max, x₅₀ (IC₅₀-Wert) und P (entspricht dem Hill-Koeffizienten) wurden berechnet.

4.3.2 Berechnung von K_i-Werten

Die Berechnung von K_i-Werten erfolgte auf der Grundlage der Cheng-Prusoff Gleichung (Cheng und Prusoff, 1973) aus den IC₅₀-Werten.

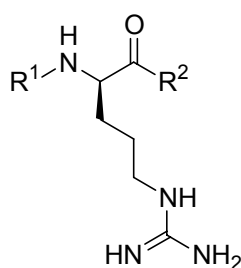
$$K_i = \text{IC}_{50} / (1 + (L / K_D))$$

Es gilt: L = Konzentration des Radioliganden, K_D = Dissoziationskonstante des Radioliganden

4.4 Pharmakologische Wirkung der synthetisierten Argininamide

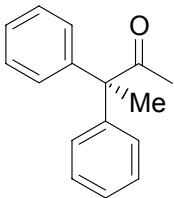
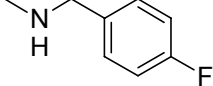
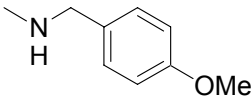
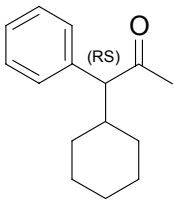
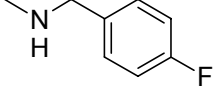
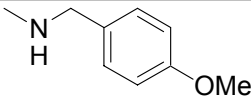
Alle in dieser Arbeit synthetisierten Argininamide wurden im Ca^{2+} -Assay an HEL-Zellen auf NPY Y_1 -antagonistische Wirkung geprüft. Die Verbindungen lassen sich aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten in zwei Untergruppen aufteilen: in die N^G -unsubstituierten Argininamide und die N^G -substituierten Argininamide, wobei hier eine weitere Differenzierung in N^G -alkylsubstituierte, N^G -estersubstituierte, N^G -acetylsubstituierte und N^G -carbamoylsubstituierte Argininamide möglich ist. Die Testergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengestellt.

Tabelle 4-1: Y_1 -antagonistische Wirkung von N^G -unsubstituierten Argininamiden im Ca^{2+} -Assay an HEL-Zellen



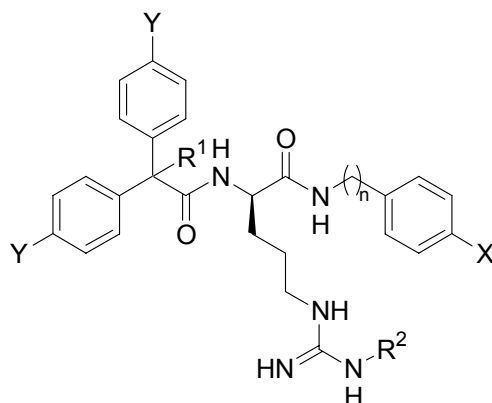
Nr.	R ¹	R ²	Y_1 -Antagonismus ^a IC ₅₀ [nM]
18			110
38			187
40			840
43			319

Fortsetzung **Tabelle 4-1**

Nr.	R ¹	R ²	Y ₁ -Antagonismus ^a IC ₅₀ [nM]
39			15100
42			5500
37			77
41			131

^aberechnet aus der Hemmung des durch 10 nM NPY induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiegs; der Standardfehler des Mittelwerts (SEM, standard error of the mean) der zur Berechnung der IC₅₀-Werte verwendeten mittleren prozentualen Hemmwerte *P* beträgt < 10 %; verwendete Antagonistenkonzentrationen: 20, 10, 1, 0.5, 0.1 und 0.05 μM; Mittelwerte aus mind. drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 4-2: Y₁-antagonistische Wirkung von N^G-substituierten Argininamiden im Ca²⁺-Assay an HEL-Zellen



Nr.	Y	X	R ¹	R ²	n	Y ₁ -Antagonismus ^a IC ₅₀ [nM]
27	H	OH	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	1	0.171
56		H		CO-NH-(CH ₂) ₅ -CO ₂ Et		2.4
57		CH ₂ OH		CO-C(CH ₃) ₃		472
59		OH	CH ₃	CO ₂ CH ₂ Ph	2	234
60				CO ₂ CH ₃		9700
61				CO ₂ Et		1600
62		H		CO ₂ CH ₃		75.3
63				CO ₂ Et		38.0
64				CO ₂ CH ₂ Ph		18.9
65				CO ₂ CH ₃		12.0
66	Cl	CH ₂ OH	H	CO ₂ Et	1	3.4
67				CO ₂ CH ₂ Ph		2.3
68				CO-C(CH ₃) ₃		34.8
82				CO-(CH ₂) ₄ -NH-CO-CH ₂ CH ₃		2.9
83	H	OH		CO-(CH ₂) ₄ -NH-CO-(CH ₂) ₂ -Ar(3-I)(4-OH)		9.7
86				CO-(CH ₂) ₄ -NH-CO-CH ₂ -Ar(4-F)		7.1

^aberechnet aus der Hemmung des durch 10 nM NPY induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiegs; der Standardfehler des Mittelwerts (SEM, standard error of the mean) der zur Berechnung der IC₅₀-Werte verwendeten mittleren prozentualen Hemmwerte *P* beträgt < 10 %; verwendete Antagonistenkonzentrationen: 10, 1, 0.5, 0.1, 0.01 und 0.001 μM; Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Mit einer Auswahl von Argininamiden, die sich im funktionellen Test (Ca^{2+} -Assay) als potente Y_1 -Antagonisten erwiesen, wurden Radioligand-Bindungsstudien an Y_1 -Rezeptoren (SK-N-MC-Zellen), Y_2 -Rezeptoren (SMS-KAN-Zellmembranen) und Y_5 -Rezeptoren (HEC-1B-Zellen) durchgeführt, um die Rezeptorsubselektivität der synthetisierten Substanzen zu ermitteln. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-3 zusammengefasst.

Tabelle 4-3: Bindungsdaten von ausgewählten Argininamiden an Y_1 -, Y_2 - und Y_5 -Rezeptoren

Nr.	Y_1	Y_2	Y_5	Selektivität	Selektivität
	K_i [nM]	K_i [nM]	K_i [nM]	Y_1/Y_2	Y_1/Y_5
82	4.6	47500	23600	10326	5130
83	15.9	19970	48500	1256	3050
86	9.6	32500	29300	3385	3052

Radioligand-Bindungsstudien: Y_1 : an SK-N-MC-Zellen mit [^3H]Propionyl-NPY (1nM); Y_2 : an SMS-KAN-Zellmembranen mit [^3H]Propionyl-NPY (1nM); Y_5 : an HEC-1B-Zellen mit [^3H]Propionyl-NPY (1nM)

Wegen des hohen experimentellen Aufwands des cAMP-Assays (6.6.5) wurden exemplarisch nur die Verbindungen **82** und **83** auf Y_1 -antagonistische Aktivität an SK-N-MC-Zellen getestet. Wie in Tabelle 4-4 dargestellt, war die Y_1 -antagonistische Aktivität der Testverbindungen im cAMP-Assay jeweils etwa um den Faktor 4 niedriger als im Ca^{2+} -Assay. Die Tatsache, dass die IC_{50} -Werte im cAMP-Assay insgesamt höher sind als im Ca^{2+} -Assay, ist auf die völlig verschiedene Versuchsdurchführung zurückzuführen: Die cAMP-Bildung wird rezeptorunabhängig mit Forskolin stimuliert. Dieser Effekt ist durch NPY hemmbar. Y_1 -Antagonisten blockieren wiederum den Effekt von NPY.

Tabelle 4-4: Gegenüberstellung von Testergebnissen aus Ca^{2+} -, cAMP- und Y_1 -Rezeptorbindungs-Assay

Nr.	Ca^{2+} -Assay ^a IC_{50} [nM]	cAMP-Assay IC_{50} [nM]	Y_1 -Rezeptorbindung ^b K_i [nM]
82	2.9	12.4	4.6
83	9.7	39.3	15.9

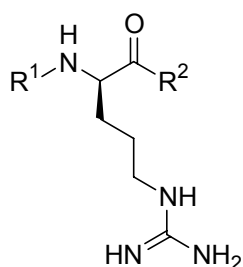
^aHemmung des durch 10 nM NPY induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs in HEL-Zellen; ^bRadioligand: [³H]-Propionyl-NPY (1 nM), SK-N-MC-Zellen

4.5 Diskussion der Struktur-Wirkungs-Beziehungen

4.5.1 N^G -unsubstituierte Argininamide

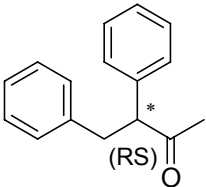
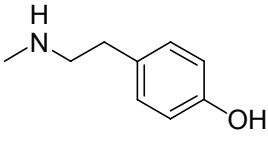
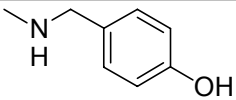
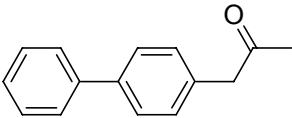
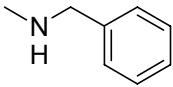
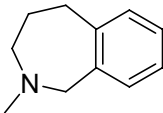
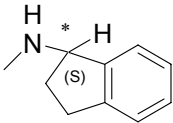
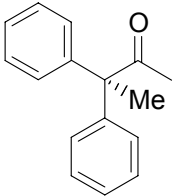
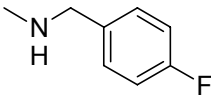
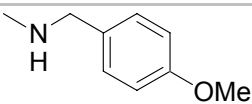
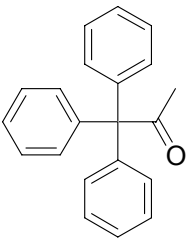
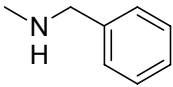
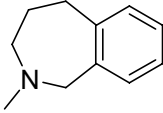
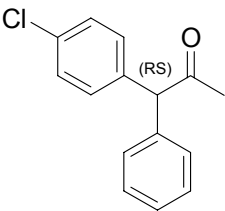
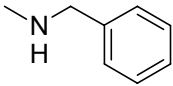
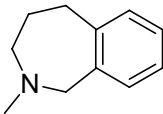
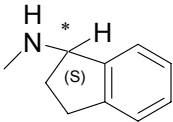
Auf die Synthese von (*S*)-konfigurierten Argininamiden wurde weitestgehend verzichtet, da bereits aus vorangegangenen Untersuchungen bekannt war, dass die (*R*)-konfigurierten Argininamide generell höhere Y_1 -antagonistische Aktivität aufweisen [Aiglstorfer, 1999].

Tabelle 4-5: Y_1 -antagonistische Wirkung von N^G -unsubstituierten Argininamiden (Ca^{2+} -Assay an HEL-Zellen); Vergleich im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Substanzen mit Daten bereits bekannter Substanzen [Rudolph et al., 1994], [Uffrecht, 1996], [Merz, 1997], [Aiglstorfer, 1999]

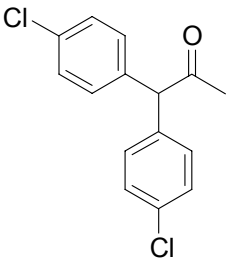
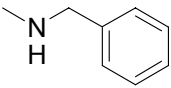
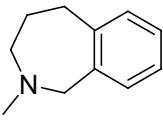
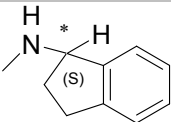
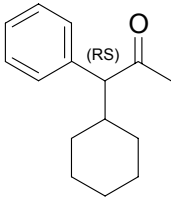
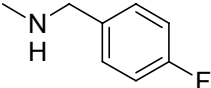
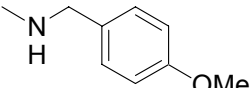
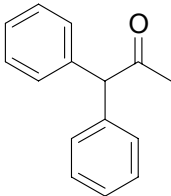
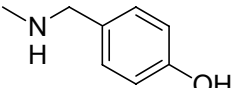
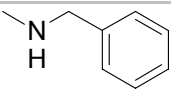
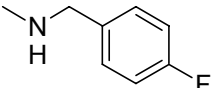
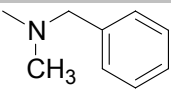
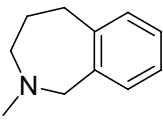
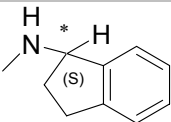


Nr.	R ¹	R ²	Y ₁ -Antagonismus ^a IC ₅₀ [nM]
87 ^d			510
40			840
43			320

Fortsetzung **Tabelle 4-5:**

Nr.	R ¹	R ²	Y ₁ -Antagonismus ^a IC ₅₀ [nM]
88 ^b			14000
89 ^b			19000
90 ^b			21800
91 ^d			76000
92 ^b			inaktiv
39			15100
42			55000
93 ^b			inaktiv
94 ^d			51000
95 ^b			81
96 ^d			1100
97 ^b			3000

Fortsetzung **Tabelle 4-5:**

Nr.	R ¹	R ²	Y ₁ -Antagonismus ^a IC ₅₀ [nM]
98 ^b			170
99 ^d			1100
100 ^b			28700
37			77
41			131
BIBP3226 ^e			17
18			110
38			187
101 ^c			26
102 ^d			2200
103 ^d			1900

^aberechnet aus der Hemmung des durch 10 nM NPY induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiegs; Substanzen die als inaktiv bezeichnet sind zeigten bei 100 μM weniger als 20 % Hemmung; der Standardfehler des Mittelwerts (SEM, standard error of the mean) der zur Berechnung der IC₅₀-Werte verwendeten mittleren prozentualen Hemmwerte *P* beträgt < 10 %; verwendete Antagonistenkonzentrationen: 70, 50, 20, 10, 1, 0.5, 0.1, 0.05 und 0.01 μM; Mittelwerte aus mind. drei unabhängigen Experimenten.
^b[Uffrecht, 1996]. ^c[Merz, 1997]. ^d[Aiglstorfer, 1999]. ^e[Rudolph et al., 1994]

Weil bei ω -Guanidinoalkanamiden eine Homologisierung der Diarylalkyl-Partialstruktur und der p-Hydroxyphenylalkylgruppe die NPY Y₁-antagonistische Wirkung nur geringfügig beeinflusst [Müller et al., 1997], wurde von AIGLSTORFER untersucht [Aiglstorfer, 1999], wie sich bei den Argininamiden eine Veränderung im Diarylteil auf die Struktur-Wirkungs-Beziehungen auswirkt. In der vorliegenden Arbeit wurden u.a. die genannten Untersuchungen fortgeführt und die bereits existierende Serie N^ε-unsubstituierter Überraschenderweise verursacht der Austausch von OH gegen OMe in dieser Position nur einen 19-fachen Affinitätsverlust (**BIBP 3226** vs **43**). Argininamide durch Synthese neuer Substanzen an polymeren Trägern ergänzt. Zum Vergleich sind in Tabelle 4-5 die Strukturen und die Y₁-antagonistischen Aktivitäten der neuen und der bereits bekannten Argininamide zusammengestellt.

Der Austausch der Diphenylacetylgruppe in **BIBP 3226** gegen eine 3,3-Diphenylpropionylgruppe in **87** führt bereits zu einer 30fachen Abnahme der Affinität. Ersetzt man zusätzlich die OH-Gruppe im 4-Hydroxybenzylamin durch Fluor verringert sich die Affinität sogar um das 50-fache (**BIBP 3226** vs **40**).

Eine vicinale 2,3-Anordnung der Phenylringe (**88**, **89**) im Vergleich zur geminalen 2,2-Anordnung (**BIBP 3226**) verringert die Y₁-Aktivität um den Faktor 823 (**BIBP 3226** vs **88**) bzw. 1118 (**BIBP 3226** vs **89**), während eine p-Hydroxyphenylethylgruppe anstelle der p-Hydroxybenzylgruppe kaum zu einer weiteren Wirkungsabnahme führt.

Weiterführende Untersuchungen zeigten, daß eine para-ständige Anordnung der Aromaten in der Biphenylacetylgruppe (**90**, **91**, **92**) im Vergleich zur geminalen Anordnung zu einem drastischen Wirkungsabfall im Ca²⁺-Assay führt. So ist beispielsweise die Biphenyl-Verbindung **90** 200fach schwächer Y₁-antagonistisch wirksam als die entsprechende Verbindung **18** mit geminaler Anordnung der Phenylgruppen.

Die Substitution des CH-aciden Protons im Diarylteil durch eine Methylgruppe führt zur 2,2-Diphenylpropionylgruppe. Diese Strukturveränderung verursacht ebenfalls eine ausgeprägte Abnahme der Y₁-antagonistischen Wirkung – im Vergleich der IC₅₀-Werte um den Faktor 137 (**39** vs **18**) bzw. 50 (**42** vs **18**).

Noch deutlicher ist der Wirkungsabfall beim Einbau eines dritten Phenylrings (**93**, **94**) in Form der sterisch anspruchsvollen Triphenylacetylgruppe. Diese Strukturvariation führt im Extremfall zu inaktiven Substanzen (**93**).

Des weiteren wurde überprüft, ob eine Veränderung der Hydrophobizität im Diarylteil die Y₁-Aktivität beeinflusst. Dazu stellten AIGLSTORFER und UFFRECHT die entsprechenden mono- und disubstituierten N^α-Diphenylacetylargininamide **95**, **96**, **97** und **98**, **99**, **100** her [Aiglstorfer, 1999] und [Uffrecht, 1996]. Im Falle der monochlorierten Diphenylacetylargininamide **95**, **96**, **97** ergaben sich im Vergleich zu den

Referenzsubstanzen **18**, **102**, **103** nur geringfügige Aktivitätsverbesserungen. Eine 4,4'-Dichlorierung der Diphenylacetylgruppe **98**, **99**, **100** führt verglichen mit den monochlorierten Substanzen (**18**, **97**) zu einer Affinitätsabnahme oder zu keiner Veränderung der Y₁-antagonistischen Affinität (**96** vs **99**).

Überraschenderweise wird der Austausch eines Phenylrings in der Diphenylacetyl-Partialstruktur (**37**, **41**) gegen einen Cyclohexylring toleriert. Die Substanzen **37** und **41** sind verglichen mit der Referenzsubstanz **18** geringfügig (um den Faktor 1.5) stärkere Y₁-Antagonisten im Calciumassay.

Auf Strukturvariationen am C-Terminus der N^G-unsubstituierten Argininamide wurde in dieser Arbeit verzichtet. AIGLSTORFER hat eine Vielzahl von (R)-Argininamiden, die sich von BIBP 3226 ableiten, synthetisiert und dabei die N-(4-Hydroxybenzylamid)-Partialstruktur variiert. Unter anderem wurde die Benzylamid-Partialstruktur durch Integration in verschiedene Ringsysteme rigidisiert [Aiglstorfer, 1999]. In der Regel waren diese Strukturvariationen mit einer deutlichen Aktivitätsverminderung verbunden. Zum Vergleich sind Vertreter dieser Substanzgruppe in Tabelle 4-5 aufgeführt.

Alle bisherigen Untersuchungen im Falle der N^G-unsubstituierten Argininamide deuten darauf hin, dass mit der Diphenylacetyl-Partialstruktur sowohl bezüglich der Anordnung der Phenylringe als auch der Hydrophobizität das Optimum erreicht zu sein scheint. Ähnlich ist die Situation bezüglich der Strukturvariationen am C-Terminus: Mit der Benzylamid-Partialstruktur scheint der ideale Grundkörper gefunden zu sein. Allerdings zeigen Substanzen wie die ureidomethylsubstituierte Verbindung BIBO 3304, dass geeignete p-Substituenten zu einer Verstärkung der Y₁-antagonistischen Wirkung beitragen können.

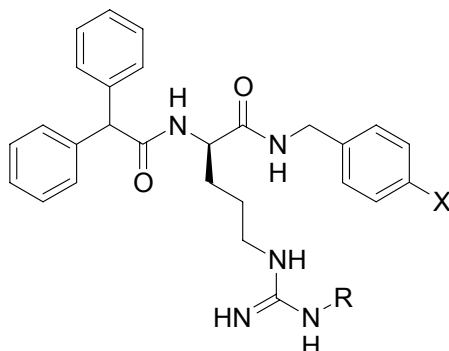
4.5.2 N^G-substituierte Argininamide

Durch Variationen am C- bzw. N-Terminus der N^G-unsubstituierten Argininamide sind keine wesentlichen Verbesserungen im Vergleich zu BIBP 3226 möglich [Aiglstorfer, 1999] und [Uffrecht, 1996]. Dagegen erwies sich das Guanidinsystem der Argininamide als eine pharmakophore Gruppe, die weitere Substituenten toleriert und sogar bei Einführung geeigneter Gruppen eine Affinitätssteigerung ermöglicht.

4.5.2.1 N^G -alkylsubstituierten Argininamide

Alkylierungen am Guanidin- N sind mit einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Verminderung der Y_1 -antagonistischen Aktivität im Calciumassay an HEL-Zellen verbunden (Tabelle 4-6).

Tabelle 4-6: Y_1 -Antagonistische Wirkung von N^G -alkylsubstituierten Argininamiden im Ca^{2+} -Assay an HEL-Zellen



Nr.	X	R	Y_1 -Antagonismus ^a IC ₅₀ [nM]
BIBP 3226^b	OH	-H	17
104^c		-CH ₃	36
27		-CH ₂ CH ₂ CH ₃	171
105^c		-CH ₂ CH ₂ CH ₂ Ph	136
106^c		-CH ₂ CH ₂ CH ₂ Ph	381
107^c	H	-CH ₂ CH ₂ CHPh ₂	24400
108^c		-CH ₂ (CH ₂) ₁₄ CH ₃	100000
109^c		-CH ₃	300

^aberechnet aus der Hemmung des durch 10 nM NPY induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs; der Standardfehler des Mittelwerts (SEM, standard error of the mean) der zur Berechnung der IC₅₀-Werte verwendeten mittleren prozentualen Hemmwerte P beträgt < 10 %; verwendete Antagonistenkonzentrationen: 100, 50, 10, 1, 0.1 und 0.01 μ M; Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. ^b[Rudolf et al., 1994]. ^c[Hutzler, 2001]

Die N^G -alkylsubstituierten Verbindungen **104**, **27**, **105** weisen zwar im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung BIBP 3226 um den Faktor 2-10 höhere IC₅₀-Werte auf, sind aber noch ohne Ausnahme im submikromolaren Konzentrationsbereich wirksam. Da die

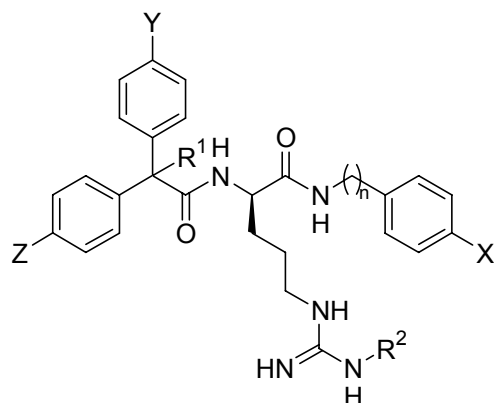
Substitution der Guanidingruppe mit Alkylresten keine Steigerung der Y_1 -antagonistischen Wirkung verursacht, wurde in dieser Arbeit nur eine Verbindung (**27**) dieser Substanzklasse exemplarisch synthetisiert. Anscheinend wird bei der Bindung an den Rezeptor ein gewisser Bulk toleriert. Die Verbindungen **107** und **109** zeigen, dass ein Substituent mit der Größe einer 3-Phenylpropylgruppe bei der Bindung an den Rezeptor anscheinend noch toleriert wird (**105**, **106**), während die sperrigere 3,3-Diphenylpropyl-Gruppe im Gegensatz zu einer 3-Phenylpropyl-Gruppe einen Wirkungsabfall um den Faktor 640 verursacht (**106** vs. **107**). Auch der sperrige n-Hexadecylrest führt zu einer dramatischen Verschlechterung des Y_1 -antagonistischen Effekts. Man kann aus den IC_{50} -Werten der alkylsubstituierten Argininamide (Tabelle 4-6) schlussfolgern, dass, vorausgesetzt diese Substanzen binden analog zu BIBP 3226 an den Y_1 -Rezeptor, im Bereich der Wechselwirkungsstelle des Guanidinsystems noch Raum ist, den man durch Substituenten besetzen kann.

4.5.2.2 N^G -Ester- und N^G -acetylsubstituierte Argininamide

HUTZLER gelang es durch Substitution des Guanidinsystems mit Estergruppen eine Reihe von Verbindungen zu synthetisieren, die die Wirkung der Stammverbindung BIBP 3226 im funktionellen Test bis etwa um den Faktor 18 übertreffen. Im Radioligand-Bindungsassay erreichen die Substanzen ca 100fach höhere Y_1 -Rezeptor-Affinität als BIBP 3226. Es handelt sich dabei um die stärksten bislang bekannten Y_1 -Rezeptorantagonisten. Mit den in dieser Arbeit durch Festphasensynthese dargestellten N^G -substituierten Argininamiden sollten drei Ziele erreicht werden.

Vorrangiges Ziel war es, die Klasse der an unserem Lehrstuhl entwickelten hochpotenten Y_1 -Antagonisten durch Festphasensynthese zugänglich zu machen. Da aus dieser Substanzklasse erst relativ wenige Verbindungen dargestellt wurden, sollte der Einfluss elektronenziehender Reste am Guanidinsystem auf die Y_1 -antagonistische Wirkung weiter untersucht und die Bandbreite zusätzlich möglicher Strukturveränderungen am C- bzw. N-Terminus geprüft werden. Die Y_1 -antagonistischen Aktivitäten im Ca^{2+} -Assay (HEL-Zellen) sind in Tabelle 4-7 vergleichend dargestellt.

Tabelle 4-7: Y₁-antagonistische Wirkung von N^G-ester- und N^G-acylsubstituierten Argininamiden im Ca²⁺-Assay an HEL-Zellen



Nr.	Y	Z	X	R ¹	R ²	n	Y ₁ -Antagonismus ^a IC ₅₀ [nM]
BIBP 3226 ^b					H		17
110 ^c					CO ₂ Me		14.2
111 ^c	H	H			CO ₂ Et		2.5
112 ^c			OH		CO ₂ CH ₂ Ph		0.98
113 ^c				H	CO-CH ₃	1	45.4
114 ^c	Cl	Cl					3.3
115 ^c		F			CO ₂ Et		0.91
116 ^c			OCH ₃				250
117 ^c			OH		CO-(CH ₂) ₂ -NH-Z		24.6
57			CH ₂ OH		CO-C(CH ₃) ₃		472
59	H	H		CH ₃	CO ₂ CH ₂ Ph		234
60			OH		CO ₂ CH ₃	2	9700
61					CO ₂ Et		1600
62					CO ₂ CH ₃		75.3
63			H		CO ₂ Et		38.0
64					CO ₂ CH ₂ Ph		18.9
65				H	CO ₂ CH ₃	1	12
66	Cl	Cl	CH ₂ OH		CO ₂ Et		3.4
67					CO ₂ CH ₂ Ph		2.3
68					CO-C(CH ₃) ₃		34.8

^aberechnet aus der Hemmung des durch 10 nM NPY induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs; der Standardfehler des Mittelwerts (SEM, standard error of the mean) der zur Berechnung der IC_{50} -Werte verwendeten mittleren prozentualen Hemmwerte P beträgt < 10 %; verwendete Antagonistenkonzentrationen: 10, 1, 0.5, 0.1, 0.01 und 0.001 μ M; Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. ^b[Rudolf et al., 1994]. ^c[Hutzler, 2001]

Die Substitution des Guanidinsystems von BIBP 3226 mit Alkoxycarbonylgruppen wie Methoxycarbonyl-, Ethoxycarbonyl- oder Benzyloxycarbonylgruppen führt jeweils zu hochpotenten NPY Y_1 -Rezeptorantagonisten (**110-112**). Das N^G -benzyloxycarbonylsubstituierte Argininamid (**112**) ist im funktionellen Assay 17-mal potenter, das N^G -ethoxycarbonylsubstituierte Argininamid **111** ist siebenmal potenter als BIBP 3226.

Tauscht man bei diesen Verbindungen die (4-Hydroxyphenyl)methyl-Gruppe gegen eine unsubstituierte Phenylmethyl-Gruppe aus (**62-64**) fällt die Wirkung auf 1/5 (**110** vs **62**), 1/15 (**111** vs **63**) und 1/20 (**112** vs **64**) der Aktivität der jeweiligen Referenzsubstanz ab. Bei Blockierung der phenolischen OH-Gruppe durch eine Methylethergruppe wurde sogar ein Wirkungsabfall um den Faktor 100 (**111** vs **116**) beobachtet [Hutzler, 2001].

Ersetzt man im Diarylteil die Diphenylacetyl- durch eine 2,2-Diphenylpropionylgruppe bei gleichzeitiger Verlängerung der (4-Hydroxyphenyl)methyl-Gruppe zur (4-Hydroxyphenyl)ethylgruppe (**59-61**) so wird der Affinitätsverlust noch deutlicher. Die IC_{50} -Werte sind 680 mal (**60** vs **110**), 640-mal (**61** vs **111**) und 240-mal (**59** vs **112**) höher als die der von BIBP 3226 abgeleiteten Verbindungen.

Auch die pivaloylsubstituierte Verbindung **57**, welche ebenfalls die 2,2-Diphenylpropionylgruppe enthält, weist nur noch mäßige Affinität auf. Dieser Verlust der antagonistischen Wirkung beim Einsatz sterisch anspruchsvoller Diarylgruppen bzw. bei Homologen der 4-Hydroxybenzylamide ist nicht überraschend. Die gleichen Auswirkungen auf die Affinität konnte bei den N^G -unsubstituierten Argininamiden beobachtet werden.

Das Einführen von Halogensubstituenten an den Phenylringen der Argininamide wird im funktionellen Assay ebenfalls toleriert. Es resultieren daraus hochpotente Substanzen **114**, **115**.

Nicht zu erwarten war der Befund, dass der Austausch der phenolischen OH-Gruppe gegen eine CH_2OH -Gruppe keinerlei negative Auswirkungen auf das Bindungsverhalten hat. Die Antagonisten **66** und **114** weisen nahezu die gleiche Wirkung auf. **67** bindet im Vergleich zu **112** etwas schlechter, wobei **112** keine Halogensubstituenten trägt. **65** und die entsprechende nichthalogenierte Verbindung **110** besitzen vergleichbare Y_1 -antagonistische Aktivitäten. Die pivaloylsubstituierte Verbindung **68** zeigt wiederum das erwartete schlechtere Bindungsverhalten.

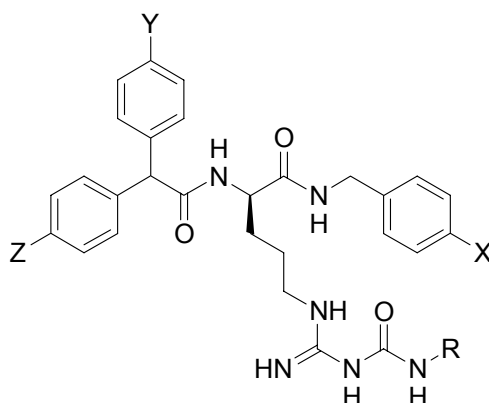
Die Gruppe der estersubstituierten Argininamide umfasst eine ganze Reihe hochpotenter NPY Y_1 -Rezeptorantagonisten. Durch die Substitution des Guanidinsystems mit

Estergruppen gelangt man zu Verbindungen, die die Wirkung der Stammverbindung BIBP 3226 im funktionellen Test bis etwa um den Faktor 18 übertreffen.

4.5.2.3 *N*^G-Carbamoylsubstituierte Argininamide

Neben Ester- und Acylgruppen haben sich auch substituierte Carbamoylreste am Guanidinsystem von BIBP 3226 als aktivitätssteigernd erwiesen [Hutzler, 2001]. Die Verbindungen mit Ethyl-, Ethoxycarbonylmethyl-, -ethyl oder -pentyl-Rest an der Carbamoylgruppe erreichen im Ca²⁺-Assay teilweise IC₅₀-Werte im subnanomolaren Bereich (vgl. Tabelle 4-8: **122**, **123**, **124**, **120**, **121**)

Tabelle 4-8: Y₁-antagonistische Wirkung von *N*^G-Carbamoylsubstituierte Argininamide im Ca²⁺-Assay an HEL-Zellen



Nr.	Y	Z	X	R	Y ₁ -Antagonismus ^a IC ₅₀ [nM]
BIBP 3226^b	H	H	OH	H	17
56			H	-CH ₂ (CH ₂) ₄ CO ₂ Et	2.4
118^c			OH	-CH ₂ CH ₃	1.18
119^c				-CH ₂ CO ₂ Et	1.65
120^c				-CH ₂ CH ₂ CO ₂ Et	0.89
121^c				-CH ₂ (CH ₂) ₄ CO ₂ Et	0.64
122^c			H	-CH ₂ CH ₃	4.4
123^c	Cl	Cl	OH	-CH ₂ CO ₂ Et	0.597
124^c	H	F		-CH ₂ CO ₂ Et	0.86

^aberechnet aus der Hemmung des durch 10 nM NPY induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiegs; der Standardfehler des Mittelwerts (SEM, standard error of the mean) der zur Berechnung der IC₅₀-Werte verwendeten mittleren prozentualen Hemmwerte *P* beträgt < 10 %; verwendete Antagonistenkonzentrationen: 10, 1, 0.5, 0.1, 0.01 0.001 und 0.0005 μM; Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.
^b[Rudolf et al., 1994]. ^c[Hutzler, 2001]

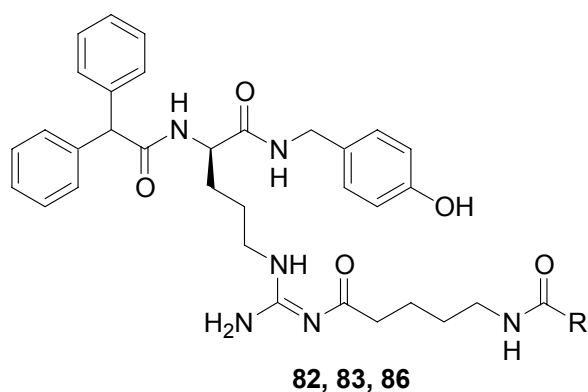
Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus dieser Substanzklasse exemplarisch die Verbindung **56** an der Festphase synthetisiert. Bei dieser Verbindungsklasse scheint das Substitutionsmuster weitgehend optimiert zu sein. Der Verzicht auf die phenolische OH-Gruppe führt erwartungsgemäß zu einer Abnahme der Y₁-antagonistischen Wirkung um den Faktor 4 (**58** vs **121**).

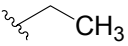
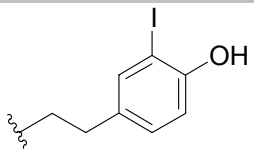
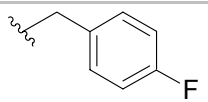
Bei den N^G-carbamoylsubstituierten Argininamiden handelt es sich um eine Reihe sehr stark wirksamer NPY Y₁ Rezeptorantagonisten. So ist z. B. das dichlorsubstituierte Argininamid **123** 28-mal, die monofluorsubstituierte Verbindung **124** 29-mal potenter als die Referenzverbindung BIBP 3226.

4.5.3 Molecular Modeling-Untersuchungen zur Y₁-Rezeptorbindung des Argininamids **82**

Aufgrund der hohen Y₁-Rezeptor-Affinität der N^G-akzeptorsubstituierten Argininamide, die K_i-Werte im niedrigen picomolaren Bereich erreichen, erscheint diese Stoffklasse besonders interessant zur Herstellung von Radioliganden. Da es sich gezeigt hat, dass selbst relativ große N^G-Substituenten toleriert werden, ohne dass die Y₁-antagonistische Aktivität verloren geht, bestand eine Strategie (neben der Tritierung durch reduktive Dehalogenierung) in der Einführung einer Aminoalkanoylgruppe. Die Aminogruppe lässt sich mit käuflichen Markierungsreagenzien wie BOLTON-HUNTER-Reagenz, ³H-Propionsäure-derivaten oder ¹⁹F-markiertem 4-Fluorbenzoylchlorid acylieren.

Tabelle 4-9: Y₁-antagonistische Wirkung von N^G-carbonylsubstituierten Argininamiden im Ca²⁺-Assay an HEL-Zellen



Nr.	R	Y ₁ -Antagonismus ^a IC ₅₀ [nM]
82		2.9
83		9.7
86		7.1

^aberechnet aus der Hemmung des durch 10 nM NPY induzierten [Ca²⁺]_i-Anstiegs; der Standardfehler des Mittelwerts (SEM, standard error of the mean) der zur Berechnung der IC₅₀-Werte verwendeten mittleren prozentualen Hemmwerte *P* beträgt < 10 %; verwendete Antagonistenkonzentrationen: 1, 0.5, 0.1, 0.01 und 0.001 μM; Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Ob bei *N*^G-substituierten Argininamiden relativ große *N*^G-Substituenten toleriert werden hängt anscheinend wesentlich von der Länge der Kohlenstoffkette (Spacer) ab, die die terminale Gruppierung mit dem Guanidinsystem verbindet. Im vergleichbaren Argininamid **117** wird der sperrige Substituent (Z-Schutzgruppe) lediglich durch eine C-2-Kette vom Guanidin getrennt. Bei den Verbindungen **82**, **83** und **86** wurde dagegen eine C-4-Kette verwendet. Die Y₁-antagonistische Wirkung konnte auf diese Weise um den Faktor 2.5 (**83** vs. **117**), 3.5 (**86** vs. **117**) bzw. 8.5 (**82** vs. **117**) gesteigert werden.

Mit Hilfe von Molecular Modelling-Studien können mögliche Gründe für die fast zehnmal höhere Y₁-antagonistische Wirkung von **82** im Vergleich zu BIBP 3226 aufgezeigt werden. Durch Bindungsstudien an NPY Y₁-Rezeptormutanten wurden für die Wechselwirkung des Y₁-Rezeptors mit NPY und BIBP 3226 essentielle Aminosäuren identifiziert. SAUTEL [Sautel et al., 1996] und PING DU [Ping Du et al., 1998] leiteten daraus zwei unterschiedliche Modelle für die Interaktion von BIBP 3226 mit dem humanen Y₁-Rezeptor ab. Es handelt sich dabei um Modelle, die BIBP 3226 in seiner vermutlich aktiven Bindungskonformation am Y₁-Rezeptor zeigen. Diese Untersuchungen basieren allerdings auf der Kristallstruktur von bakteriellem Rhodopsin. Mittlerweile gelang es DOVE (Dove, 2002), ebenfalls aufgrund der oben genannten Bindungsstudien an NPY Y₁-Rezeptormutanten, ein verbessertes Modell für die Wechselwirkung von BIBP 3226 mit dem humanen Y₁-Rezeptor aufzustellen. Dieses Modell basiert, im Gegensatz zu den Vorgängermodellen, auf der Kristallstruktur von bovinem Rhodopsin [Palczewski et al., 2000].

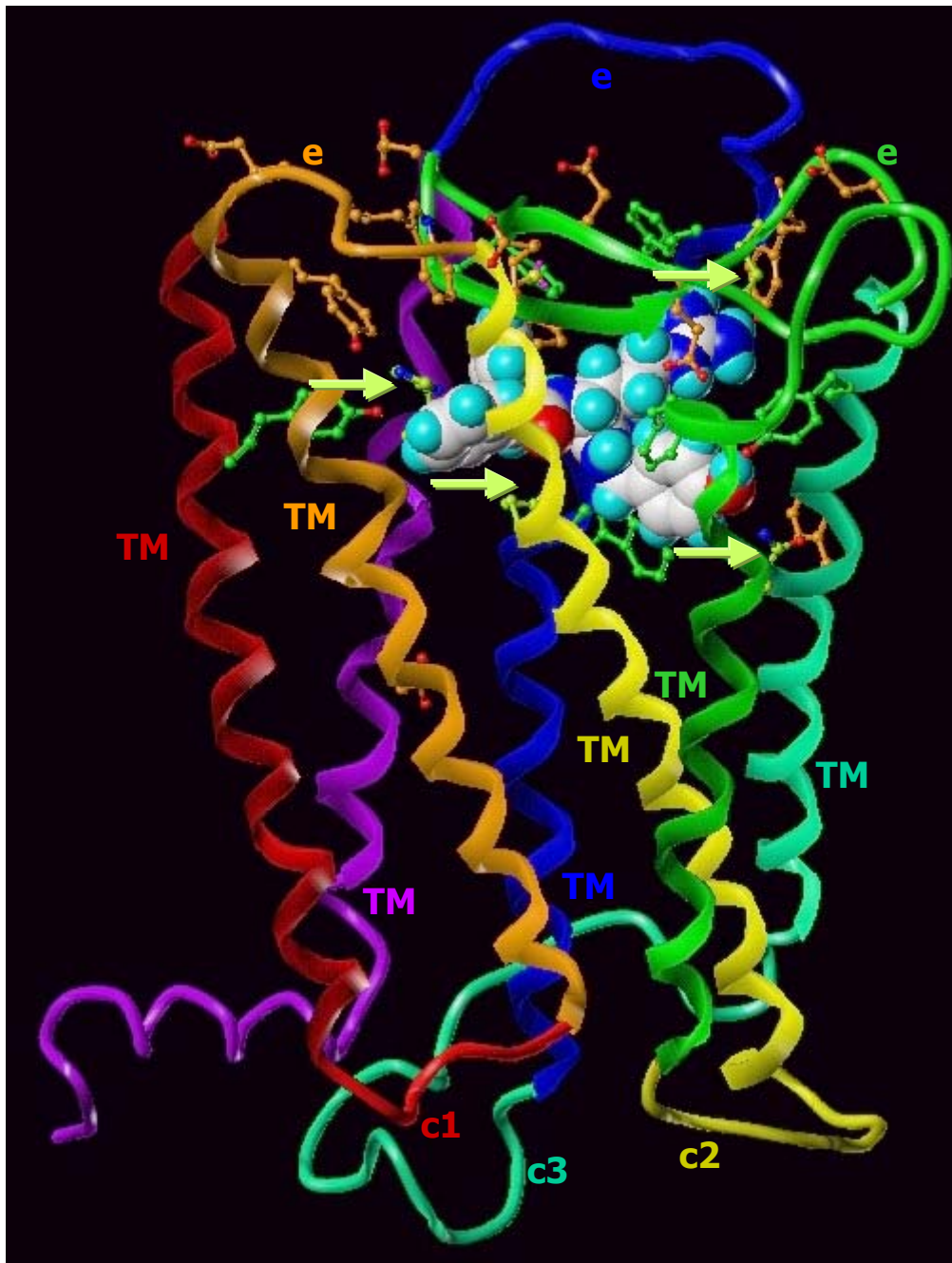


Abbildung 4-1: BIBP 3226 in seiner vermutlich aktiven Bindungskonformation am humanen Y_1 -Rezeptor (basierend auf der Kristallstruktur von bovinem Rhodopsin). Die für die Wechselwirkung mit NPY bzw. BIBP 3226 entscheidenden Aminosäuren des Rezeptors sind orange bzw. grün eingefärbt. Die gelben Pfeile markieren Bindungsstellen von NPY und BIBP 3226

Aufgrund des Modells von DOVE kann man folgende Wechselwirkungen zwischen BIBP 3226 bzw. **82** und dem humanen Y₁-Rezeptor postulieren.

Neben verschiedenen π - π -Wechselwirkungen im Bereich der transmembranären Helices TM4 – TM7 (durch Trp²⁷⁶, His³⁰⁶, Phe²⁸², Phe³⁰² und Phe²⁸⁶) sind zwei Wasserstoffbrückenbindungen von zentraler Bedeutung: nämlich zwischen der OH-Funktion der Benzylamingruppe und Gln²¹⁹ bzw. Tyr²¹¹ und den beiden Carbonylfunktionen des peptidartigen Rückgrats mit Asn²⁸³ und Gln¹²⁰. Hinzu kommt eine ionische Wechselwirkung der Guanidinogruppe mit Asp²⁸⁷ in der dritten extrazellulären Schleife (Abbildung 4-2).

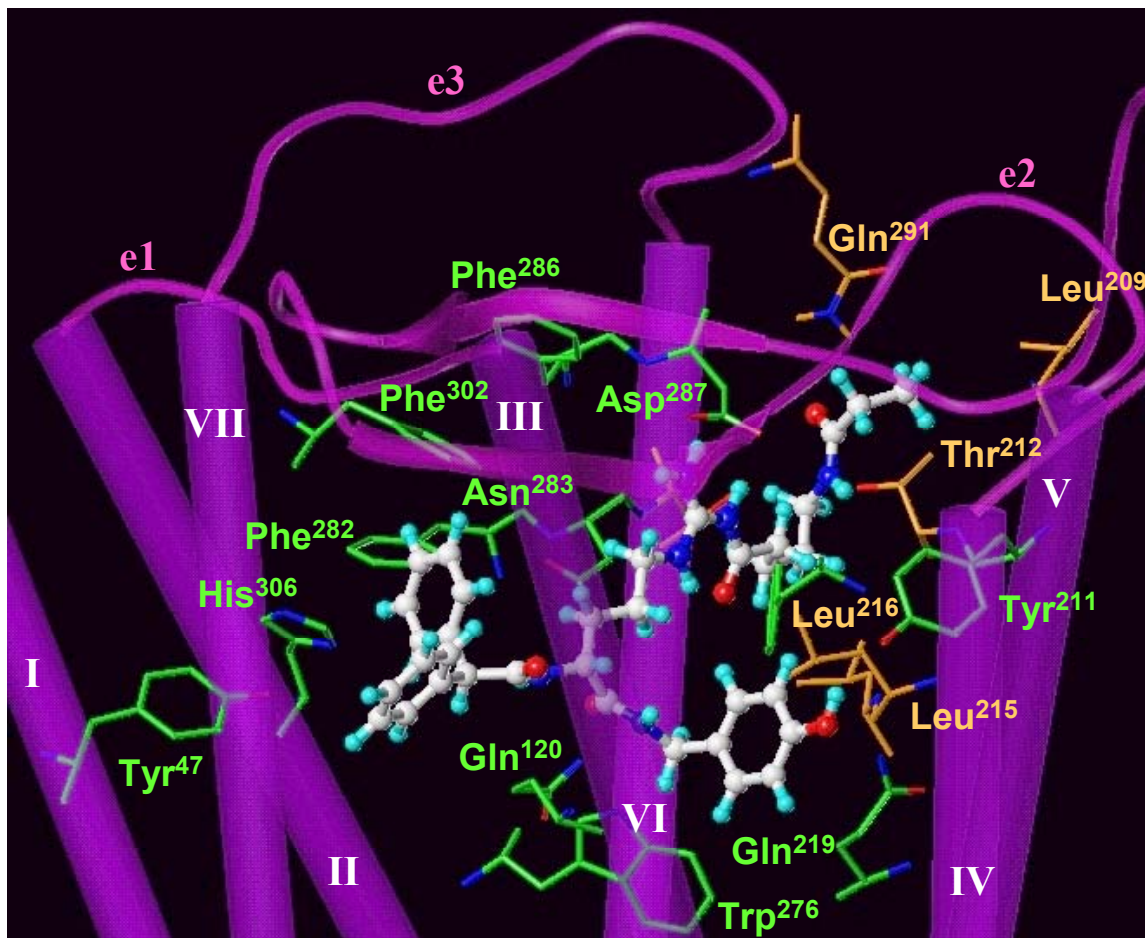


Abbildung 4-2: Mögliche Bindung von **82** an den humanen Y₁-Rezeptor auf Basis des Modells für BIBP 3226 [Dove, 2002]. Die für die Wechselwirkung mit BIBP 3226 entscheidenden Aminosäuren sind grün, Aminosäuren, die zusätzliche Wechselwirkungen mit **82** eingehen können, sind orange eingefärbt.

Da das N^G -carbonylsubstituierte Argininamid **82** im funktionellen Test (Ca^{2+} -Assay) und im Y_1 -Radioligand-Bindungsassay potenter als die Stammverbindung BIBP 3226 ist, kann man davon ausgehen, dass diese Verbindung – ansonst gleiches Bindungsverhalten vorausgesetzt – mehr Wechselwirkungen mit dem Y_1 -Rezeptor eingeht als BIBP 3226. Um diese These zu überprüfen, wurde die Verbindung **82** analog zu BIBP 3226 in das vorher beschriebene Y_1 -Rezeptormodell eingepasst (Abbildung 4-1, Abbildung 4-2). Bei dieser Vorgehensweise kann man nach Aminosäuren suchen, die entsprechend ihrer Lokalisation im Y_1 -Rezeptor in der Lage sein könnten, mit den zusätzlich zu BIBP 3226 in **82** vorhandenen funktionellen Gruppen in Wechselwirkung zu treten.

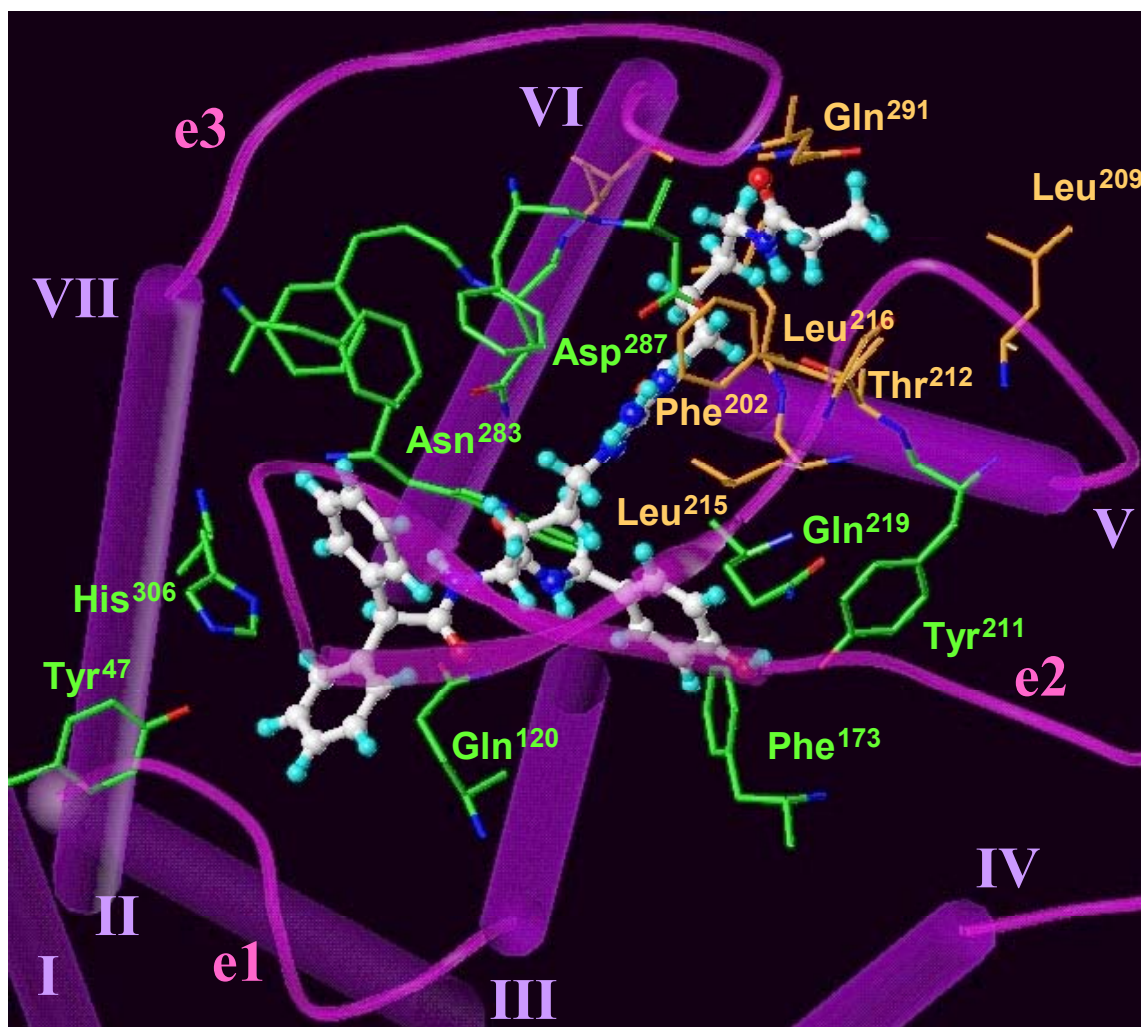


Abbildung 4-3: Mögliche Bindung von **82** an den humanen Y_1 -Rezeptor auf Basis des Modells für BIBP 3226 [Dove, 2002]. Die für die Wechselwirkung mit BIBP 3226 entscheidenden Aminosäuren sind grün, Aminosäuren, die zusätzliche Wechselwirkungen mit **82** eingehen können, sind orange eingefärbt.

Als potentielle weitere Wechselwirkungspartner kommen für **82** Leu²¹⁶, Leu²¹⁵ und Phe²⁰² in Frage. Diese drei Aminosäuren könnten mit der in **82** in Vergleich zu BIBP 3226 zusätzlich vorhandenen C-4-Kette hydrophobe Wechselwirkungen eingehen. Außerdem können zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden, nämlich zwischen dem Amid-NH und Thr²¹² und der Carbonylgruppe und Glu²¹⁹. Darüber hinaus sind weitere hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Propylrest und Leu²⁰⁹ möglich.

Das hier gezeigte Bindungsmodell von **82** an den Y₁-Rezeptor beruht bisher allerdings nur auf Molecular Modelling-Studien und Plausibilitätsbetrachtungen. Dieses Modell soll jedoch in weiterführenden Arbeiten durch Bindungsexperimente mit **82** an entsprechenden NPY Y₁-Rezeptormutanten überprüft werden.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung von Methoden zur Festphasensynthese, der pharmakologischen Wirkung und den Struktur-Aktivitätsbeziehungen von Neuropeptid Y (NPY) Y_1 -Rezeptorantagonisten mit Argininamid-Partialstruktur, die sich von der Substanz BIBP 3226 ((*R*)- N^α -Diphenylacetylarginin-4-hydroxybenzylamid) ableiten. Im Rahmen eines am Lehrstuhl Pharmazeutische Chemie II der Universität Regensburg bearbeiteten Projektes, das sich mit nichtpeptidischen NPY-Rezeptorliganden beschäftigt, haben vorangegangene umfangreiche Molekülvariationen und Struktur-Wirkungs-Analysen u. a. zu Argininamiden geführt, die am Guanidin-*N* mit elektronenziehenden Gruppen substituiert sind [Hutzler, 2001]. Diese „ N^G -akzeptorsubstituierten“ Argininamide stellen hochpotente (teilweise im Bereich 10-50 pM wirksame) selektive Y_1 -Rezeptorantagonisten dar.

Vorrangiges Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer Methode, die es erlaubt, N^G -substituierte- und N^G -unsubstituierte Argininamide an polymeren Trägern zu synthetisieren, um dadurch eine größere Bandbreite an Strukturvariationen zu erzielen und gleichzeitig den Aufwand für die Isolierung und Reinigung der Produkte zu minimieren. Da die Argininamide an drei Positionen (α -Amino-, α -Carboxyl- und Guanidino-Funktion) optimiert werden können (Abbildung 5-1), wurde im Unterschied zur typischen Vorgehensweise in der Festphasen-Peptidsynthese eine Fixierung des Guanidinsystems am polymeren Träger angestrebt. Dabei konnten die zur Darstellung der NPY Y_1 -Antagonisten in Lösung benötigten Reaktionen Schritt für Schritt auf die Festphase übertragen werden. Neben den eigentlichen Zielverbindungen mit Wirkung an NPY-Rezeptoren wurden auch einige Peptide hergestellt, um die breitere Anwendbarkeit der neu entwickelten Methode zu prüfen.

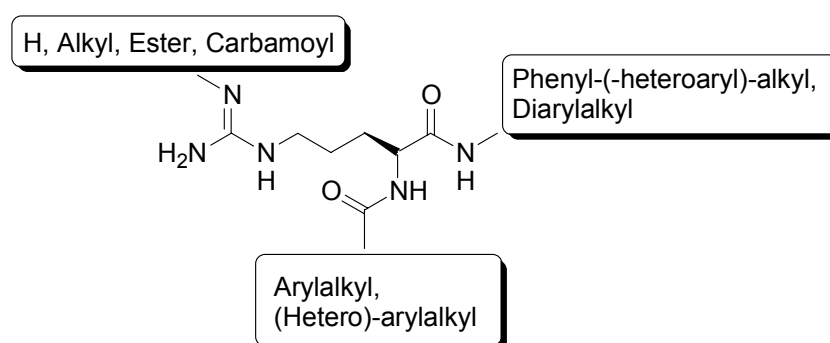


Abbildung 5-1:

Die pharmakologische Untersuchung der hergestellten Y_1 -Antagonisten erfolgte an verschiedenen In-vitro-Modellen. Zusätzlich wurde mit der Herstellung potentiell radioaktiv markierbarer Y_1 -Rezeptorantagonisten auf der Basis N^G -acylierter Argininamide ein zweites,

für die Entwicklung und pharmakologische Charakterisierung von NPY-Rezeptorliganden wichtiges Teilprojekt bearbeitet.

Synthese

Zur Festphasensynthese der Argininamid-Derivate wurden drei verschiedene polymere Trägermaterialien (Merrifield-Harz, Rink Amid-Harz und Wang-Harz) verwendet. Am erfolgreichsten war dabei die Synthese der Zielverbindungen am Wang-Harz. Zur Herstellung der polymergebundenen Ausgangsverbindungen zur Synthese der N^G -unsubstituierten Argininamide sowie der Tri- und Pentapeptide wird das 4-Nitrophenylcarbonyl Wang-Harz mit S-Methylisothioharnstoff und anschließend mit Di-*tert*-butyldicarbonat zum *tert*-Butoxycarbonylgeschützten S-Methylisothioharnstoff umgesetzt. Die Synthese der polymergebundenen Bausteine zur Herstellung N^G -akzeptorsubstituierter Argininamide erfolgt analog durch die Behandlung des Wang-Harzes mit entsprechenden substituierten S-Methylisothioharnstoffen, die durch *N*-Acylierung von S-Methylisothioharnstoff mit Säurechloriden oder Isocyanaten zugänglich sind. Als Linker und Synthesebaustein zugleich fungiert der (*R*)- N^α -Fmoc-ornithin-9-fluorenylmethylester. Diese Ankerverbindung wird ausgehend von käuflichem (*R*)- N^α -Fmoc- N^δ -Boc-ornithin unter Einsatz der aus der Peptidsynthese bekannten Schutzgruppentechnik hergestellt. Die Einführung des Linkers erfolgt durch Aminolyse der polymergebundenen S-Methylisothioharnstoffkomponenten. Zur Acylierung bzw. Amidierung der polymergebundenen N^G -substituierten Arginine ist es notwendig, die Fmoc- und die Fm-Schutzgruppe zu entfernen. Die nun an den Positionen N^α und C^α ungeschützt vorliegenden polymergebundenen Arginine werden mit *N*-Hydroxysuccinimidestern von Diarylalkansäuren, Aminosäuren und Dipeptiden am N^α acyliert. Die anschließende Amidierung mit Aminen, Aminosäuren und Dipeptiden erfolgt in situ unter Verwendung von TBTU als Kupplungsreagenz. Die Zielverbindungen können durch Acidolyse (beispielsweise mit 95 %iger Trifluoressigsäure) vom Polymer abgespalten werden und in relativ guten Ausbeuten (30 – 40 %, bezogen auf die Menge und Beladung des eingesetzten Harzes) isoliert werden.

Bei der Synthese der N^G -estersubstituierten Argininamide am Rink Amid-Harz wird nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe des polymeren Ausgangsmaterials mit Piperidin zunächst durch Umsetzung mit Fluorenylmethoxycarbonylisothiocyanat der polymergebundene Fmocgeschützte Thioharnstoff hergestellt. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird der polymergebundene Thioharnstoff mit Methyljodid S-methyliert, und danach mit einem Säurechlorid *N*-acyliert. Die so synthetisierten polymergebundenen S-Methylisothioharnstoffe können analog zu der oben skizzierten Vorgehensweise für die entsprechenden polymeren Verbindungen am Wang Harz mit (*R*)- N^α -Fmoc-ornithin-9-fluorenylmethylester weiter umgesetzt

werden. Alle nachfolgenden Reaktionsschritte können vom Wang-Harz übernommen werden. Das auf diesem Weg dargestellte Argininamid konnte in einer Ausbeute von 18 %, bezogen auf die Menge und Beladung des eingesetzten Harzes, isoliert werden. Zur Darstellung N^G -alkylsubstituierter Argininamide werden Alkylisothiocyanate mit Fmoc-entschütztem Rink Amid-Harz zu polymergebundenen Alkylthioharnstoffen umgesetzt und diese nach S-Methylierung ebenfalls mit (*R*)- N^α -Fmoc-ornithin-9-fluorenylmethylester aminolysiert. Auch hier weicht die weitere Reaktionsführung nicht von der am Wang-Harz ab. Auf diesem Weg wurden Ausbeuten an N^G -alkylsubstituierten Argininamiden von bis zu 37 % erzielt.

Bei der Verwendung von Merrifield-Harz ist dagegen eine Variation des Linkers, der Schutzgruppenstrategie und der Abspaltbedingungen notwendig. Als Ankergruppe wird die (*R*)-2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-5-hydroxypentansäure, hergestellt aus (*R*)-Glutaminsäure, eingesetzt. Die Schutzgruppen (Boc, *t*-Bu) werden durch 95%ige Trifluoressigsäure entfernt. Danach erfolgt völlig analog zur Reaktionssequenz am Wang-Harz die Acylierung mit *N*-Hydroxysuccinimidestern und die Amidierung mit Benzylaminen nach Aktivierung der Carboxylgruppe mit TBTU. Die Argininamide werden mit methanolischer Ammoniaklösung vom Harz abgespalten. Die Ausbeute des am Merrifield-Harz dargestellten Argininamids lag jedoch bei lediglich 4 %.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ausbeuten bei der Synthese der Argininamid-derivate am Wang-Harz höher sind als bei der Synthese am Rink Amid-Harz (ca. Faktor 2) und viel besser als bei Verwendung von Merrifield-Harz (ca. Faktor 10). Hier hat offenbar die Tatsache, dass bei der Reaktionsführung am Wang-Harz die direkte Einwirkung von Säurechloriden bzw. Chlorameisensäureestern vermieden wird, sowie die Stabilität des Wang-Harzes gegenüber Aminen einen positiven Einfluss auf die Ausbeute. Somit ist die Syntheseroute über das Wang-Harz, verglichen mit den Reaktionen am Rink Amid- bzw. Merrifield-Harz, nicht nur kürzer, sondern auch chemisch effizienter.

Die stereochemische Reinheit der durch Festphasensynthese hergestellten Substanzen wurde exemplarisch an einigen Substanzen nach Hydrolyse und Derivatisierung des abgespaltenen Arginins mit *o*-Phthaldialdehyd und *N*-Acetyl-(*L*)-Cystein zu chiralen Isoindolen mittels HPLC überprüft. Damit konnte gezeigt werden, dass im Verlauf der Synthese keine Racemisierung im (*R*)-Argininamid-Teil eingetreten war.

Pharmakologie und Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Die synthetisierten N^G -substituierten und N^G -unsubstituierten Argininamide wurden auf Y_1 -Antagonismus an HEL-Zellen, d. h. Hemmung der NPY-induzierten Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, untersucht. Von einigen Verbindungen wurden zudem vergleichend in Radioligandbindungsstudien mit [3H]Propionyl-pNPY die Affinitäten zu Y_1 -Rezeptoren (SK-N-MC-Zellen), Y_2 -Rezeptoren (SMS-KAN-Zellmembranen) und Y_5 -Rezeptoren (Y_5 -transfizierte HEC-1B-Zellen) untersucht. Für wenige ausgewählte Verbindungen wurde der Y_1 -Antagonismus auch anhand des Einflusses auf die NPY-vermittelte Hemmung der forskolinstimulierten Adenylylcyclase bestimmt (cAMP-Assay).

Bei den N^G -unsubstituierten Argininamiden konnte wie vermutet keine Steigerung der Wirkstärke im Vergleich zu BIBP 3226 erreicht werden. Tauscht man die phenolische OH-Gruppe der 4-Hydroxybenzylamidgruppe gegen Wasserstoff oder Fluor aus, bzw. blockiert man die OH-Gruppe durch einen Methylether, so führt dies zu sechs- bis zehnfach schwächer wirkenden Y_1 -Antagonisten als BIBP 3226 [IC_{50} (**18**) = 110 nM, IC_{50} (**38**) = 187 nM; IC_{50} von BIBP 3226: 17 nM]. Ersetzt man die N^α -Diphenylacetyl- gegen 2,2- oder 3,3-Diphenylpropionylsubstituenten, so verschlechtert sich die Y_1 -antagonistische Aktivität um den Faktor 80 (**38** vs **39**) bzw. 5 (**38** vs **40**). Dagegen verbessert der Austausch eines Phenylrings der N^α -Diphenylacetylgruppe gegen einen Cyclohexylring geringfügig die Y_1 -antagonistische Aktivität [IC_{50} (**37**) = 77 nM, IC_{50} (**38**) = 187 nM].

Die wichtigste Erkenntnis aus den Struktur-Wirkungs-Beziehungen der neu hergestellten N^G -substituierten Argininamide war die Tatsache, dass der Austausch der 4-Hydroxygruppe des Benzylrestes gegen eine Hydroxymethylgruppe bei gleichzeitiger Einführung von Halogensubstituenten an den Phenylringen der N^α -(Diphenylacetyl)argininamide und Substitution des Guanidinsystems der Argininamide mit Estergruppen zu einer Serie von hochpotenten Y_1 -Antagonisten führt, die die Wirkstärke der Referenzsubstanz BIBP 3226 im funktionellen Calcium-Assay um den Faktor 1.5 bis 7.5 übertreffen. Potenteste Vertreter dieser Klasse waren die N^G -estersubstituierten Verbindungen **67** (Benzylester) [IC_{50} (**67**) = 2.3 nM] und **66** (Ethylester) [IC_{50} (**66**) = 3.4 nM].

In vergleichenden Radioligandbindungsstudien an Y_1 -, Y_2 - und Y_5 -Rezeptoren erwiesen sich die ausgewählten N^G -acylierten Argininamide **82**, **83** und **86**, die im Rahmen der Untersuchungen zur Herstellung von Radioliganden für Y_1 -Rezeptoren synthetisiert wurden, als Y_1 -selektiv.

Untersuchungen zur Herstellung eines Radioliganden für Y₁-Rezeptoren

Aufgrund der hohen Y₁-Rezeptor-Affinität der N^G-acylsubstituierten Argininamide, die teilweise K_i-Werte im niedrigen picomolaren Bereich erreichen, scheint diese Stoffklasse besonders interessant zur Herstellung von Radioliganden. Da es sich gezeigt hat, dass selbst relativ große N^G-Substituenten toleriert werden, ohne dass die Y₁-antagonistische Aktivität verloren geht, besteht die Hoffnung, auf der Basis dieser Verbindungen zu potenten nicht-peptidischen Y₁-Rezeptor-selektiven Radioliganden zu gelangen.

Zu diesem Zweck wurde ein N^G-acyliertes Argininamid synthetisiert, das – über einen Spacer verbrückt – terminal eine freie Aminogruppe trägt. Die Aminfunktion wurde mit „kaltem“ BOLTON-HUNTER Reagenz bzw. mit Propionsäuresuccinimidylester acyliert. Diese Argininamide weisen im Ca²⁺-Assay IC₅₀-Werte von 9.7 nM (**83**) bzw. 2.9 nM (**82**) auf. Sie sind damit ca. zweimal (**83** vs **BIBP 3226**) bzw. sechsmal (**82** vs **BIBP 3226**) stärker wirksam als die Referenzsubstanz BIBP 3226.

Für das N^G-[5-(Propanamido)pentanoyl]argininamid **82**, ein N^G-substituiertes Analogon von BIBP 3226, wurde ein Vorschlag für die Wechselwirkung mit dem Y₁-Rezeptor entwickelt, der auf einem neuen Y₁-Rezeptormodell beruht, welches von der 3D-Struktur des bovinen Rhodopsin abgeleitet und unter Verwendung literaturbekannter Bindungsdaten für BIBP 3226 an Y₁-Rezeptormutanten aufgebaut wurde. Demnach kann man davon ausgehen, dass **82** und **83** – ansonst gleiches Bindungsverhalten vorausgesetzt – mehr Wechselwirkungen mit dem Y₁-Rezeptor eingehen als BIBP 3226. Von besonderer Bedeutung scheinen hierbei zwei zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zu sein, die im Vergleich mit der Referenzsubstanz zwischen der zusätzlich vorhandenen Säureamidgruppe und Thr²¹² bzw. Glu²¹⁹ ausgebildet werden können.

Auch zur Herstellung eines PET-Liganden sind die N^G-acylierten Argininamide mit terminaler Aminogruppe interessante Ausgangsverbindungen. So erscheint es aussichtsreich, durch Derivatisierung der N^G-(ω-Aminoalkanoyl)argininamiden zu ¹⁸F-markierten Verbindungen mit hoher Y₁-Rezeptoraffinität zu gelangen. Erste Vorarbeiten zur Herstellung entsprechender Substanzen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits durchgeführt, die Weiterführung dieses Teilprojekts wird jedoch ebenso wie die Entwicklung entsprechender Fluoreszenzliganden Gegenstand weiterführender Arbeiten sein.

Insgesamt gelang im Rahmen des Dissertationsprojektes die Entwicklung einer Festphasenmethode zur Synthese von Argininderivaten mit Substitution an N^α, C^α und N^G sowie die

Herstellung potenter NPY Y₁-Rezeptorantagonisten aus der Reihe der N^G-acylierten Argininsamide. Durch die N^G-Acylierung ist die Basizität des Guanidinsystems wesentlich erniedrigt und die Lipophilie erhöht, so dass wahrscheinlich die Voraussetzungen für eine therapeutische Anwendung dieser Stoffklasse aufgrund höherer peroraler Bioverfügbarkeit und besserer Membrangängigkeit bei stärkerer Wirkung günstiger sind als im Falle der Referenzverbindung BIBP 3226. Außerdem können solche Substanzen, wie an „kalten“ Verbindungen gezeigt wurde, als leicht herstellbare Radioliganden (³H-, ¹²⁵I- oder ¹⁸F-markiert) zu wertvollen pharmakologischen Werkzeugen für Untersuchungen an NPY-Rezeptoren werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Bedingungen

6.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Sämtliche verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, Fluka, Merck, Novabiochem, Senn, Bachem und Sigma bezogen. Die zur chromatographischen Reinigung der hergestellten Substanzen benötigten Mengen an Methanol, Chloroform, Essigsäureethylester, Aceton, Hexan und Acetonitril wurden vor der Verwendung mit einer Rückflussanlage gereinigt.

6.1.2 Geräte

Als Autoklav wurde das Modell Nr. 7085 der Fa. Eugen Kotter verwendet. Der Kugelrohrföfen GKR 50 der Fa. Büchi wurde zur Kurzwegdestillation eingesetzt. Zur Zentrifugation wurde die Heraeus Minifuge T und zur Trocknung der Substanzen für die HPLC-Untersuchung der Vakuumkonzentrator der Fa. Bachofer verwendet.

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte (unkorr.) wurden mit der Schmelzpunktapparatur Büchi 530 gemessen.

Optische Drehung

Die spezifische Drehung wurde mit einem Perkin-Elmer 241 Polarimeter bei 25 °C und bei der Na_D-Linie (589 nm) gemessen. Die Länge der Küvette betrug 1 dm.

Infrarotspektren

Die IR-Spektren wurden an einem FT-IR Spektrometer Paragon 1000PC der Fa. Perkin Elmer aufgenommen. Die Wellenzahl (ν) ist stets in cm⁻¹ angegeben, wobei die Intensitäten wie folgt abgekürzt sind:

br = breite, s = starke, m = mittelstarke, w = schwache Bande

Kernresonanzspektren

^1H -NMR-Spektren wurden an einem 250 MHz Bruker-NMR-Gerät, Modell WM 250 in vollständig deuterierten Lösungsmitteln und mit Tetramethylsilan als internem Standard aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ werden in ppm bezogen auf TMS und die Kopplungskonstante J in Hz angegeben. Die Multiplizitäten werden folgendermaßen abgekürzt:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint = Quintett, m = Multiplett, br = breites Signal

Massenspektren

Die Massenspektren wurden mit den Geräten der Fa. Varian MAT 112 (EI-MS) bzw. MAT 95 (FAB-MS: Methanol, Glycerin, Xenon) und Finnigan MAT 95 (CI) erstellt. Die Intensitäten der Peaks werden relativ zum stärksten Signal in % angegeben.

Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Labor der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg durchgeführt.

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Aluminiumfolien, beschichtet mit Aluminiumoxid 60 F₂₅₄ (Schichtdicke 0.2 mm) der Fa. Merck, verwendet.

Präparative chromatographische Trennungen

Präparative Trennungen wurden mit einem Chromatotron Modell 8924 der Fa. Harrison Research (Glasrotoren mit 4 mm Schichtdicke Kieselgel 60 PF₂₅₄, gipshaltig, Fa. Merck) oder an Kieselgel 60 PF₂₅₄ in Glassäulen durchgeführt.

6.2 Synthese von N^α -Arylalkanoylargininamiden am Merrifield-Harz

6.2.1 Darstellung der di-geschützten δ -Hydroxyaminosäuren (Linker)

6.2.1.1 Synthese von (*R*)-2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-5-hydroxypentansäure *tert*-butylester (2)

6.2.1.1.1 Darstellung von (*R*)-*N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)glutaminsäure- α -*tert*-butylester (1)

0.305 g (1.5 mmol) (*R*)-Glutaminsäure- α -*tert*-butylester werden in 20 ml 10 %iger Natriumcarbonat-Lösung gelöst und langsam mit 0.506 g (1.5 mmol) Fmoc-oxysuccinimid, gelöst in 10 ml Dioxan, versetzt. Die Lösung wird 20 h bei 24 °C gerührt. Anschließend verdünnt man mit 90 ml kaltem Wasser, stellt den pH-Wert mit 1 M Natriumcarbonat-Lösung auf pH 8.0 ein und schüttelt mit Diethylether (2 x 100 ml) aus. Die Etherphase wird verworfen. 100 ml Essigsäureethylester werden zu der wässrigen Phase gegeben, die unter kräftigem Rühren mit 1 N Salzsäure auf pH 2 gebracht wird. Die organische Phase wird abgetrennt, mit Wasser (2 x 20 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Chloroform/Methanol (97:3) gereinigt.

(*R*)-*N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)glutaminsäure- α -*tert*-butylester (1)

Ausbeute: 0.50 g (1.19 mmol; 79 %) weißer Feststoff

Schmp.: 106 °C (Chloroform/Methanol) (Lit.: 108 °C) [Abraham, 1990]

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ = 3318, 3290 (CO-NH), 3116, 3086, 3054 (Ar-OH), 2953, 2879 (C-H), 1715, 1698 (CO), 1398, 1109, 906

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ [ppm] = 1.38 (s, 9H, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.65-2.03 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 2.22-2.36 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.86-4.00 (m, 1H, CHCH_2CH_2), 4.14-4.34 (m, 3H, Fmoc), 7.24-7.47 (m, 4H, Fmoc), 7.56-7.76 (m, 3H, Fmoc+NH), 7.83-7.94 (m, 2H, Fmoc), 12.06-12.26 (br, 1H, COOH)

MS ($^*\text{FAB}$): m/z (%) = 851 ($[\text{2M+H}]^+$, 1), 426 (MH^+ , 4), 370 (18), 179 (100)

$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{NO}_6$ (425.5)

6.2.1.1.2 Darstellung von (*R*)-2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-5-hydroxypentansäure-*tert*-butylester (**2**)

1.45 g (13.4 mmol) Ethylchlorformiat in 35 ml abs. THF werden zu einer auf $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Lösung von 5.53 g (13 mmol) (*R*)-*N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)glutaminsäure- α -*tert*-butylester (**1**) und 1.37 g (13.5 mmol) Triethylamin in 50 ml abs. THF gegeben. Die Lösung wird 1 h bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend wird das ausgefallene Triethylaminhydrochlorid abfiltriert und das Filtrat mit 0.99 g (26.8 mmol) Natriumborhydrid und 10 ml Wasser versetzt. Man rührt 1 h bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ und schließlich noch 4 h bei Raumtemperatur. Die Mischung wird mit 3 N Salzsäure auf pH 3 gebracht und mit Essigsäureethylester (3 x 100 ml) extrahiert. Die organische Phase wird mit 0.5 N Natriumhydroxid-Lösung (2 x 50 ml), Wasser (1 x 50 ml) und ges. Kochsalzlösung (1 x 50 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft.

(*R*)-2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-5-hydroxypentansäure *tert*-butylester (**2**)

Ausbeute: 4.39 g (10.66 mmol; 82 %) farbloses Öl [Lee, 1984]

IR (Film): $\nu(\text{cm}^{-1})$ = 3401 (OH), 3356, 3279 (CO-NH), 3156, 3101 (Ar-OH), 2966, 2881 (C-H), 1702, 1693 (CO), 1489, 1233

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ [ppm] = 1.39 (s, 9H, $\text{CO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.43-1.81 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 3.31-3.43 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, von H_2O überlagert), 3.75-3.95 (m, 1H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 4.16-4.35 (m, 3H, Fmoc), 4.46 (t, $J=5.0\text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 7.27-7.48 (m, 4H, Fmoc), 7.59-7.78 (m, 3H, Fmoc+NH), 7.86-7.94 (m, 2H, Fmoc)

MS (^+FAB): m/z (%) = 823 ($[\text{2M}+\text{H}]^+$, 18), 412 (MH^+ , 6), 356 (16), 179 (100)

$\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_5$ (411.5)

6.2.1.2 Synthese von (*R*)-2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-5-hydroxypentansäure-*tert*-butylester (7)

6.2.1.2.1 Darstellung von (*R*)-Glutaminsäure- γ -methylester (3) • HCl

Zu einer Lösung von 0.31 g (2.11 mmol) (*R*)-Glutaminsäure in wasserfreiem Methanol (10 ml) werden unter Stickstoffatmosphäre 0.50 g (4.6 mmol) Chlortrimethylsilan gegeben. Die zuerst trübe Lösung wird nach wenigen Minuten klar. Man rührt sechs Minuten bei Raumtemperatur und engt die Lösung anschließend ein. Nach Zugabe von 40 ml Essigsäureethylester fällt ein weißer Feststoff aus. Dieser wird über eine Glasfritte abgesaugt und mit kaltem Essigsäureethylester (3 x 10 ml) nachgewaschen.

(*D*)-Glutaminsäure- γ -methylester • HCl (3)

Ausbeute: 0.27 g (1.69 mmol; 80 %) weißer Feststoff

Schmp.: 158 °C (Methanol) (Lit.: 157-158 °C) [Brook, 1983]

IR (KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$ = 3038 (NH_3^+), 2943, 2855 (C-H), 2508, 2099; 1710, 1689 (CO) 1610, 1557 (NH_3^+), 1398, 1106, 923

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO): δ [ppm] = 1.96-2.22 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$), 2.39-2.71 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$, überlagert von DMSO), 3.61 (s, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$), 3.91 (t, $J=6.3$ Hz, 1H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$), 8.53 (br, 3H, NH_3^+), 13.19-14.50 (br, 1H, COOH)

MS (CI): m/z (%) = 179 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 4), 162 (MH^+ , 100)

$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4 \bullet \text{HCl}$ (197.61)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 36.47 H: 6.12 N: 7.09

Gef.: C: 36.71 H: 6.09 N: 7.04

6.2.1.2.2 Synthese von (*R*)-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)glutaminsäure- γ -methylester (**4**)

Zu einer Lösung von 0.49 g (2.5 mmol) (*R*)-Glutaminsäure- γ -methylester • HCl (**3**) und 0.53 g (6.25 mmol) Natriumhydrogencarbonat in 10 ml Wasser wird eine Lösung von 0.656 g (3.0 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat in 10 ml Dioxan gegeben. Die Mischung wird 16 h bei Raumtemperatur gerührt und mit 10 ml Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase bringt man mit 1 N Salzsäure auf pH 2 und schüttelt mit Essigsäureethylester (4 x 10 ml) aus. Die organische Phase wird mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen (1 x 10 ml), über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedampft.

(*R*)-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)glutaminsäure- γ -methylester (**4**)

Ausbeute: 0.42 g (1.63 mmol; 65 %) farbloses Öl

IR (Film): $\nu(\text{cm}^{-1})$ = 3347, 3309 (CO-NH), 2995, 2967 (C-H), 1705, 1691 (CO), 1506, 1377, 1034, 998

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.38 (s, 9H, NHCO₂C(CH₃)₃), 1.67-2.05 (m, 2H, CH₂CH₂CO₂Me), 2.30-2.45 (m, 2H, CH₂CH₂CO₂Me), 3.58 (s, 3H, CH₂CH₂CO₂CH₃), 3.80-3.97 (m, 1H, CHCH₂CH₂CO₂Me), 7.10 (d, J=8.3 Hz, 1H, CHNHCO₂C(CH₃)₃), 12.20-12.87 (br, 1H, COOH)

MS (CI): m/z (%) = 540 ([2M+NH₄]⁺, 1), 423 (3), 279 ([M+NH₄]⁺, 52), 262 (MH⁺, 15), 223 (100)

C₁₁H₁₉NO₆ (261.27)

6.2.1.2.3 Darstellung von (*R*)-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)glutaminsäure- α -*tert*-butyl- γ -methylester (**5**)

Zu einer gekühlten Lösung (0 °C) von 18.15 g (69.47 mmol) (*R*)-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)glutaminsäure- γ -methylester (**4**), 0.69 g (5.68 mmol) 4-(Dimethylamino)pyridin und 5.66 g (76.42 mmol) *tert*-Butylalkohol in absolutem Dichlormethan werden 17.20 g (83.36 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid gegeben und 2 h bei 0 °C gerührt. Nachdem man weitere 12 h bei Raumtemperatur gerührt hat, filtriert man den entstandenen Dicyclohexylharnstoff ab und nimmt das Filtrat in 400 ml Diethylether auf. Man wäscht die organische Phase mit 1 N

Salzsäure (2 x 100 ml), gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2 x 100 ml) und Wasser (2 x 100 ml), trocknet über Natriumsulfat und dampft im Vakuum ein. Der Rückstand wird in 50 ml Essigsäureethylester aufgenommen, mit 10 g Kieselgel versetzt und im Vakuum eingedampft. Diese Mischung wird auf eine mit 270 g Kieselgel gefüllte Säule gegeben. Man eluiert mit Hexan-Aceton (7:3) und nimmt Fraktionen a 20 ml. Die Fraktionen 22 bis 45 werden vereint und im Vakuum eingedampft.

(R)-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)glutaminsäure- α -*tert*-butyl- γ -methylester (**5**)

Ausbeute: 15.21 g (47.93 mmol; 69 %) zähes Öl

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.38 (s, 18H, CHCO₂C(CH₃)₃, CHNHCO₂C(CH₃)₃), 1.54-2.04 (m, 2H, CH₂CH₂CO₂Me), 2.22-2.45 (m, 2H, CH₂CH₂CO₂Me), 3.59 (s, 3H, CH₂CH₂CO₂CH₃), 3.77-3.86 (m, 1H, CHCH₂CH₂CO₂Me), 7.16 (d, J=7.5 Hz, 1H, CHNHCO₂(CH₃)₃)

MS (CI): m/z (%) = 335 ([M+NH₄]⁺, 4), 318 (MH⁺, 100)

C₁₅H₂₇NO₆ (317.37)

Elementaranalyse :

Ber.: C: 56.77 H: 8.57 N: 4.41

Gef.: C: 57.36 H: 8.55 N: 4.83

6.2.1.2.4 Darstellung von *(R)*-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)glutaminsäure- α -*tert*-butylester (**6**)

1.19 g (3.78 mmol) *(R)*-*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)glutaminsäure- α -*tert*-butyl- γ -methylester (**5**) werden in 20 ml Aceton und 5 ml Wasser gelöst, auf 0 °C abgekühlt und tropfenweise über einen Zeitraum von 1 h mit 5.27 g (5.03 mmol) 1 N Natriumhydroxid-Lösung versetzt. Der pH-Wert der Lösung bleibt während der Zugabe bei 8.0 bis 8.5. Man rührt 1 h bei Raumtemperatur weiter, engt die Lösung auf 15 ml ein und versetzt sie anschließend mit 50 ml Wasser. Die wässrige Lösung wird mit 30 ml Diethylether gewaschen, mit 0.5 N HCl auf pH 4 gebracht und mit Diethylether extrahiert (3 x 60 ml). Die vereinten organischen Phasen werden mit Wasser (2 x 50 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, und im Vakuum eingedampft.

(R)-N-(tert-Butoxycarbonyl)glutaminsäure- α -tert-butylester (6)

Ausbeute: 0.83 g (2.72 mmol; 72 %) farbloses Öl

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 3341, 3312 (CO-NH), 2989, 2917 (C-H), 1703, 1698, 1683 (CO), 1523, 1356, 1089, 876

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.38 (s, 18H, CHCO₂C(CH₃)₃, CHNHCO₂C(CH₃)₃), 1.61-1.98 (m, 2H, CH₂CH₂CO₂H), 2.19-2.39 (m, 2H, CH₂CH₂CO₂H), 3.69-3.91 (m, 1H, CHCH₂CH₂CO₂H), 7.14 (d, J=7.9 Hz, 1H, CHNHCO₂(CH₃)₃), 12.15 (s, 1H, COOH)

MS (CI): m/z (%) = 321 ([M+NH₄]⁺, 40), 304 (MH⁺, 38), 265 (76), 134 (100)

C₁₄H₂₅NO₆ (303.34)

6.2.1.2.5 Darstellung von (R)-2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-5-hydroxypentansäure-tert-butylester (7)

0.41 g (3.80 mmol) Ethylchlorformiat in 20 ml abs. THF werden zu einer auf -5 °C gekühlten Lösung von 1.12 g (3.69 mmol) (R)-N-(tert-Butoxycarbonyl)glutaminsäure- α -tert-butylester (6) und 0.39 g (3.83 mmol) Triethylamin in 20 ml abs. THF gegeben. Die Lösung wird 1h bei -5 °C gerührt. Anschließend wird das ausgefallene Triethylaminhydrochlorid abfiltriert und das Filtrat mit 0.29 g (7.6 mmol) Natriumborhydrid und 3 ml Wasser versetzt. Man rührt 1 h bei 0 °C und schließlich noch 4 h bei Raumtemperatur. Die Mischung wird mit 3 N Salzsäure auf pH 3 gebracht und mit Essigsäureethylester (3 x 50 ml) extrahiert. Die organische Phase wird mit 0.5 N Natriumhydroxid-Lösung (2 x 25ml), Wasser (1 x 25 ml) und ges. Kochsalzlösung (1 x 25 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft.

(R)-2-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-5-hydroxypentansäure-tert-butylester (7)

Ausbeute: 0.67 g (2.32 mmol; 63 %) zähes Öl

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.38 (s, 18H, CHCO₂C(CH₃)₃, CHNHCO₂C(CH₃)₃), 1.45-1.79 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂OH), 3.36 (q, J=5.1 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂OH, überlagert von H₂O), 3.68-3.81 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂OH), 4.41 (t, J=5.1 Hz, 1H, CH₂CH₂CH₂OH), 7.09 (d, J=7.5

Hz, 1H, $\text{CHNHCO}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$)

MS (CI): m/z (%) = 307 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 10), 290 (MH^+ , 100), 190 (60)

$\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ (289.36)

Elementaranalyse :

Ber.: C: 58.11 H: 9.40 N: 4.84

Gef.: C: 58.19 H: 9.30 N: 4.77

6.2.2 Synthese der Arylalkansäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-ester (8-11)

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

1.15 g (10 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid werden in 20 ml abs. DMF gelöst. Unter Eiskühlung werden 2.27 g (11.0 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid zugegeben. Nach der Zugabe von 10 mmol der Arylalkansäure rührt man 5 h bei 0 °C, dann über Nacht bei Raumtemperatur. Man filtriert den ausgefallenen *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff ab. Die Lösung wird i. Vak. eingedampft, der Rückstand mit Ether trituiert und getrocknet.

Diphenylelessigsäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-ester (**8**)

Ausbeute: 3.03 g (9.80 mmol; 98 %) farbloser Feststoff

Schmp.: 113-114 °C

IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3031 (Ar-H), 2957, 2932 (C-H), 1777 (CO), 1744, 1729, 1565, 1321, 1009

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ [ppm] = 2.81 (s, 4H, CH_2CH_2), 5.76 (s, 1H, Ph_2CH), 7.28-7.42 (m, 10H, Ph)

MS (EI): m/z (%) = 309 ($[\text{M}]^{*+}$, 3), 194 ($[\text{Ph}_2\text{CHCO}]^+$, 6), 167 ($[\text{Ph}_2\text{CH}]^+$, 100)

$\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ (309.32)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 69.89 H: 4.89 N: 4.53

Gef.: C: 69.82 H: 4.91 N: 4.43

2,2-Diphenylpropionsäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-ester (**9**)

Ausbeute: 1.97 g (6.09 mmol; 87 %) braune Nadeln

Schmp.: 114-115 °C (Ether)

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3038 (Ar-H), 2956, 2938 (C-H), 1768 (CO), 1749, 1727

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 2.06 (s, 3H, Ph₂CH₃), 2.81 (s, 4H, CH₂CH₂), 7.27-7.45 (m, 10H, Ph)

MS (EI): m/z (%) = 323 ([M]⁺, 3), 224 ([Ph₂CH₃CO]⁺, 9), 181 ([Ph₂CCH₃]⁺, 100)

C₁₉H₁₇NO₄ (323.34)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 70.58 H: 5.30 N: 4.33

Gef.: C: 70.41 H: 5.24 N: 4.34

2-Cyclohexyl-2-phenylelessigsäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-ester (**10**)

Ausbeute: 3.03 g (9.61 mmol; 85 %) weißer Feststoff

Schmp.: 125-127 °C (Ether)

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3029, 3017 (Ar-H), 2988, 2976, 2957, 2932 (C-H), 1756 (CO), 1729, 1717, 1523, 1512 1307, 1093

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 0.75-2.07 (m, 11H, C₆H₁₁), 2.78 (s, 4H, CH₂CH₂), 3.77 (m, 1H, PhC₆H₁₁CHCOO), 7.27-7.43 (m, 5H, Ph)

MS (EI): m/z (%) = 315 ([M]⁺, 3), 201 ([PhC₆H₁₁CHCO]⁺, 12), 173 ([PhC₆H₁₁CH]⁺, 81), 91 ([PhCH₂]⁺, 100)

$C_{18}H_{21}NO_4$ (315.36)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 68.55 H: 6.71 N: 4.44

Gef.: C: 68.56 H: 6.52 N: 4.34

Bis(4-chlorphenyl)essigsäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-ester (**11**)

Ausbeute: 2.89 g (7.64 mmol; 88 %) weißer Feststoff

Schmp.: 135-136 °C (Ether)

IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 3043 (Ar-H), 2989, 2962 (C-H), 1781, 1779 (CO), 1749, 1732, 1588

1H -NMR ($[D_6]DMSO$): δ [ppm] = 2.82 (s, 4H, CH_2CH_2), 5.92 (s, 1H, Ar_2CHCOO), 7.40-7.48 (m, 8H, AA'BB'-System, 4-Cl-Ar)

MS (EI): m/z (%) = 376 ($[M]^{*+}$, 3), 278 ($[Ar_2CHCO]^{*+}$, 2), 235 ($[Ar_2CH]^{*+}$, 100)

$C_{18}H_{13}Cl_2NO_4$ (378.21)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 57.16 H: 3.46 N: 3.70

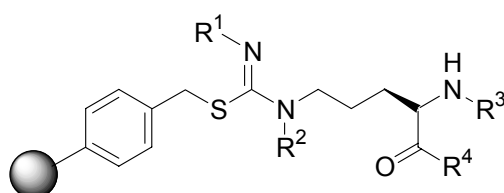
Gef.: C: 57.55 H: 3.74 N: 3.91

6.2.3 Festphasensynthese der N^α -Arylalkanoylargininamide

Vorbemerkung: Um bessere Übersichtlichkeit zu erzielen, werden im Folgenden die festphasengebundenen Substanzen nicht mit ihrem chemischen Namen aufgeführt, sondern mit Strukturformeln gezeigt (Zur Nomenklatur der vom Harz abgespaltenen Verbindungen vgl. die entsprechenden Kapitel des Experimentellen Teils.)

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Strukturen der gemäß dieser Synthesevorschrift hergestellten polymergebundenen Argininamid-Zwischenstufen **P6-P11**.

Tabelle 6-1

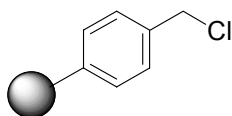


Nr.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
P6				
P7				
P8				
P9				
P10				
P11				

0.2 g (0.28 mmol, bei einem Substitutionsgrad von 1.4 mmol/g) ParaMax Merrifield-Harz werden in eine Stickstoffritze überführt (vgl. Abbildung 3-1). Alle nachfolgenden Arbeitsschritte werden unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

1. Umsetzung mit Thioharnstoff

107 mg (1.4 mmol) Thioharnstoff werden in 4.0 ml DMF p.A. gelöst, zum Merrifield-Harz gegeben und 16 h bei 75 °C geschüttelt. Nach Absaugen des Lösungsmittels wäscht man nacheinander mit DMF (4 x 5 ml), THF (4 x 5 ml), Methanol (4 x 5 ml) und Dichlormethan (4 x 5 ml). Anschließend trocknet man das Harz 10 h i. Vak. Mit dem getrockneten Harz wird der Kaiser-Test [Kaiser et al., 1970] durchgeführt. Bei positivem Ergebnis wird Schritt 2 durchgeführt.

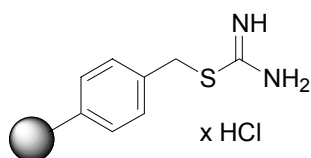


Merrifield-Harz

Abbildung 6-1

2. Umsetzung von polymergebundenem Isothioharnstoff (**P2**) mit Di-*tert*-butyldicarbonat

367 mg (1.68 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat und 398 mg (3.08 mmol) Ethyl(diisopropyl)amin werden in ein kleines Schnappdeckelglas gegeben und in 5 ml Dichlormethan gelöst. Das Harz (**P2**) wird mit dieser Lösung versetzt und 40 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird das Harz mit den unter Arbeitsschritt 1 beschriebenen Lösungsmitteln gewaschen und 10 h i. Vak. getrocknet. Mit dem getrockneten Harz wird der Kaiser-Test durchgeführt. Bei negativem Ergebnis wird Schritt 3 durchgeführt.



P2

Abbildung 6-2

3. Umsetzung des polymergebundenen *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)isothioharnstoffs (**P3**) mit **7**

406 mg (1.4 mmol) **7** und 367 mg (1.4 mmol) Triphenylphosphin werden in ein kleines Schnappdeckelglas gegeben und in 3 ml THF abs. gelöst. Das Harz (**P3**) wird mit dieser Mischung unter Stickstoffatmosphäre versetzt. Anschließend gibt man 283 mg (1.4 mmol) Diisopropylazodicarboxylat (DIAD), gelöst in 2 ml abs. THF, dazu und schüttelt 18 h bei Raumtemperatur. Das Harz wird mit den unter Arbeitsschritt 1 beschriebenen Lösungsmitteln

gewaschen und 10 h i. Vak. getrocknet. Auf die Durchführung des Kaiser-Tests wird hier verzichtet.

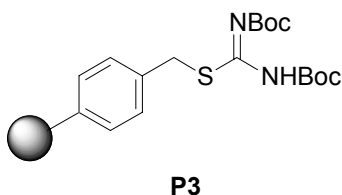


Abbildung 6-3

4. Abspaltung der *tert*-Butoxycarbonyl/*tert*-Butyl-Schutzgruppen vom polymergebundenen Produkt **P6**

Das Harz wird mit 2.5 ml Dichlormethan und 2.5 ml Trifluoressigsäure versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird das Harz mit den unter Arbeitsschritt 1 beschriebenen Lösungsmitteln gewaschen und 10 h i. Vak. getrocknet. Mit dem getrockneten Harz wird der Kaiser-Test durchgeführt. Bei positivem Ergebnis wird Schritt 5 durchgeführt.

5. Umsetzung mit Di-*tert*-butyldicarbonat

1.19 g (9.24 mmol) Ethyldiisopropylamin und 1.10 g (5.04 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat werden in 5 ml Dichlormethan p. A. gelöst und auf das Harz **P7** aufgetragen. Man schüttelt 40 h bei Raumtemperatur. Anschließend wird das Harz wie beschrieben gewaschen und i. Vak. getrocknet. Mit dem getrockneten Harz wird der Kaiser-Test durchgeführt. Bei negativem Ergebnis wird Schritt 6 durchgeführt.

6. Umsetzung mit Benzylamin

Auf das Harz **P8** werden nacheinander 362 mg (1.4 mmol) Ethyldiisopropylamin in 1 ml DMF, 107 mg (1.4 mmol) Benzylamin in 2 ml DMF und 437 mg (1.4 mmol) 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU), gelöst in 2 ml DMF, aufgetragen. Man schüttelt über Nacht, wäscht und trocknet anschließend i. Vak. Auf die Durchführung des Kaiser-Tests wird hier verzichtet.

7. Abspaltung der *tert*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppen von **P9**

Diese verläuft völlig analog zu Schritt 4. Bei positivem Kaiser-Test wird Schritt 8 durchgeführt.

8. Umsetzung mit Diphenylessigsäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-ester (8)

1.19 g (9.24 mmol) Ethyldiisopropylamin und 411 mg (1.4 mmol) Diphenylessigsäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-ester (**8**) werden in 5 ml DMF abs. gelöst und zum Harz **P10** gegeben. Man schüttelt 48 h bei 40 °C, wäscht und trocknet anschließend i. Vak. Bei negativem Kaiser-Test wird Schritt 9 durchgeführt.

9. Abspaltung von (*R*)-*N*^α-Diphenylacetyl-*N*-(phenylmethyl)argininamid (**18**) vom Harz **P11**

5 ml einer methanolischen Ammoniaklösung werden zum Harz **P11** gegeben und 12 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Das freigesetzte Argininamid **18** wird abgesaugt und aufgefangen, das Harz mit Methanol abs. (3 x 5 ml), Acetonitril (3 x 5 ml) und abs. Dichlormethan (3 x 5 ml) gewaschen. Die aufgefangenen Waschlösungen werden mit der Produktlösung vereinigt, die Lösungsmittel werden i. Vak. entfernt.

Kaiser –Test [Kaiser et al., 1970]

Dazu werden folgende Reagenzien benötigt :

- (1). Eine Lösung aus 2 ml 0.01 M KCN-Lösung und 98 ml Pyridin
- (2). Eine Lösung aus 500 mg Ninhydrin in 10 ml n-Butanol
- (3). Eine Lösung von 80 g Phenol in 20 ml n-Butanol
- (4). Ethanol/Essigsäure 1:1 (v/v)

Durchführung:

Eine kleine Harzprobe wird in ein Glühröhrchen überführt und 3mal mit je 2 ml Reagenz (4) gewaschen. Das Entfernen der Lösung erfolgt durch Dekantieren. Anschließend wird die Probe noch dreimal mit Ethanol gewaschen. Dann werden nacheinander jeweils 2 Tropfen von Reagenz (1), (2) und (3) hinzugefügt. Die Probe wird für 5 min in einen Trockenschrank (100 °C) gestellt. Nach dieser Zeit kann die Farbbeurteilung des Harzes vorgenommen werden. Der Test ist positiv bei dunkelblauen Harzkügelchen und gleichfarbigem Hintergrund. Der Test ist negativ bei weißen Harzkügelchen und farblosem oder schwach gelb-grauem Hintergrund.

Zur besseren Charakterisierung der Zwischenprodukte werden diese nach den Syntheseschritten 2-8 vom polymeren Träger abgespalten. Diese Abspaltungen erfolgen analog zu Schritt 9. Alle angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die Menge bzw. Beladung des eingesetzten Harzes.

N, N'-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)guanidin (**12**)

Ausbeute: 71.15 mg (0.274 mmol; 98 %) farbloses zähes Öl

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 1.49 (s, 18H, NHCO₂C(CH₃)₃), 7.3-9.1 (br, 3H, NH)

MS (EI): m/z (%) = 259 ([M]⁺, 1), 148 (55), 57 (100)

C₁₁H₂₁N₃O₄ (259.30)

(*R*)-*N*^α,*N*^β-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)arginin-*tert*-butylester (**13**)

Ausbeute: 132.13 mg (0.249 mmol; 89 %) bräunliches zähes Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.32-1.62 (m, 40H, CHCH₂CH₂CH₂N, NHCO₂C(CH₃)₃, 2 x NCO₂C(CH₃)₃, CO₂C(CH₃)₃), 3.66-3.88 (m, 3H, CH₂CH₂CH₂N, CHCH₂CH₂CH₂), 7.14 (d, J=7.8 Hz, 1H, NHCO₂C(CH₃)₃), 8.99-9.19 (br, 2H, NH₂)

MS (*FAB): m/z (%) = 1062 ([2M+H]⁺, 5), 531 (MH⁺, 100), 431 (24), 331 (35)

C₂₅H₄₆N₄O₈ (530.65)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 56.59 H: 8.74 N: 10.56

Gef.: C: 56.39 H: 8.57 N: 10.79

(*R*)-Arginin (**14**)

Ausbeute : 41.46 g (0.238 mmol; 85 %), weißer, hygroskopischer Schaum

¹H-NMR (D₂O): δ [ppm] = 1.50-1.69 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂N), 3.12-3.31 (m, 3H, CHCH₂CH₂CH₂N)

MS (CI): m/z (%) = 175 (MH⁺, 4), 157 (86), 133 (78), 115 (100)

$C_6H_{14}N_4O_2 \bullet 0.75 H_2O$ (187.72)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 38.39 H: 8.34 N: 29.85

Gef.: C: 38.50 H: 8.31 N: 29.99

(*R*)-*N*^α,*N*^β-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)arginin (**15**)

Ausbeute : 102.32 mg (0.216 mmol; 77 %), bräunliches, zähes Öl

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.32-1.77 (m, 31H, CHCH₂CH₂CH₂N, NHCO₂C(CH₃)₃, 2 x NCO₂C(CH₃)₃), 3.00-3.17 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂N), 3.79-4.03 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂), 7.04 (d, J=7.8 Hz, 1H, CHNHCO₂C(CH₃)₃)

MS (*ESI): m/z (%) = 475 (MH⁺, 4), 389 (100), 344 (12)

$C_{21}H_{38}N_4O_8$ (474.55)

(*R*)-*N*^α,*N*^β-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-(phenylmethyl)argininamid (**16**)

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Chloroform/Methanol (7:1))

Ausbeute : 12.63 mg (0.022 mmol; 8 %), farbloses, zähes Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.28-1.76 (m, 31H, CHCH₂CH₂CH₂N, NHCO₂C(CH₃)₃, 2 x NCO₂C(CH₃)₃), 3.41-3.52 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂N), 3.84-4.01 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂), 4.28 (d, J=5.9 Hz, 2H, PhCH₂NH), 6.99 (d, J=7.9 Hz, 1H, CHNHCO₂C(CH₃)₃), 7.14-7.53 (m, 7H, Ph, NH₂), 8.36 (t, J=5.9 Hz, 1H, CONHCH₂Ph)

MS (*ESI): m/z (%) = 564.2 (MH⁺, 70), 464.3 (100), 364.2 (55),

$C_{28}H_{45}N_5O_7$ (563.70)

(R)-N-(Phenylmethyl)argininamid (17)

Das Rohprodukt wird unter Ammoniakatmosphäre am Chromatotron gereinigt (Laufmittel Chloroform/Methanol (3:1))

Ausbeute : 5.16 mg (0.020 mmol; 7 %), farbloses, zähes Öl

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.29-1.70 (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂N), 2.91-3.13 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂N), 3.85-3.98 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂), 4.28 (m, 2H, PhCH₂NH), 7.12-7.38 (m, 5H, Ph), 7.43-8.79 (br, 7H, CHNH₂, Guanidin-NH, CONHCH₂Ph)

MS (*ESI): m/z (%) = 527 ([2M+H]⁺, 3), 264 (MH⁺, 100)

C₁₃H₂₁N₅O (263.17 g/mol)

(R)-N^α-Diphenylacetyl-N-(phenylmethyl)argininamid (18)

Das Rohprodukt wird unter Ammoniakatmosphäre am Chromatotron gereinigt (Laufmittel Chloroform/Methanol (5:1))

Ausbeute : 5.12 mg (0.011 mmol; 4 %), bräunliches Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.30-1.81 (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂N), 2.89-3.04 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂N), 4.17-4.43 (m, 3H, CHCH₂CH₂CH₂, PhCH₂NH), 5.13 (s, 1H, Ph₂CHCO), 7.05-7.41 (m, 15H, 3 x Ph), 7.42-8.40 (br, 2H, Guanidin-NH), 8.44-8.81 (br, 2H, CONHCH₂Ph, CHNHCOCHPh₂)

MS (*ESI): m/z (%) = 917 ([2M+H]⁺, 3), 458 (MH⁺, 100)

C₂₇H₃₁N₅O₂ • 2 H₂O (493.60 g/mol)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 65.70 H: 7.15 N: 14.19

Gef.: C: 65.59 H: 7.16 N: 14.39

6.3 Synthese von N^G -alkylsubstituierten und N^G -estersubstituierten Argininamiden am Rink Amid Harz

6.3.1 Darstellung von (R)- N^α -(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-ornithin-9-fluorenylmethylester-trifluoracetat (**20** • CF₃COOH)

6.3.1.1 Darstellung von (R)- N^δ -(tert-Butoxycarbonyl)- N^α -(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-ornithin-9-fluorenylmethylester (**19**)

4.16 g (9.15 mmol) (R)- N^α -Fmoc- N^δ -Boc-ornithin, 1.98 g (10.07 mmol) 9-Hydroxymethylfluoren und 0.11 g (0.92 mmol) 4-Dimethylaminopyridin werden in Dichlormethan gelöst, mit 2.08 g (10.07 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Man filtriert den entstandenen Dicyclohexylharnstoff ab und dampft im Vakuum ein. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Chloroform/Methanol 97:3) gereinigt. Die Produktfraktionen werden gesammelt und im Vakuum eingedampft.

(R)- N^δ -(tert-Butoxycarbonyl)- N^α -(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-ornithin-9-fluorenylmethylester (**19**)

Ausbeute: 5.04 g (7.96 mmol; 87 %) farbloses zähes Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.38 (s, 9H, NHCO₂C(CH₃)₃), 1.44-1.66 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 2.80-2.95 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 3.98-4.10 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂), 4.18-4.50 (m, 6H, NHCO₂CH₂CHC₁₂H₈, CHCO₂CH₂CHC₁₂H₈), 6.76 (t, J=5.0 Hz, 1H, CH₂NHCO₂C(CH₃)₃), 7.23-7.95 (m, 17H, CHNHCO₂, NHCO₂CH₂CHC₁₂H₈, CHCO₂CH₂CHC₁₂H₈)

MS (⁺FAB): m/z (%) = 1265 ([2M+H]⁺, 1), 633 (MH⁺, 22), 533 (100)

C₃₉H₄₀N₂O₆ (632.74)

6.3.1.2 Darstellung von (R)-N^α-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-ornithin-9-fluorenylmethylester-trifluoracetat (20 • CF₃COOH)

1.24 g (1.96 mmol) (R)-N^α-Fmoc-N^δ-Boc-ornithin-9-fluorenylmethyl-ester (**19**) und 0.57 g (4.90 mmol) Triethylsilan werden in 5.33 g (62.71 mmol) Dichlormethan gelöst. Nach der Zugabe von 2.91 g (25.48 mmol) Trifluoressigsäure wird die anfänglich trübe Lösung klar. Man rührt 2 h bei Raumtemperatur und dampft das Lösungsmittel im Vakuum ab. Das Produkt wird in Methanol aufgenommen und wiederum im Vakuum eingedampft.

(R)-N^α-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-ornithin-9-fluorenylmethylester-trifluoracetat
(**20** • CF₃COOH)

Ausbeute: 1.27 g (1.96 mmol; 100 %) sehr zähes Öl

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.44-1.89 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 2.64-2.87 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 4.02-4.17 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂), 4.18-4.52 (m, 6H, NHCO₂CH₂CHC₁₂H₈, CHCO₂CH₂CHC₁₂H₈), 4.58-5.47 (br, 3H, NH₃⁺), 7.17-7.52 (m, 17H, CHNHCO₂, NHCO₂CH₂CHC₁₂H₈, CHCO₂CH₂CHC₁₂H₈)

MS (⁺FAB): m/z (%) = 1065 ([2M+H]⁺, 1), 533 (MH⁺, 54), 179 (100)

C₃₄H₃₂N₂O₄ • CF₃COOH (646.65)

6.3.2 Darstellung von Fluorenylmethoxycarbonylisothiocyanat (21)

2.60 g (10 mmol) Fluorenylmethoxycarbonylchlorid werden in 10 ml wasserfreiem Essigsäureethylester gelöst. Unter Stickstoffatmosphäre wird die Lösung langsam zu einer 0 °C kalten Suspension von trockenem (24 h bei 80 °C an der Ölpumpe vorgetrocknetem) Kaliumthiocyanat in 10 ml wasserfreiem Essigsäureethylester getropft. Man rührt 10 h und läßt den Ansatz während dieser Zeit auf Raumtemperatur kommen. Nachdem man über Nacht weiter gerührt hat, wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der gelbe breiige Rückstand wird in 5 ml Dichlormethan/n-Hexan (2:3) aufgenommen und durch Säulenchromatographie (Laufmittel Dichlormethan/n-Hexan (2:3)) gereinigt.

Fluorenylmethoxycarbonylisothiocyanat (**21**)

Ausbeute: 2.08 g (7.4 mmol; 74 %) gelbliches, zähflüssiges Öl

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 4.26 (t, J=7.3 Hz, 1H, CO₂CH₂CHC₁₂H₈), 4.47 (d, J=7.3 Hz, 2H, CO₂CH₂CHC₁₂H₈), 7.29-7.81 (m, 8H, CO₂CH₂CHC₁₂H₈)

¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 46.25 (1C, OCH₂CHC₁₂H₈), 70.67 (1C, OCH₂CHC₁₂H₈), 120.17, 125.02, 127.25, 128.09, 141.27, 142.75, (12C, OCH₂CHC₁₂H₈), 147.43 (1C, NCS), 150.37 (1C, OCONCS)

MS (CI): m/z (%) = 299 ([M+NH₄]⁺, 100), 282 (MH⁺, 1), 214 (10), 179 (11)

C₁₆H₁₁NO₂S (281.33)

6.3.3 Darstellung von 4-Hydroxybenzylamin (22)

Methode A:

30 ml 33%ige Bromwasserstoffsäure in Eisessig wird langsam zu 10.0 g (72.9 mmol) 4-Methoxybenzylamin getropft und anschließend für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Das nach der Aufbewahrung der Lösung im Kühlschrank auskristallisierte Hydroxybenzylamin-hydrobromid (**22** • HBr) wird abgesaugt, mit Essigester gewaschen und getrocknet. Zur Freisetzung der Base wird das Salz in möglichst wenig Wasser gelöst. Am pH-Meter wird mit Ammoniaklösung der pH-Wert auf 9 eingestellt. Zur Kristallisation wird die Lösung über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Ausgefallenes **22** wird abgesaugt und getrocknet.

Methode B:

Zu 2.74 g (20.0 mmol) 4-Methoxybenzylamin in 20 ml wasserfreiem Dichlormethan werden bei 0 °C unter Stickstoffatmosphäre-Atmosphäre 20.0 ml BBr₃-Lösung (1M in Dichlormethan, 20.0 mmol) getropft. Anschließend wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Bei 0 °C wird mit 20 ml Wasser hydrolysiert. Die organische Phase wird abgetrennt, die wässrige Phase wird am pH-Meter auf pH 9 eingestellt. Bei der Aufbewahrung im Kühlschrank fällt aus der Lösung kristallines **22** aus, welches abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und getrocknet wird.

Beide Methoden liefern leicht gelbliche Kristalle in Ausbeuten zwischen 20 und 40 %.

4-Hydroxybenzylamin (**22**)

Schmp.: 112-114 °C (Lit.: 114-115 °C [Witkop und Beiler, 1954])

IR (KBr) ν (cm⁻¹) = 3324 (OH, NH), 3027 (Ar-H), 2956, 2938 (C-H), 1223 (C-O), 987, 877

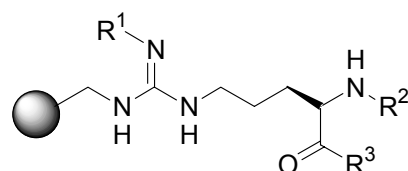
¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 3.4 (br, 3H, NH₂, OH), 3.58 (s, 2H, CH₂Ar), 6.63-7.14 (m, 4H, AA'BB'-System, ArOH)

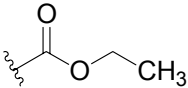
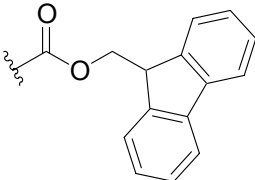
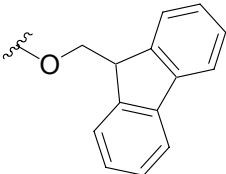
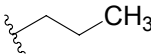
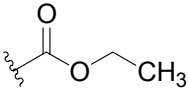

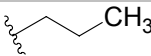

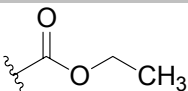
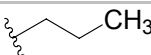
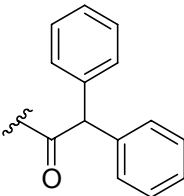
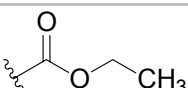
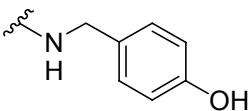
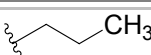
C₇H₉NO (123.15)

6.3.4 Festphasensynthese der N^G -estersubstituierten und N^G -alkylsubstituierten Argininamide (26 und 27)

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Strukturen der nach dieser Synthesevorschrift hergestellten polymergebundenen Argininamid-Zwischenstufen **P19-P26**.

Tabelle 6-2:



Nr.	R ¹	R ²	R ³
P19			
P20			
P21			
P22			
P23			
P24			
P25			
P26			

0.2 g (0.10 mmol, bei einem Substitutionsgrad von 0.52 mmol/g) Rink Amid-Harz [4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)phenoxy Harz] werden in eine Stickstoffritze überführt. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte werden unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

1. Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Harz

Das Rink Amid-Harz wird mit 5 ml Piperidin/DMF (30:70) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach dem Absaugen des Lösungsmittels i. Vak. wird das Harz mit DMF (5 x 5 ml) gewaschen. Mit dem bei Raumtemperatur i. Vak. getrockneten Harz (10 h) wird der Kaiser-Test (vgl. 6.2.3) durchgeführt. Bei positivem Ergebnis wird Schritt 2 durchgeführt.

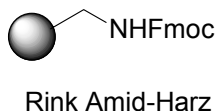


Abbildung 6-4

2. Umsetzung mit Fluorenylmethoxycarbonylisothiocyanat (**21**) oder Propylisothiocyanat

141 mg (0.50 mmol) **21** oder 51 mg (0.50 mmol) Propylisothiocyanat werden in 5 ml abs. Dichlormethan gelöst und zum Harz **P12** gegeben. Man schüttelt 1 h bei Raumtemperatur und saugt das Lösungsmittel ab. Das Harz wird mit Dichlormethan (5 x 5 ml) und DMF (5 x 5 ml) gewaschen und i. Vak. getrocknet (10 h). Mit dem getrockneten Harz wird der Kaiser-Test durchgeführt. Bei negativem Ergebnis wird Schritt 3 durchgeführt.

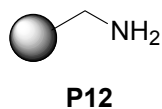


Abbildung 6-5

3. Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Schritt 3 wird nur mit dem Harz (**P13**) durchgeführt, dass mit **21** behandelt wurde.

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe verläuft völlig analog zu Schritt 1. Mit dem getrockneten Harz **P14** wird der Kaiser-Test durchgeführt. Bei positivem Ergebnis wird Schritt 4 durchgeführt.

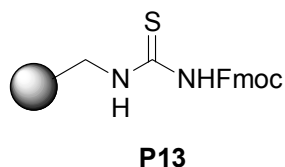


Abbildung 6-6

4. S-Methylierung der festphasengebundenen Thioharnstoffe

Dieser Schritt wird mit den beiden harzgebundenen Thioharnstoffen **P14** und **P17** durchgeführt.

71 mg (0.50 mmol) Iodmethan werden in 2.5 ml DMF gelöst und zum Harz gegeben. Man schüttelt 1 h bei Raumtemperatur, saugt das Lösungsmittel ab und wäscht einmal mit 5 ml DMF nach. Die Iodmethanzugabe bzw. die Reinigung wird noch zweimal wiederholt. Anschließend wird das Harz mit Dichlormethan (5 x 5 ml) und DMF (5 x 5 ml) gewaschen und i. Vak. getrocknet (10 h). Auf die Durchführung des Kaiser-Tests wird hier verzichtet.

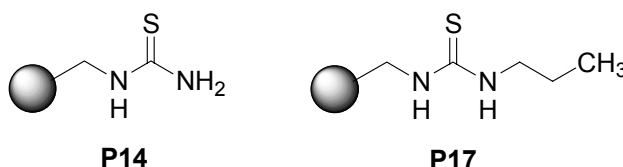


Abbildung 6-7

5. Umsetzung mit Ethylchlorformiat

Schritt 5 wird nur mit dem Harz **P15** durchgeführt.

129 mg (1.0 mmol) Ethyldiisopropylamin werden in 2.5 ml abs. Dichlormethan gelöst und zum Harz gegeben. Nach 1 min erfolgt die Zugabe von 54 mg (0.50 mmol) Ethylchlorformiat (gelöst in 2.5 ml abs. Dichlormethan) zum Harz. Man schüttelt 16 h bei 0 °C und führt anschließend die üblichen Reinigungsschritte durch. Mit dem getrockneten Harz wird der Kaiser-Test durchgeführt. Bei negativem Ergebnis wird Schritt 6 durchgeführt.

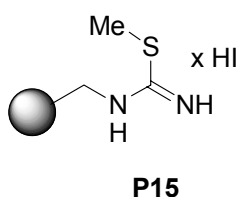


Abbildung 6-8

6. Umsetzung mit (R)-N^α-Fmoc-ornithin-9-fluorenylmethylester-trifluoracetat (**20**)

Dieser Schritt wird mit den beiden Harzen **P16** und **P18** (behandelt mit **21** bzw. mit Phenylisothiocyanat) durchgeführt.

129 mg (1.0 mmol) Ethyldiisopropylamin und 323 mg (1.0 mmol) **20** werden in 5 ml DMF abs. gelöst und zum Harz gegeben. Man schüttelt 24 h bei 40 °C und führt anschließend die üblichen Reinigungsschritte durch. Auf die Durchführung des Kaiser-Tests mit dem getrockneten Harz wird verzichtet.

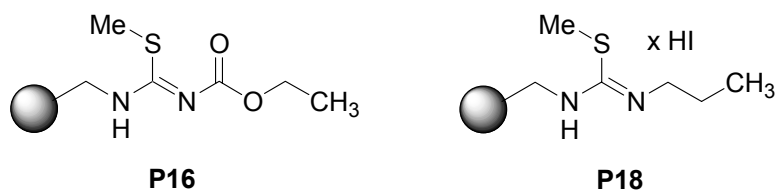


Abbildung 6-9

7. Abspaltung der Fmoc- bzw. der Fm- Schutzgruppen

Dieser Schritt wird mit den beiden Harzen **P19** und **P20** durchgeführt.

Die Abspaltung der Fmoc und Fm-Schutzgruppen verläuft völlig analog zu Schritt 1. Mit dem getrockneten Harz wird der Kaiser-Test durchgeführt. Bei positivem Ergebnis wird Schritt 8 durchgeführt.

8. Umsetzung mit Diphenylelessigsäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-ester (8)

Dieser Schritt wird mit den beiden Harzen **P21** und **P22** durchgeführt.

65 mg (0.50 mmol) Ethyldiisopropylamin und 155 mg (0.5 mmol) Diphenylelessigsäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-ester (**8**) werden in 5 ml abs. DMF gelöst und zum Harz gegeben. Man schüttelt 48 h bei 40 °C, wäscht und trocknet anschließend i. Vak. Bei negativem Kaiser-Test wird Schritt 9 durchgeführt.

9. Umsetzung mit 4-Hydroxybenzylamin (**22**)

Dieser Schritt wird mit beiden Harzen **P23** und **P24** durchgeführt.

Auf das Harz werden nacheinander 65 mg (0.5 mmol) Ethyldiisopropylamin gelöst in 1 ml DMF, 62 mg (0.5 mmol) **22** gelöst in 2 ml DMF und 156 mg (0.5 mmol) 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU) gelöst in 2 ml DMF aufgetragen. Man schüttelt über Nacht, wäscht und trocknet anschließend i. Vak. Auf die Durchführung des Kaiser-Tests wird hier verzichtet.

10. Abspaltung der Argininamide vom Harz

Dieser Schritt wird mit den beiden Harzen **P25** und **P26** durchgeführt.

Man gibt 5 ml 95 %ige TFA zum Harz und schüttelt 2 h bei Raumtemperatur. Die freigesetzten Argininamide werden abgesaugt und aufgefangen, das Harz mit abs. Methanol (3 x 5 ml), Acetonitril (3 x 5 ml) und abs. Dichlormethan (3 x 5 ml) gewaschen. Die aufgefangenen Waschlösungen werden mit den Produktlösungen vereint und die Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Zur besseren Charakterisierung der Zwischenprodukte der Herstellung des (*R*)-*N*^α-Diphenylacetyl-*N*^G-ethoxycarbonyl-*N*-[(4-hydroxyphenyl)methyl]argininamids (**26**) werden diese nach den Syntheseschritten 6, 7 und 8 vom polymeren Träger abgespalten. Diese Abspaltungen erfolgen analog zu Schritt 10. Alle angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die Menge bzw. Beladung des eingesetzten Harzes.

(*R*)-*N*^G-Ethoxycarbonyl-*N*^α-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-arginin(9-fluorenylmethyl)ester (**23**)

Ausbeute: 58 mg (0.076 mmol; 76 %) weißer hygroskopischer Schaum

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.18 (t, J=7.3 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1.30-1.88 (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂N), 2.96-3.19 (m, 2H, CHCH₂CH₂CH₂N), 3.83-4.15 (m, 5H, CO₂CH₂CH₃, CHCH₂CH₂CH₂N, 2 x OCH₂CHC₁₂H₈), 4.18-4.52 (m, 4H, 2 x OCH₂CHC₁₂H₈), 7.18-7.96 (m, 20H, 2 x OCH₂CHC₁₂H₈, 4 x NH-Guanidin), 8.54-8.72 (br, 1H, NHCO₂CH₂CHC₁₂H₈)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 647 (MH⁺, 100), 469 (3)

C₃₈H₃₈N₄O₆ • CF₃COOH (760.76)

(*R*)-*N*^G-Ethoxycarbonylarginin (**24**)

Ausbeute: 27 mg (0.074 mmol; 74 %) farbloses Öl

¹H-NMR (D₂O): δ [ppm] = 1.23 (t, J=7.2 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1.50-1.69 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂N), 3.12-3.31 (m, 3H, CHCH₂CH₂CH₂N), 4.20 (q, J=7.1 Hz, 2H, CO₂CH₂CH₃)

MS (CI): m/z (%) = 247 (MH⁺, 4), 175 (34), 115 (100)

C₉H₁₈N₄O₄ • CF₃COOH (360.29)

(*R*)-*N*^α-Diphenylacetyl-*N*^G-ethoxycarbonylarginin (**25**)

Das Rohprodukt wird am Chromatotron gereinigt (Laufmittel: Chloroform/Methanol 2:1)

Ausbeute: 23.84 mg (0.043 mmol; 43 %) farbloser hygroskopischer Schaum

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.26 (t, J=7.3 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1.39-2.03 (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂N), 3.18-3.31 (m, 2H, CHCH₂CH₂CH₂N), 4.06-4.31 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂N), 4.22 (q, J=7.1 Hz, 2H, CO₂CH₂CH₃), 4.40-6.03 (br, 3H, NH₃⁺, überlagert von H₂O), 5.07 (s, 1H Ph₂CHCONH), 7.17-7.37 (m, 10H, 2Ph), 8.45-8.78 (m, NHCOCHPh₂, CH₂CH₂CH₂NHC), 11.10-11.31 (br, 1H, COOH)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 441 (MH⁺, 74), 409 (24), 162 (100)

C₂₃H₂₈N₄O₅ • CF₃COOH (554.52)

(*R*)-*N*^α-Diphenylacetyl-*N*^G-ethoxycarbonyl-*N*-[(4-hydroxyphenyl)methyl]argininamid (**26**)

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Chloroform/Methanol (10:1)).

Ausbeute: 10.79 mg (0.018 mmol, 18 %), farbloser hygroskopischer Schaum

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.17 (t, J=7.2 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1.23-1.75 (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂), 2.98-3.20 (m, 2H, CHCH₂CH₂CH₂), 3.95 (q, J=7.3 Hz, 2H, CO₂CH₂CH₃), 4.12 (d, J=5.9 Hz, 2H, HNCH₂Ar-OH), 4.23-4.44 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂), 5.15 (s, 1H, Ph₂CH), 6.66-6.72 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 6.97-7.00 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 7.11-7.47 (m, 13H, Ph, 3 Guanidin-NH), 8.21 (t, J=6.0 Hz, 1H, HNCH₂Ar-OH), 8.46 (d, J=8.4 Hz, 1H, HNCHCH₂CH₂CH₂), 9.25 (br, 1H, Ar-OH)

MS (⁺FAB): m/z (%) = 1091 ([2M+H]⁺, 10), 546 (MH⁺, 100), 167 ([Ph₂CH]⁺, 45)

C₃₀H₃₅N₅O₅ • 3 H₂O (599.68)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 60.09 H: 6.89 N: 11.68

Gef.: C: 59.87 H: 6.85 N: 11.77

(*R*)-*N*^α-Diphenylacetyl-*N*-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-*N*^G-propylargininamid (**27**)

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Chloroform/Methanol (7:1)).

Ausbeute: 23.96 mg (0.037 mmol, 37 %), farbloser hygroskopischer Schaum

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 0.88 (t, J=7.7 Hz, 3H, CH₂CH₂CH₃), 1.23-1.71 (m, 6H, CHCH₂CH₂CH₂, CH₂CH₂CH₃), 2.93-3.10 (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂, CH₂CH₂CH₃), 4.06-4.43 (m, 3H, HNCH₂Ar-OH, CHCH₂CH₂CH₂), 5.14 (s, 1H, Ph₂CH), 6.59-6.75 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 6.97-7.07 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 7.11-7.41 (m, 14H, Ph, 4 Guanidin-NH), 8.39 (t, J=5.7 Hz, 1H, HNCH₂Ar-OH), 8.51 (d, J=7.8 Hz, 1H, HNCHCH₂CH₂CH₂), 9.31 (s, 1H, Ar-OH)

MS (⁺FAB): m/z (%) = 1159 ([2MH+I]⁺, 6), 1031 ([2M+H]⁺, 9), 516 (MH⁺, 100), 167 ([Ph₂CH]⁺, 23)

C₃₀H₃₇N₅O₃ • CF₃COOH • H₂O (647.69)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 59.34 H: 6.22 N: 10.81

Gef.: C: 59.49 H: 6.08 N: 10.98

6.4 Synthese von *N*-mono- bzw. *N,N'*-disubstituierten Argininamiden und argininhaltigen Tri- bzw. Pentapeptiden am Wang Harz

6.4.1 Synthese der *S*-Methylisothioharnstoffe

6.4.1.1 Darstellung von *S*-Methylisothiuroniumiodid (**28** • HI)

0.76 g (10 mmol) Thioharnstoff werden in 40 ml 99 %igem Ethanol vorgelegt. Unter Eisbadkühlung werden 1.42 g (10 mmol) Iodmethan zugegeben. Nach einer Stunde Erhitzen unter Rückfluss wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgedampft. Das Rohprodukt wird aus wenig Ethanol mit Ether ausgefällt und mit Ether farblos gewaschen.

S-Methylisothiuroniumiodid (**28** • HI)

Schmp.: 114-115 °C (Lit.: 117 °C [Bernthsen und Klinger, 1878])

Ausbeute: 1.70 g (7.8 mmol, 78 %) weißes Pulver

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3347, 3328 (NH), 3156, 3109 (SCH₃)

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ (ppm) = 2.57 (s, 3H, SCH₃), 8.86-8.94 (br, 4H, NH),

C₂H₆N₂S • HI (218.06)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 11.02 H: 3.24 N: 12.85

Gef.: C: 11.17 H: 3.33 N: 12.69

6.4.1.2 Darstellung der *S*-Methylisothioharnstoff-*N*-carbonsäureester **29** und **30**

N-Methoxycarbonyl-*S*-methylisothioharnstoff (**29**)

6.0 g (27.52 mmol) *S*-Methylisothiuroniumiodid (**28** • HI) werden in 70 ml wasserfreiem Dichlormethan suspendiert. Unter Eisbadkühlung werden 5.57 g (55.04 mmol) Triethylamin zugegeben, woraufhin eine klare Lösung entsteht. Unter Eisbadkühlung werden

anschließend 2.60 g (27.52 mmol) Chlorameisensäuremethylester in 20 ml Dichlormethan zugetropft. Über Nacht wird bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird dreimal mit je 20 ml Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wird abfiltriert, das Lösungsmittel abgedampft. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Chloroform/Methanol (97:3)).

Ausbeute: 2.73 g (18.44 mmol, 67 %), farbloser Feststoff

Schmp.: 70-72 °C (Lit.: 72-77 °C [Lin, 1975])

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 2.51 (s, 3H, SCH₃), 3.76 (s, 3H, CO₂CH₃), 6.63-8.08 (br, 2H, NH)

MS (CI): m/z (%) = 297 ([2M+H]⁺, 2), 149 (MH⁺, 100)

C₄H₈N₂O₂S (148.18)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 32.54 H: 5.44 N: 18.90

Gef.: C: 32.46 H: 5.30 N: 18.69

N-Benzyloxycarbonyl-*S*-methylothioharnstoff (**30**)

6.0 g (27.52 mmol) *S*-Methylisothiuroniumiodid (**28** • HI) werden in 60 ml wasserfreiem Aceton suspendiert. Unter Eisbadkühlung werden 5.57 g (55.04 mmol) Triethylamin zugegeben, wonach eine klare Lösung entsteht. Unter Eisbadkühlung werden anschließend 4.69 g (27.52 mmol) Chlorameisensäurebenzylester in 20 ml Methylenchlorid zugetropft. Über Nacht wird bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird abgedampft, der Rückstand in 80 ml Chloroform aufgenommen und dreimal mit je 20 ml Wasser extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet. Das Trockenmittel wird abfiltriert, das Lösungsmittel i. Vak. abgedampft. Der Rückstand wird mit 100 ml Ether versetzt und zum Sieden erhitzt. Der unlösliche Rückstand wird abfiltriert und verworfen, die Etherlösung wird auf 20 ml eingengt, wonach das gewünschte Produkt bei 0 °C auskristallisiert. Nach dem Absaugen wird **30** an der Ölpumpe getrocknet.

Ausbeute: 4.87 g (21.74 mmol, 79 %), farblose Kristalle

Schmp.: 64-66 °C

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 2.53 (s, 3H, SCH₃), 5.19 (s, 2H, CH₂Ph), 7.29-7.45 (m, 5H, Ph), 7.76-8.53 (br, 2H, NH)

MS (CI): m/z (%) = 449 ([2M+H]⁺, 1), 225 (MH⁺, 100)

C₁₀H₁₂N₂O₂S (224.28)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 53.54 H: 5.39 N: 12.49

Gef.: C: 53.31 H: 5.47 N: 12.46

6.4.1.3 Darstellung der *N*-Acetyl-*S*-Methylisothioharnstoffe 31 und 32

(2,2-Dimethylpropanoyl)-*S*-methylisothioharnstoff (**31**)

4.0 g (18.34 mmol) *S*-Methylisothiuroniumiodid (**28** • HI) werden in 60 ml wasserfreiem Dichlormethan suspendiert. Unter Eisbadkühlung werden 3.71 g (36.68 mmol) Triethylamin zugegeben, wonach eine klare Lösung entsteht. Unter Eisbadkühlung werden anschließend 2.21 g (18.34 mmol) 2,2-Dimethylpropansäurechlorid in 20 ml Dichlormethan zugetropft. Über Nacht wird bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird abgedampft und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Chloroform/ Methanol (95:5)).

Ausbeute: 2.21 g (12.65 mmol, 69 %), farbloser Feststoff

Schmp.: 67-70 °C

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.12 (s, 9H, COC(CH₃)₃), 2.36 (s, 3H, SCH₃), 8.82-9.11 (br, 2H, NH)

MS (CI): m/z (%) = 349 ([2M+H]⁺, 1), 175 (MH⁺, 100)

C₇H₁₄N₂OS (174.26)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 48.25 H: 8.10 N: 16.08

Gef.: C: 48.39 H: 7.91 N: 16.11

4-(Amino(methylsulfanyl)methylidenamino)-4-oxobutansäuremethylester (**32**)

4.14 g (27.52 mmol) des Bernsteinsäuremethylesterchlorids werden mit 6.0 g (27.52 mmol) S-Methylisothiuroniumiodid (**28** • HI) und 5.57 g (55.04 mmol) Triethylamin analog der Vorschrift unter 6.4.1.3 für die Herstellung von N-(2,2-Dimethylpropanoyl)-S-methylisothioharnstoff (**31**) umgesetzt.

Ausbeute: 4.27 g (20.92 mmol, 76 %), farbloses, zähes Öl

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 2.51 (s, 3H, SCH₃), 2.66 (t, J=7.0 Hz, 2H, NCOCH₂CH₂CO₂CH₃), 2.80 (t, J=7.0 Hz, 2H, NCOCH₂CH₂CO₂CH₃), 3.70 (s, 3H, CO₂CH₃), 7.31-8.02 (br, 2H, NH₂)

MS (⁺Cl): m/z (%) = 409 ([2M+H]⁺, 1), 205 (MH⁺, 100)

C₇H₁₂N₂O₃S (204.25)

6.4.1.4 Darstellung von N-[[5-(Ethoxycarbonyl)pentyl]aminocarbonyl]-S-methylisothioharnstoff (**33**)

In 100 ml trockenem Aceton werden 6.0 g (27.52 mmol) S-Methylisothiuroniumiodid (**28** • HI) suspendiert. Bei 0 °C werden 2.78 g (27.52 mmol) Triethylamin zugegeben, woraufhin die Lösung klar wird. Unter Eisbadkühlung werden 5.10 g (27.52 mmol) 6-Isocyanatohexansäureethylester in 25 ml Aceton zugetropft, anschließend wird bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wird abgedampft, der Rückstand in 100 ml Chloroform aufgenommen und dreimal mit je 20 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer i. Vak. abgedampft. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Chloroform/Methanol (97:3)).

Ausbeute: 4.02 g (14.59 mmol, 53 %) zähes leicht gelbliches Öl

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.18 (t, J=7.2 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.23-1.59 (m, 6H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 2.22 (t, J=7.3 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂Et), 2.33 (s, 3H, SCH₃), 2.89 (d, t, J=7.3 Hz, J=5.6 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂Et), 4.04 (q, J=7.1 Hz, 2H, CH₂CH₃), 6.94 (t, J=5.7 Hz, 1H, NH), 8.42 (br, 2H, NH₂)

MS (CI): m/z (%) = 276 (MH^+ , 100)

$C_{11}H_{21}N_3O_3S$ (275.37)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 47.98 H: 7.69 N: 15.26

Gef.: C: 47.73 H: 7.51 N: 15.21

6.4.1.5 Darstellung von *N*-Ethoxycarbonyl-*S*-methylisothioharnstoff (35)

N-Ethoxycarbonylthioharnstoff (34)

In einem 250 ml Rundkolben mit Tropftrichter und Trockenrohr werden 80 ml einer gesättigten methanolischen Ammoniaklösung bei 0 °C vorgelegt. Innerhalb von 1 h werden 2.5 g (19.06 mmol) Ethoxycarbonylisothiocyanat zugetropft. Das Lösungsmittel wird nach 2 h Rühren bei 0 °C am Rotationsverdampfer abgedampft, der Rückstand wird aus einer Mischung von 10 ml Methanol und 50 ml Wasser auskristallisiert, abgesaugt, mit 50 ml eiskaltem Wasser gewaschen und an der Ölpumpe getrocknet.

Ausbeute: 2.40 g (16.20 mmol, 85 %), farbloses Pulver

Schmp.: 136-139 °C (Lit.: 139-140 °C [Rossi, 1955])

1H -NMR ($[D_6]DMSO$): δ [ppm] = 1.23 (t, 3H, $J=7.2$ Hz, CH_2CH_3), 4.10 (q, $J=7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 8.95-10.89 (br, 3H, NH)

MS (EI): m/z (%) = 148 ($[M]^{+}$, 100), 120 ($[M-C_2H_4]^+$, 5), 104 ($[M-CO_2]^+$, 24), 76 ($[M-C_2H_4-CO_2]^+$, 21), 60 ($[S=C=NH_2]^+$, 40), 43 ($[HN=C=NH_2]^+$, 93)

$C_4H_8N_2O_2S$ (148.18)

N-Ethoxycarbonyl-*S*-methylisothioharnstoff (35)

0.77 g (5.20 mmol) *N*-Ethoxycarbonylthioharnstoff (34) werden in 30 ml Ethanol gelöst. Nach Zugabe von 0.72 g (5.20 mmol) Kaliumcarbonat werden 0.74 g (5.20 mmol) Iodmethan zugegeben, und es wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der unlösliche Rückstand

wird abgesaugt und verworfen, das Filtrat wird am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Chloroform/Methanol (95:5)).

Ausbeute: 0.77 g (4.73 mmol, 91 %), farbloser Feststoff

Schmp.: 43-46 °C (Lit.: 44-46 °C [Tam et al., 1979])

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 1.33 (t, J=7.1 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 2.51 (s, 3H, SCH₃), 4.21 (q, J=7.1 Hz, 2H, CO₂CH₂CH₃), 7.28-8.41 (br, 2H, NH)

MS (CI): m/z (%) = 325 ([2M+H]⁺, 1), 163 (MH⁺, 100)

C₅H₁₀N₂O₂S (162.21)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 37.02 H: 6.21 N: 17.27

Gef.: C: 36.95 H: 6.43 N: 17.29

6.4.2 Darstellung von 4-Aminomethylbenzylalkohol (36)

In einen 250 ml Dreihalskolben mit KPG-Rührer, Rückflusskühler und Trockenrohr werden 1.87 g (0.05 mol) Lithiumaluminiumhydrid in einer Mischung von 50 ml abs. Dioxan und 50 ml abs. THF suspendiert. Die Suspension wird 15 min unter kräftigem Rühren unter Rückfluss erhitzt, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und weitergerührt. 2.27 g (15 mmol) 4-Aminomethylbenzoesäure werden in kleinen Portionen dazu gegeben. Nach beendeter Zugabe wird die Suspension unter kräftigem Rühren 10 h unter Rückfluss erhitzt. Man kühlt im Eisbad auf Raumtemperatur ab und gibt nacheinander tropfenweise 6 ml Essigsäureethylester, 2 ml Wasser, 5 ml 15 %ige Natriumhydroxid-Lösung und 2 ml Wasser dazu. Die Mischung wird über eine G4-Glasfritte abgesaugt und der feste Rückstand mit dreimal 50 ml Ethanol extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint und das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Chloroform/Methanol (1:1)) gereinigt.

Ausbeute: 1.09 g (7.95 mmol, 53 %), beiger Feststoff

Schmp.: 95-97 °C (Lit.: 97-98 °C [Yu and Taylor, 1999])

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 3.72 (s, 2H, ArCH₂NH₂), 4.46 (s, 2H, ArCH₂OH), 5.07-5.54 (br, 3H, CH₂OH, CH₂NH₂), 7.24 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, CH₂ArCH₂), 7.29 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, CH₂ArCH₂)

MS (CI): m/z (%) = 275 ([2M+H]⁺, 3), 155 ([M+NH₄]⁺, 20), 138 (MH⁺, 100)

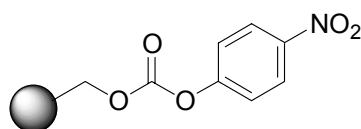
C₈H₁₁NO (137.18)

6.4.3 Durchführung der Festphasensynthese von monosubstituierten Guanidinen, Tri- und Pentapeptiden am p-Nitrophenylcarbonat Wang-Harz

0.2 g (0.20 mmol, bei einem Substitutionsgrad von 1.00 mmol/g) p-Nitrophenylcarbonat Wang-Harz werden in eine Stickstoffritze überführt. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte werden unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

1. Umsetzung mit S-Methylisothiuroniumiodid (28 • HI)

S-Methylisothiuroniumiodid (28 • HI) (1.0 mmol) und 202 mg (1.00 mmol) Triethylamin werden in 5 ml abs. Dichlormethan gelöst und auf das p-Nitrophenylcarbonat Wang-Harz gegeben. Die Reaktionslösung über dem Harz verfärbt sich neongelb. Man schüttelt 24 h bei Raumtemperatur. Nach Absaugen des Lösungsmittels wird das Harz mit DMF (3 x 5 ml), THF (3 x 5 ml), Methanol (3 x 5 ml) und Dichlormethan (3 x 5 ml) gewaschen und i. Vak. getrocknet. Bei positivem Kaiser-Test wird Schritt 2 durchgeführt.

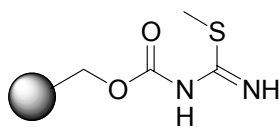


**4-Nitrophenylcarbonat-
Wang-Harz**

Abbildung 6-10

2. Umsetzung von P27 mit Di-tert-butyldicarbonat

218 mg (1.00 mmol) Di-tert-butyldicarbonat und 101 mg (1.00 mmol) Triethylamin werden in 5 ml abs. Dichlormethan gelöst und zum Harz **P27** gegeben. Man schüttelt 24 h bei Raumtemperatur. Nach Absaugen des Lösungsmittels wird das Harz mit DMF (3 x 5 ml), THF (3 x 5 ml), Methanol (3 x 5 ml) und Dichlormethan (3 x 5 ml) gewaschen und i. Vak. getrocknet. Bei negativem Kaiser-Test wird Schritt 3 durchgeführt.

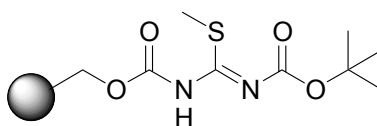


P27

Abbildung 6-11

3. Umsetzung von **P34** mit (*R*)-*N*^α-Fmoc-ornithin-9-fluorenylmethyl-ester-trifluoracetat (**20 • CF₃COOH**)

P34 wird mit 646 mg (1.00 mmol) **20 • CF₃COOH** und mit 101 mg (1.00 mmol) Triethylamin analog zu der in 6.3.4 (Schritt 6) beschriebenen Vorgehensweise umgesetzt.

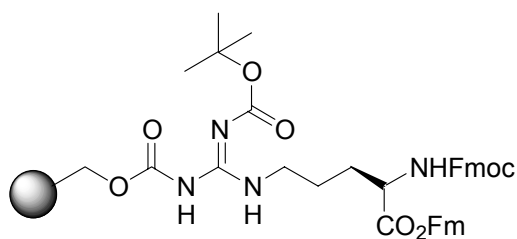


P34

Abbildung 6-12

4. Abspaltung der Fmoc- und Fm-Schutzgruppen von **P41**

Die Abspaltung erfolgt analog zu der in 6.3.4 (Schritt 7) beschriebenen Vorgehensweise.



P41

Abbildung 6-13

5. Umsetzung von **P48** mit Diarylessigsäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-estern (**8**, **8a**, **9**, **10**) bzw. aktivierten Aminosäuren (**AS1-AS3**) und Dipeptiden (**Di1-Di4**)

Die Umsetzung erfolgt analog zu der in 6.3.4 (Schritt 8) beschriebenen Vorgehensweise mit jeweils 1.00 mmol Diarylessigsäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-ester (**8**, **8a**, **9**, **10**), aktivierter Aminosäure (**AS1-AS3**) oder Dipeptid (**Di1-Di4**).

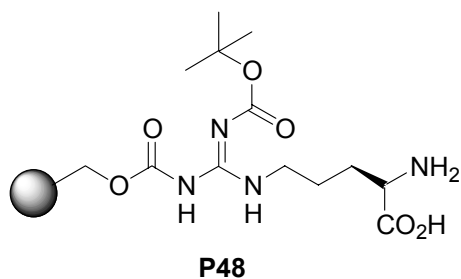
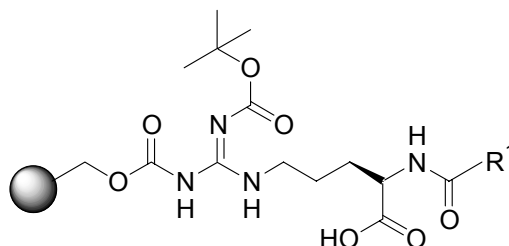


Abbildung 6-14

6. Umsetzung von **P49-P59** mit den Benzylaminen **A1, A2** bzw. den Aminosäuren **AS4, AS5** und Dipeptiden **Di5, Di6**

Die Umsetzung erfolgt analog zu der in 6.3.4 (Schritt 9) beschriebenen Vorgehensweise mit je 1.00 mmol der Benzylamine (**A1, A2**) bzw. der Aminosäuren (**AS4, AS5**) und Dipeptide (**Di5, Di6**), 321 mg (1.00 mmol) TBTU und 101 mg (1.00 mmol) Triethylamin.

Tabelle 6-3: Polymergebundene Argininamide **P49-P52**, Dipeptide **P53-P55** und Tripeptide **P56-P59**



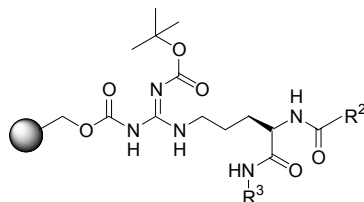
Nr.	R ¹
P49	
P50	
P51	
P52	

Nr.	R ¹
P53	
P54	
P55	
P56	
P57	
P58	
P59	

7. Abspaltung der Argininamide (37-43), Tripeptide (44-49) und Pentapeptide (50-55) vom Harz P72-P90

Die Abspaltung erfolgt analog zu der in 6.3.4 (Schritt 10) beschriebenen Vorgehensweise.

Tabelle 6-4: Polymergebundene Argininamide **P72-P78**, Tripeptide **P79-P84** und Pentapeptide **P85-P90**



Nr.	R ²	R ³
P72		
P73		
P74		
P75		
P76		
77		
P78		

Nr.	R ²	R ³
P79		
P80		
P81		
P82		
P83		
P84		
P85		
P86		
P87		
P88		
P89		
P90		

6.4.3.1 Monosubstituierte Guanidine 37-43

(*R*)-*N*^α-(2-Cyclohexyl-2-phenylacetyl)-*N*-[(4-fluorphenyl)methyl]argininamid (**37**)

Die Abspaltung erfolgt mit 7N Chlorwasserstoffsäure in Methanol

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 39 mg (0.074 mmol, 37 %), farbloser, hygroskopischer Schaum

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 0.55-2.06 (m, 15H, CH₂CH₂CH₂NH, NHCOCHPhC₆H₁₁), 2.91-3.16 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 3.19-3.34 (m, 1H, COCHPhC₆H₁₁), 4.12-4.38 (m, 3H, CHCH₂CH₂CH₂, NHCH₂Ar-F), 6.58-7.48 (m, 13H, NHCH₂Ar-F, NHCOCHPhC₆H₁₁, 4 x NH-Guanidin), 8.27-8.42 (m, 2H, NH), 8.51 (t, J=6.1 Hz, 1H, CONHCH₂Ar-F)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 482 (MH⁺, 100), 278 (13), 250 (18)

C₂₇H₃₆FN₅O₂ • 1.4 HCl (532.65)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 60.88 H: 7.08 N: 13.14

Gef.: C: 60.81 H: 7.27 N: 12.86

(*R*)-*N*^α-Diphenylacetyl-*N*-[(4-fluorphenyl)methyl]argininamid (**38**)

Die Abspaltung erfolgt mit 10 %iger Bromwasserstoffsäure in Eisessig

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 19 mg (0.034 mmol, 17 %), beiges, zähes Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.21-1.79 (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 2.99-3.15 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 4.19-4.38 (m, 3H, CONHCH₂Ar-F, CHCH₂CH₂CH₂NH), 5.12 (s, 1H, COCHPh₂), 7.02-7.43 (m, 15H, CH₂Ar-F, COCHPh₂, 3 x NH-Guanidin), 7.66-8.24 (br, 2H, NH), 8.44-8.67 (m, 2H, CONHCH₂Ar-F, CHNHCOCHPh₂)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 951.5 ([2M+H]⁺, 1), 476.1 (MH⁺, 100)

$C_{27}H_{30}FN_5O_2 \bullet CH_3CN \bullet 0.65 HBr$ (569.20 g/mol)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 61.19 H: 5.96 N: 14.76

Gef.: C: 61.16 H: 5.76 N: 14.51

(*R*)-*N*^α-(2,2-Diphenylpropanoyl)-*N*-[(4-fluorphenyl)methyl]argininamid (**39**)

Die Abspaltung erfolgt mit 7N Chlorwasserstoffsäure in Methanol

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 41 mg (0.070 mmol, 35 %), farbloses, zähes Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.19-1.78 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 1.90 (s, 3H, COCCH₃Ph₂), 3.06 (q, J=6.3 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 4.25 (d, J=5.9 Hz, 2H, NHCH₂Ar-F), 4.31-4.44 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 6.92-7.32 (m, 18H, COCCH₃Ph₂, CH₂Ar-F, 4 x NH-Guanidin), 7.72-7.87 (m, 1H, NH), 8.56 (t, J=5.9 Hz, 1H, CONHCH₂Ar-F)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 979.5 ([2M+H]⁺, 1), 490.2 (MH⁺, 100)

$C_{28}H_{32}FN_5O_2 \bullet 0.75 CH_3CN \bullet 2 HCl$ (593.30 g/mol)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 59.72 H: 6.11 N: 13.57

Gef.: C: 59.81 H: 6.42 N: 13.26

(*R*)-*N*^α-3,3-Diphenylpropanoyl-*N*-[(4-fluorphenyl)methyl]argininamid (**40**)

Die Abspaltung erfolgt mit 95 %iger Trifluoressigsäure

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 38 mg (0.076 mmol, 38 %), hygroskopischer Schaum

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.05-1.67 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 2.75-3.01 (m, 4H, COCH₂CHPh₂, CH₂CH₂CH₂NH), 4.08-4.27 (m, 3H, CH₂CHPh₂, NHCH₂Ar-F), 4.37-4.53 (m,

1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 7.06-7.38 (m, 18H, CH₂CHPh₂, CH₂Ar-F, 4 x NH-Guanidin), 8.05-8.16 (br, 1H, NH), 8.23 (d, J=8.3 Hz, 1H, CONHCH), 8.38 (t, J=6.1 Hz, 1H, CONHCH₂Ar-F)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 979 ([2M+H]⁺, 1), 490 (MH⁺, 100)

C₂₈H₃₂FN₅O₂ • 0.15 CF₃COOH (506.68)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 67.09 H: 6.39 N: 13.82

Gef.: C: 67.10 H: 6.42 N: 13.79

(R)-N^α-(2-Cyclohexyl-2-phenylacetyl)-N-[(4-methoxyphenyl)methyl]argininamid (**41**)

Die Abspaltung erfolgt mit 7N Chlorwasserstoffsäure in Methanol

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/Methanol (1:1)).

Ausbeute: 39 mg (0.064 mmol, 32 %), farbloser, hygroskopischer Schaum

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 0.56-2.02 (m, 15H, CH₂CH₂CH₂NH, NHCOCHPhC₆H₁₁), 2.91-3.14 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 3.25-3.39 (m, 1H, COCHPhC₆H₁₁), 3.71 (s, 3H, Ar-OCH₃), 4.05-4.35 (m, 3H, CHCH₂CH₂CH₂, NHCH₂Ar-OMe), 6.84-6.89 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OMe), 7.09-7.14 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OMe), 7.21-7.45 (m, 9H, NHCH₂Ar-OMe, NHCOCHPhC₆H₁₁, 4 x NH-Guanidin), 8.23-8.45 (m, 2H, NH), 8.47 (t, J=6.2 Hz, 1H, CONHCH₂Ar-OMe)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 987 ([2M+H]⁺, 1), 494 (MH⁺, 100)

C₂₈H₃₉N₅O₃ • CH₃CN • 2.35 HCl (620.37)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 58.08 H: 7.21 N: 13.54

Gef.: C: 58.44 H: 7.55 N: 13.54

(*R*)-*N*^α-(2,2-Diphenylpropanoyl)-*N*-[(4-methoxyphenyl)methyl]argininamid (**42**)

Die Abspaltung erfolgt mit 7N Chlorwasserstoffsäure in Methanol

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 37 mg (0.068 mmol, 34 %), farbloses Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.21-1.82 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 1.90 (s, 3H, COCCH₃Ph₂), 2.98-3.12 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 3.73 (s, 3H, Ar-OCH₃), 4.16 (d, J=5.5 Hz, 2H, CONHCH₂Ar-OMe), 4.31-4.43 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 6.81-6.95 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OMe), 7.10-7.37 (m, 16H, COCCH₃Ph₂, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OMe, 4 x NH-Guanidin), 7.69-7.80 (br, 1H, NH), 8.43 (t, J=5.7 Hz, 1H, CONHCH₂Ar-OMe)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1003 ([2M+H]⁺, 1), 502 (MH⁺, 100)

C₂₉H₃₅N₅O₃ • H₂O • 0.6 HCl (541.52)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 64.32 H: 7.00 N: 12.93

Gef.: C: 64.22 H: 6.92 N: 12.83

(*R*)-*N*^α-(3,3-Diphenylpropanoyl)-*N*-[(4-methoxyphenyl)methyl]argininamid (**43**)

Die Abspaltung erfolgt mit Eisessig

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 23 mg (0.038 mmol, 19 %, farbloser), hygroskopischer Schaum

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.16-1.68 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 2.76-3.14 (m, 4H, COCH₂CHPh₂, CH₂CH₂CH₂NH), 3.73 (s, 3H, Ar-OCH₃), 4.06-4.24 (m, 3H, COCH₂CHPh₂, NHCH₂Ar-OMe), 4.36-4.55 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 6.81-6.95 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OMe), 7.12-7.34 (m, 16H, COCH₂CHPh₂, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OMe, 4 x NH-Guanidin), 7.71-7.80 (m, 1H, NH), 8.12-8.29 (m, 2H, NH)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1003 ([2M+H]⁺, 1), 502 (MH⁺, 100)

$C_{29}H_{35}N_5O_3 \bullet 1.85 CH_3COOH$ (612.71)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 64.10 H: 6.97 N: 11.43

Gef.: C: 64.09 H: 6.72 N: 11.39

6.4.3.2 Tripeptide 44-49

L-Phenylalanyl-*D*-arginyl-*L*-phenylalaninmethylester (**44**)

Die Abspaltung erfolgt mit 7N Chlorwasserstoffsäure in Methanol

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 44 mg (0.082 mmol, 41 %), farbloses Harz

1H -NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 0.91-2.03 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2NH$), 2.75-3.02 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_2NH$), 3.11-3.23 (m, 4H, 2 x $CHCH_2Ph$), 3.62 (s, 3H, $CHCO_2CH_3$), 3.81-4.58 (m, 3H, $CHCH_2CH_2CH_2NH$, $NHCHCO_2Me$, $COCHNH_2$), 7.08-7.34 (m, 13H, 2 x *Ph*, 3 x *NH*), 7.36-8.73 (br, 6H, *NH*)

MS (^+ESI): m/z (%) = 966 ($[2M+H]^+$, 1), 483 (MH^+ , 100)

$C_{25}H_{34}N_6O_4 \bullet MeOH \bullet 0.5 HCl$ (532.85)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 58.61 H: 7.28 N: 15.77

Gef.: C: 58.96 H: 7.02 N: 15.55

L-Leucyl-*D*-arginyl-*L*-phenylalaninmethylester (**45**)

Die Abspaltung erfolgt mit Eisessig

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 14 mg (0.028 mmol, 14 %), farbloses Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 0.85 (d, J=5.9 Hz, 6H, CHCH₂CH(CH₃)₂), 1.08-1.90 (m, 7H, CH₂CH₂CH₂NH, CHCH₂CH(CH₃)₂), 2.70-3.23 (m, 5H, CHCH₂Ph, CH₂CH₂CH₂NH, CHCH₂CH(CH₃)₂), 3.61 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.02-4.63 (m, 2H, CHCH₂CH₂CH₂NH, CHCH₂Ph), 7.05-7.34 (m, 7H, Ph, 2 x NH), 7.36-9.02 (br, 6H, NH)

MS (*ESI): m/z (%) = 713 ([2M+H]⁺, 1), 357 (MH⁺, 100)

C₂₂H₃₆N₆O₄ • 1.1 CH₃COOH (450.38)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 56.48 H: 7.91 N: 16.33

Gef.: C: 56.21 H: 8.05 N: 16.54

L-Prolyl-*D*-arginyl-*L*-phenylalaninmethylester (**46**)

Die Abspaltung erfolgt mit 95 %iger Trifluoressigsäure.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 34 mg (0.066 mmol, 33 %), farbloses Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.12-1.90 (m, 6H, CH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂CH), 2.12-2.37 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂CH), 2.82-3.24 (m, 6H, CHCH₂Ph, CH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂CH), 3.95-4.08 (m, 1H, NHCH₂CH₂CH₂CH), 4.28-4.58 (m, 2H, CHCH₂CH₂CH₂NH, CHCH₂Ph), 7.01-7.50 (m, 7H, Ph, 2 x NH), 7.54-8.71 (br, 5H, NH)

MS (*ESI): m/z (%) = 866 ([2M+H]⁺, 1), 433 (MH⁺, 100)

C₁₅H₂₈N₆O₄ • 3 H₂O • 0.25 CF₃COOH (515.09)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 50.13 H: 7.48 N: 16.32

Gef.: C: 49.86 H: 7.18 N: 16.67

L-Phenylalanyl-*D*-arginyl-*L*-alaninmethylester (**47**)

Die Abspaltung erfolgt mit 10 %iger Bromwasserstoffsäure in Eisessig

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 21 mg (0.044 mmol, 22 %), farbloses Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.27 (d, $J=7.5$ Hz, 3H, CHCH₃), 1.35-1.71 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 2.71-3.10 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH, CHCH₂Ph), 3.72-3.84 (m, 1H, CHCH₂Ph), 4.19-4.37 (m, 2H, CHCH₂CH₂CH₂NH, NHCHCO₂CH₃), 4.94-6.00 (br, 2H, NH₂), 6.86-7.53 (m, 8H, Ph, 3 x NH), 7.78 (t, $J=5.4$ Hz, 1H, NH), 8.38 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, NH), 8.54 (d, $J=7.1$ Hz, 1H, NH)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 813 ([2M+H]⁺, 1), 407 (MH⁺, 100)

C₁₉H₃₀N₆O₄ • 0.8 HBr (471.21)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 48.43 H: 6.59 N: 17.83

Gef.: C: 48.13 H: 6.93 N: 17.72

L-Leucyl-*D*-arginyl-*L*-alaninmethylester (**48**)

Die Abspaltung erfolgt mit 10 %iger Bromwasserstoffsäure in Eisessig

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 17 mg (0.036 mmol, 18 %), farbloses Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 0.8 (d, $J=6.7$ Hz, 6H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.23-1.80 (m, 10H, CH₂CH₂CH₂NH, CHCH₂CH(CH₃)₂, CHCH₃), 3.01-3.20 (m, 3H, CH₂CH₂CH₂NH, COCHNH₂), 3.61 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.19-4.42 (m, 2H, CHCH₂CH₂CH₂NH, NHCHCO₂CH₃), 6.77-7.58 (br, 2H, NH), 7.81-7.98 (m, 1H, NH), 8.20-8.36 (m, 1H, NH), 8.45-8.69 (m, 1H, NH)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 746 ([2M+H]⁺, 1), 373 (MH⁺, 100)

C₁₆H₃₂N₆O₄ • MeOH • 0.75 HBr (465.19 g/mol)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 43.89 H: 7.96 N: 18.07

Gef.: C: 43.75 H: 8.18 N: 18.18

L-Prolyl-*D*-arginyl-*L*-alaninmethylester (**49**)

Die Abspaltung erfolgt mit 95 %iger Trifluoressigsäure

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 35 mg (0.078 mmol, 39 %), farbloses Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.17-2.36 (m, 10H, CH₂CH₂CH₂NH, CHCH₃, NHCH₂CH₂CH₂CH), 2.75-3.19 (m, 5H, CH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂CH), 3.63 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.03-4.46 (m, 2H, CHCH₂CH₂CH₂NH, NHCHCO₂CH₃), 6.5-9.49 (br, 6H, NH)

MS (*ESI): m/z (%) = 713.8 ([2M+H]⁺, 1), 357.2 (MH⁺, 100)

C₁₅H₂₈N₆O₄ • 3 H₂O • 0.35 CF₃COOH (450.38)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 41.87 H: 7.69 N: 18.66

Gef.: C: 41.71 H: 7.38 N: 18.94

6.4.3.3 Pentapeptide 50-55

L-Prolyl-*L*-phenylalanyl-*D*-arginyl-*L*-alanyl-*L*-alaninmethylester (**50**)

Die Abspaltung erfolgt mit 10 %iger Bromwasserstoffsäure in Eisessig

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 12 mg (0.018 mmol, 9 %), farbloses Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.19-1.34 (m, 6H, 2 x CHCH₃), 1.41-2.11 (m, 8H, CH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂CH), 2.65-3.20 (m, 6H, CH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂CH, CHCH₂Ph), 3.61 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.70-3.81 (m, 1H, NHCH₂CH₂CH₂CH), 4.05-4.40 (m, 3H,

COCHNH), 4.52-4.75 (m, 1H, COCHNH), 6.89-7.57 (m, 9H, *Ph*, 4 x NH), 7.59-8.72 (br, 5H, NH)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1149 ([2M+H]⁺, 7), 575 (MH⁺, 100), 433 (32), 288 (58)

C₂₇H₄₂N₈O₆ • 0.85 HBr (643.44)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 50.40 H: 6.71 N: 17.42

Gef.: C: 50.22 H: 7.12 N: 17.76

L-Alanyl-*L*-leucyl-*D*-arginyl-*L*-alanyl-*L*-alaninmethylester (**51**)

Die Abspaltung erfolgt mit 95 %iger Trifluoressigsäure

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 23 mg (0.036 mmol, 18 %), farbloses Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 0.88 (d, J=6.7 Hz, 6H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.16-1.91 (m, 16H, 3 x CHCH₃, CH₂CH₂CH₂NH, CHCH₂CH(CH₃)₂), 3.03-3.18 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 3.61 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.81-3.93 (m, 1H, COCHNH₂), 4.18-4.51 (m, 4H, 2 x CHCH₃, CHCH₂CH₂CH₂NH, CHCH₂CH(CH₃)₂), 6.85-7.61 (br, 4H, NH), 7.74 (t, J=5.5 Hz, 1H, NH), 8.04-8.42 (m, 4H, NH), 8.57 (d, J=7.7 Hz, 1H, NH)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1029 ([2M+H]⁺, 1), 515 (MH⁺, 16), 258 (100)

C₂₂H₄₂N₈O₆ • CF₃COOH (628.64)

L-Valyl-*L*-phenylalanyl-*D*-arginyl-*L*-alanyl-*L*-alaninmethylester (**52**)

Die Abspaltung erfolgt mit 95 %iger Trifluoressigsäure

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 22 mg (0.032 mmol, 16 %), farbloses Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 0.56-0.89 (m, 6H, CHCH(CH₃)₂), 1.20-1.76 (m, 10H, 2 x CHCH₃, CH₂CH₂CH₂NH), 1.96-2.01 (m, 1H, CHCH(CH₃)₂), 2.71-3.18 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH, CHCH₂Ph), 3.22-3.51 (m, 1H, CHCH(CH₃)₂), 3.60 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.16-4.44 (m, 3H, COCHNH), 4.52-4.75 (m, 1H, COCHNH), 6.91-7.49 (m, 8H, Ph, 3 x NH), 7.61-7.81 (m, 1H, NH), 8.01-8.42 (m, 4H, NH)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 577 (MH⁺, 7), 478 (26), 296 (100)

C₂₇H₄₄N₈O₆ • CF₃COOH (690.71)

L-Alanyl-*L*-phenylalanyl-*D*-arginyl-*L*-glycyl-*L*-glycinethylester (**53**)

Die Abspaltung erfolgt mit 95 %iger Trifluoressigsäure

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 23.84 mg (0.042 mmol, 21 %), farbloses Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.10 (t, J=7.1 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1.16-1.94 (m, 7H, CHCH₃, CH₂CH₂CH₂NH), 2.70-3.21 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH, CHCH₂Ph), 3.55-3.94 (m, 7H, 2 x COCH₂NH, CO₂CH₂CH₃, COCHNH₂), 4.06-4.35 (m, 1H, COCHNH), 4.47-4.72 (m, 1H, COCHNH), 6.80-7.65 (m, 9H, Ph, 4 x NH), 7.73-8.65 (br, 6H, NH)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 535 (MH⁺, 6), 282 (25), 275 (100)

C₂₄H₃₈N₈O₆ • 0.25 H₂O • 0.25 CF₃COOH (567.63)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 51.84 H: 6.88 N: 19.74

Gef.: C: 52.16 H: 7.14 N: 19.38

L-Alanyl-*L*-leucyl-*D*-arginyl-*L*-glycyl-*L*-glycinethylester (**54**)

Die Abspaltung erfolgt mit 10 %iger Bromwasserstoffsäure in Eisessig

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 15 mg (0.026 mmol, 13 %), farbloses Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 0.86 (d, J=6.3 Hz, 6H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.09 (t, J=7.1 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1.33-1.83 (m, 10H, CHCH₃, CH₂CH₂CH₂NH, CHCH₂CH(CH₃)₂), 3.01-3.15 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 3.59-3.90 (m, 7H, CO₂CH₂CH₃, 2 x COCH₂NH, COCHNH₂), 4.16-4.42 (m, 2H, CHCH₂CH₂CH₂NH, CHCH₂CH(CH₃)₂), 6.85-7.60 (br, 4H, NH), 7.77-8.10 (br, 2H, NH), 8.16-8.41 (br, 4H, NH)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 502 (MH⁺, 7), 251 (27), 243 (100)

C₂₁H₄₀N₈O₆ • 0.75 HBr (561.27)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 44.94 H: 7.32 N: 19.96

Gef.: C: 44.48 H: 7.59 N: 20.19

L-Prolyl-*L*-phenylalanyl-*D*-arginyl-*L*-glycyl-*L*-glycinethylester (**55**)

Die Abspaltung erfolgt mit 10 %iger Bromwasserstoffsäure in Eisessig

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Acetonitril/ Methanol (1:1)).

Ausbeute: 15 mg (0.024 mmol, 12 %), farbloses Harz

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.19 (t, J=7.1 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1.28-1.98 (m, 8H, CH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂CH), 2.72-3.22 (m, 6H, CHCH₂Ph, CH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂CH), 3.46-3.56 (m, 1H, NHCH₂CH₂CH₂CH), 3.68-3.93 (m, 4H, 2 x COCH₂NH), 4.08 (q, J=7.1 Hz, 2H, CO₂CH₂CH₃), 4.24-4.39 (m, 1H, COCHNH), 4.51-4.73 (m, 1H, COCHNH), 6.86-7.47 (m, 7H, Ph, 2 x NH), 7.70-7.84 (m, 1H, NH), 8.05-8.48 (m, 6H, NH)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 561 (MH⁺, 16), 547 (14), 281 (100), 274 (67)

C₂₆H₄₀N₈O₆ • 0.7 HBr (617.29)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 50.59 H: 6.64 N: 18.15

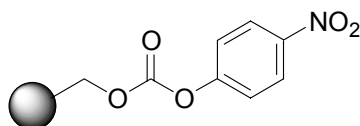
Gef.: C: 50.62 H: 6.84 N: 18.55

6.4.4 Durchführung der Festphasensynthese von disubstituierten Guanidinen am para-Nitrophenylcarbonat Wang-Harz

0.2 g (0.20 mmol, bei einem Substitutionsgrad von 1.00 mmol/g) p-Nitrophenylcarbonat Wang-Harz werden in eine Stickstoffritze überführt. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte werden unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

1. Umsetzung mit den substituierten S-Methylisothioharnstoffen **29-33, 35**

1.00 mmol eines substituierten S-Methylisothioharnstoffes (**29-33, 35**) und 101 mg (1.00 mmol) Triethylamin werden in 5 ml abs. Dichlormethan gelöst und auf das para-Nitrophenylcarbonat Wang-Harz gegeben. Die Reaktionslösung über dem Harz verfärbt sich neongelb. Man schüttelt 24 h bei Raumtemperatur. Nach Absaugen des Lösungsmittels wird das Harz mit DMF (3 x 5 ml), THF (3 x 5 ml), Methanol (3 x 5 ml) und Dichlormethan (3 x 5 ml) gewaschen und i. Vak. getrocknet. Auf die Durchführung des Kaiser-Tests wird hier verzichtet. Anschließend wird Schritt 2 durchgeführt.



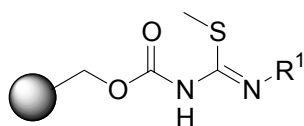
**4-Nitrophenylcarbonat-
Wang-Harz**

Abbildung 6-15

2. Umsetzung von **P28-P33** mit (*R*)-*N*^α-Fmoc-ornithin-9-fluorenylmethylester-trifluoracetat (**20** • CF₃COOH))

P28-P33 werden mit 646.65 mg (1.00 mmol) **20** und mit 101.19 mg (1.00 mmol) Triethylamin analog zu der in 6.3.4 (Schritt 6) beschriebenen Vorgehensweise umgesetzt.

Tabelle 6-5: Polymergebundene S-Methylisothioharnstoffe **P28-P33**



**P28, P29, P30, P31,
P32, P33**

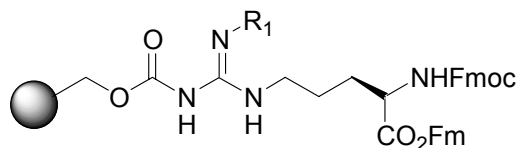
Nr.	R ¹
P28	
P29	
P30	
P31	
P32	
P33	

3. Abspaltung der Fmoc- und Fm-Schutzgruppen von **P35-P40**

Die Abspaltung erfolgt analog zu der in 6.3.4 (Schritt 7) beschriebenen Vorgehensweise.

Bei positivem Kaiser-Test wird Schritt 4 durchgeführt.

Tabelle 6-6: Polymergebundene Argininamide **P35-P40**



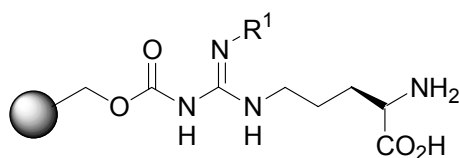
**P35, P36, P37, P38,
P39, P40**

Nr.	R ¹
P35	
P36	
P37	
P38	
P39	
P40	

4. Umsetzung von **P42-P47** mit den Diarylessigsäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-estern **8, 10, 11**

Die Umsetzung von **P42-P47** erfolgt analog zu der in 6.3.4 (Schritt 8) beschriebenen Vorgehensweise mit jeweils 1.00 mmol Diarylessigsäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-ester (**8, 10, 11**). Bei negativem Kaiser-Test wird Schritt 5 durchgeführt.

Tabelle 6-7: Polymergebundene N^G -substituierte Arginine **P42-P47**



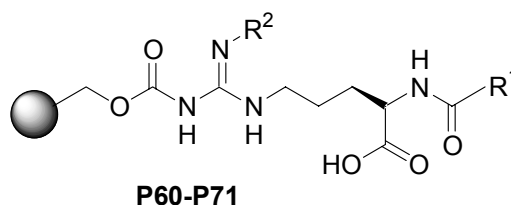
**P42, P43, P44, P45,
P46, P47**

Nr.	R ¹
P42	
P43	
P44	
P45	
P46	
P47	

5. Umsetzung von **P60-P71** mit den Benzylaminen **22**, **36**, **A4**

Die Umsetzung von **P60-P71** erfolgt analog zu der in 6.3.4 (Schritt 9) beschriebenen Vorgehensweise mit 1.00 mmol der Benzylamine **22**, **36** oder **A4**, 321 mg (1.00 mmol) TBTU und 101 mg (1.00 mmol) Triethylamin.

Tabelle 6-8: Polymergebundene Argininamide **P60-P71**

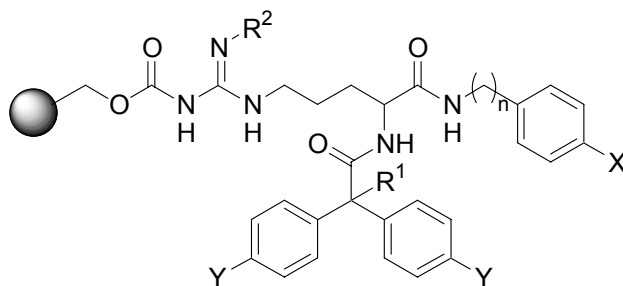


Nr.	R ²	R ¹
P60	-CO ₂ -CH ₂ CH ₃	
P61	-CO ₂ -CH ₃	
P62	-CO ₂ -CH ₂ Ph	
P63	-CO ₂ -NH-(CH ₂) ₅ -CO ₂ -CH ₂ CH ₃	
P64	-CO ₂ -CH ₃	
P65	-CO ₂ -CH ₂ CH ₃	
P66	-CO ₂ -CH ₂ Ph	
P67	-CO-C(CH ₃) ₃	
P68	-CO-C(CH ₃) ₃	
P69	-CO ₂ -CH ₂ Ph	
P70	-CO ₂ -CH ₃	
P71	-CO ₂ -CH ₂ CH ₃	

6. Abspaltung der Argininamide **26, 56-68** vom Harz **P91-P104**

Die Abspaltung erfolgt analog zu der in 6.3.4 (Schritt 10) beschriebenen Vorgehensweise.

Tabelle 6-9: Polymergebundene Argininamide **P91-P104**



P91-P104

Nr.	Y	X	n	R ¹	R ²		
P91	H	-OH	1	H	-CO-OCH ₂ CH ₃		
P92		H			-CO-NH-(CH ₂) ₅ -CO ₂ CH ₂ CH ₃		
P93		-CH ₂ OH			-CH ₃	-CO-C(CH ₃) ₃	
P94	Cl			H	-CO-OCH ₂ CH ₃		
P95	H			-OH	2	-CH ₃	-CO-OCH ₂ Ph
P96							-CO-OCH ₃
P97							-CO-OCH ₂ CH ₃
P98	H	H			-CO-OCH ₃		
P99					-CO-OCH ₂ CH ₃		
P100					-CO-OCH ₂ Ph		
P101					-CO-OCH ₃		
P102	Cl	-CH ₂ OH	1	H	-CO-OCH ₂ CH ₃		
P103					-CO-OCH ₂ Ph		
P104					-CO-C(CH ₃) ₃		

7. Charakterisierung der Zwischenprodukte von Argininamid **26**

Zur besseren Charakterisierung der Zwischenprodukte von **26** werden diese nach den Syntheseschritten 2, 3 und 4 von den polymeren Trägern **P40**, **P47**, **P60** abgespalten. Man erhält die Zwischenprodukte **23**, **24**, **25** bei der Behandlung von **P40**, **P47** und **P60** mit TFA (analog der Abspaltung vom Rink-Amid Harz) Diese Abspaltungen erfolgen analog zu Schritt 6. Alle angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die Menge bzw. Beladung des eingesetzten Harzes.

(*R*)-*N*^α-Diphenylacetyl-*N*^ε-{[5-(ethoxycarbonyl)pentyl]aminocarbonyl}-*N*-(phenylmethyl)-argininamid (**56**)

Die Abspaltung erfolgt mit 95 %iger Trifluoressigsäure

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Chloroform/Methanol (5:1)).

Ausbeute: 29 mg (0.044 mmol, 22 %), farbloser, amorpher, hygroskopischer Feststoff

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.17 (t, J=7.0 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1.21-2.03 (m, 10H, CH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂Et), 2.26 (t, J=7.3 Hz, 2H, CH₂CH₂CO₂Et), 2.86-3.23 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CO₂Et), 4.04 (q, J=7.0 Hz, 2H, CO₂CH₂CH₃), 4.10-4.20 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 4.26 (d, J=5.5 Hz, 2H, NHCH₂Ph), 5.00 (s, 1H, COCHPh₂), 7.15-7.40 (m, 19H, 3 x *Ph*, 4 x *NH*), 7.56-7.64 (br, 1H, *NH*), 8.41-8.57 (m, 2H, *NH*)

MS (*ESI): m/z (%) = 1285 ([2M+H]⁺, 1), 643 (MH⁺, 38), 335 (100)

C₃₆H₄₆N₆O₅ • 0.1 CF₃COOH (654 g/mol)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 66.46 H: 7.12 N: 12.85

Gef.: C: 66.40 H: 6.78 N: 12.73

(*R*)-*N*^G-(2,2-Dimethylpropanoyl)-*N*^α-2,2-diphenylpropanoyl-*N*-[(4-hydroxymethylphenyl)methyl]argininamid (**57**)

Die Abspaltung erfolgt mit 95 %iger Trifluoressigsäure

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Chloroform/Methanol (5:1)).

Ausbeute: 55 mg (0.078 mmol, 39 %), farbloser amorpher hygroskopischer Feststoff

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.07 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.10-1.78 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 1.81 (s, 3H, C(CH₃)Ph₂), 2.96-3.23 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 4.23 (d, J=5.5 Hz, 2H, NHCH₂ArCH₂OH), 4.31-4.42 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 4.46 (s, 2H, ArCH₂OH), 5.01-5.12 (br, 1H, ArCH₂OH), 6.81-6.99 (br, 1H, NH), 7.09-7.36 (m, 18H, CH₂ArCH₂OH, 2 x *Ph*, 4 x NH), 8.38 (t, J=5.7 Hz, 1H, CONHCH₂Ar)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1171 ([2M+H]⁺, 2), 586 (MH⁺, 100)

C₃₄H₄₃N₅O₄ • CF₃COOH (699.76)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 69.72 H: 7.40 N: 11.96

Gef.: C: 69.54 H: 7.56 N: 11.85

(*R*)-*N*^α-Bis(4-chlorphenyl)acetyl-*N*^G-ethoxycarbonyl-*N*-[(4-hydroxyphenyl)methyl]argininamid (**58**)

Die Abspaltung erfolgt mit 95 %iger Trifluoressigsäure

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Chloroform/Methanol (7:1)).

Ausbeute: 43 mg (0.066 mmol, 33 %), farbloser amorpher hygroskopischer Feststoff

¹H-NMR (CD₃OD): δ [ppm] = 1.24 (t, J=7.0, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1.22-1.87 (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 3.01-3.26 (m, 2H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 4.05 (q, J=7.0 Hz, 2H, CO₂CH₂CH₃), 4.25 (d, J=5.9 Hz, 2H, HNCH₂Ar-OH) 4.33-4.47 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 5.07 (s, 1H, Ph₂CH), 6.66-6.79 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 6.99-7.10 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 7.15-7.37 (m, 8H, *Ph*)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1227 ([2M+H]⁺, 1), 614 (MH⁺, 100)

$C_{30}H_{33}Cl_2N_5O_5 \bullet 2 H_2O$ (650.56 g/mol)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 55.43 H: 5.67 N: 10.91

Gef.: C: 55.39 H: 5.73 N: 10.77

(*R*)-*N*^G-Benzyloxycarbonyl-*N*^α-2,2-diphenylpropanoyl-*N*-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]argininamid (**59**)

Die Abspaltung erfolgt mit 95 %iger Trifluoressigsäure.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Chloroform/Methanol (6:1)).

Ausbeute: 47 mg (0.064 mmol, 32 %), farbloser amorpher hygroskopischer Feststoff

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.13-1.72 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 1.88 (s, 3H, COCCH₃Ph₂), 2.51-2.60 (m, 2H, CH₂CH₂Ar-OH), 2.98-3.10 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 3.11-3.26 (m, 2H, NHCH₂CH₂Ar-OH), 4.22-4.35 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 4.98 (s, 2H, OCH₂Ph), 6.62-6.70 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 6.74-6.82 (m, 1H, NH), 6.92-7.01 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 7.13-7.43 (m, 18H, 3 x Ph, 3 x NH), 7.95 (t, J=5.7 Hz, 1H, CONHCH₂CH₂Ar-OH), 9.17 (s, 1H, OH)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1171 ([2M+H]⁺, 2), 586 (MH⁺, 100)

$C_{37}H_{41}N_5O_5 \bullet 0.9 CF_3COOH$ (738.37)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 63.12 H: 5.72 N: 9.49

Gef.: C: 63.25 H: 5.94 N: 9.73

(*R*)-*N*^α-2,2-Diphenylpropanoyl-*N*-[(4-hydroxyphenyl)ethyl]-*N*^G-methoxycarbonylargininamid (**60**)

Die Abspaltung erfolgt mit 95 %iger Trifluoressigsäure.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Chloroform/Methanol (6:1)).

Ausbeute: 52 mg (0.074 mmol, 37 %), farbloser amorpher hygroskopischer Feststoff

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.19-1.68 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 1.88 (s, 3H, C(CH₃)Ph₂), 2.54 (t, J=7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂Ar-OH), 2.98-3.08 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 3.09-3.27 (m, 2H, NHCH₂CH₂Ar-OH), 3.46 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.25-4.33 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 6.64-6.69 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 6.77 (d, J=6.1 Hz, 1H, CHNHCO), 6.93-7.00 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 7.13-7.35 (m, 13H, 2 x Ph, 3 x NH), 7.92 (t, J=5.9 Hz, 1H, CONHCH₂CH₂Ar-OH), 9.15 (s, 1H, OH)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1119 ([2M+H]⁺, 2), 560 (MH⁺, 100)

C₃₁H₃₇N₅O₅ • CF₃COOH • CH₃OH (705.72)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 61.87 H: 6.00 N: 9.92

Gef.: C: 61.71 H: 5.95 N: 9.73

(*R*)-*N*^α-2,2-Diphenylpropanoyl-*N*^G-ethoxycarbonyl-*N*-[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]argininamid
(61)

Die Abspaltung erfolgte mit 95 %iger Trifluoressigsäure.

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Chloroform/Methanol (6:1)).

Ausbeute: 42 mg (0.060 mmol, 30 %), farbloser amorpher hygroskopischer Feststoff

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.26 (t, J=7.1 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1.18-1.71 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 1.88 (s, 3H, C(CH₃)Ph₂), 2.51-2.60 (m, 2H, CH₂CH₂Ar-OH), 2.97-3.08 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 3.10-3.27 (m, 2H, NHCH₂CH₂Ar-OH), 3.95 (q, J=7.1 Hz, 2H, CO₂CH₂CH₃), 4.24-4.34 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 6.62-6.70 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 6.77 (d, J=6.5 Hz, 1H, CHNHCO), 6.92-7.00 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 7.11-7.38 (m, 13H, 2 x Ph, 3 x NH), 7.94 (t, J=5.8 Hz, 1H, CONHCH₂CH₂Ar-OH), 9.17 (s, 1H, OH)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1147 ([2M+H]⁺, 2), 574 (MH⁺, 100)

C₃₂H₃₉N₅O₅ • CF₃COOH • H₂O (705.72)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 60.86 H: 6.00 N: 9.92

Gef.: C: 62.00 H: 5.99 N: 10.10

(*R*)-*N*^α-Diphenylacetyl-*N*^G-methoxycarbonyl-*N*-(phenylmethyl)argininamid (**62**)

Die Abspaltung erfolgt mit 95 %iger Trifluoressigsäure.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Chloroform/Methanol (5:1)).

Ausbeute: 36 mg (0.068 mmol, 34 %), farbloser amorpher hygroskopischer Feststoff

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.47-2.03 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 3.07-3.18 (m, 2H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 3.45 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.07-4.21 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 4.37 (d, J=5.2 Hz, 2H, NHCH₂Ph), 5.00 (s, 1H, COCHPh₂), 7.13-7.43 (m, 19H, 3 x Ph, 4 x NH), 7.51-7.68 (br, 1H, NH), 8.49 (d, J=7.9 Hz, 1H, CHNHCO)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1031.5 ([2M+H]⁺, 1), 516.3 (MH⁺, 100), 331.0 (78)

C₂₉H₃₃N₅O₄ • 0.15 CF₃COOH (532.70)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 66.06 H: 6.27 N: 13.15

Gef.: C: 66.32 H: 6.21 N: 13.27

(*R*)-*N*^α-Diphenylacetyl-*N*^G-ethoxycarbonyl-*N*-(phenylmethyl)argininamid (**63**)

Die Abspaltung erfolgt mit Eisessig.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Chloroform/Methanol (5:1)).

Ausbeute: 29 mg (0.046 mmol, 23 %), farbloser amorpher hygroskopischer Feststoff

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.13 (t, J=7.1 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1.30-2.03 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 2.96-3.19 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 3.92 (q, J=7.1 Hz, 2H, CO₂CH₂CH₃), 4.07-4.21 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 4.26 (d, J=5.3 Hz, 2H, NHCH₂Ph), 5.01 (s, 1H,

COCHPh₂), 7.12-7.38 (m, 19H, 3 x *Ph*, 4 x *NH*), 7.53-7.65 (b, 1H, *NH*), 8.49 (d, J=7.7 Hz, 1H, CHNHCO)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1059 ([2M+H]⁺, 1), 530 (MH⁺, 100), 331 (13)

C₃₀H₃₅N₅O₄ • 1.1 CH₃COOH • 0.2 CHCl₃ (619.56)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 62.81 H: 6.44 N: 11.30

Gef.: C: 63.08 H: 6.05 N: 10.98

(*R*)-*N*^G-Benzyloxycarbonyl-*N*^α-diphenylacetyl-*N*(phenylmethyl)argininamid (**64**)

Die Abspaltung erfolgt mit 95 %iger Trifluoressigsäure.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Chloroform/Methanol (5:1)).

Ausbeute: 46 mg (0.072 mmol, 36 %), farbloser, amorpher, hygroskopischer Feststoff

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.27-2.03 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 3.00-3.18 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 4.07-4.20 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 4.26 (d, J=5.3, 2H, NHCH₂Ph), 4.96 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.00 (s, 1H, COCHPh₂), 7.14-7.40 (m, 24H, 4 x *Ph*, 4 x *NH*), 7.55-7.63 (br, 1H, *NH*), 8.50 (d, J=7.8 Hz, 1H, CHNHCO)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1183 ([2M+H]⁺, 1), 592 (MH⁺, 21), 284 (100)

C₃₀H₃₅N₅O₄ x 0.4 CF₃COOH (637.31)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 67.47 H: 5.91 N: 10.98

Gef.: C: 67.68 H: 6.18 N: 10.78

(*R*)-*N*^α-Bis(4-chlorphenyl)acetyl-*N*-[(4-hydroxymethylphenyl)methyl]-*N*^G-methoxycarbonyl-argininamid (**65**)

Die Abspaltung erfolgt mit 95 %iger Trifluoressigsäure.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Chloroform/Methanol (7:1)).

Ausbeute: 47 mg (0.066 mmol, 33 %), farbloser amorpher hygroskopischer Feststoff

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.25-1.76 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 2.99-3.15 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 3.64 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.24 (d, J=5.9 Hz, 2H, NHCH₂ArCH₂OH), 4.27-4.38 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 4.46 (d, J=5.2 Hz, 2H, ArCH₂OH), 5.13 (t, J=5.3 Hz, 1H, ArCH₂OH), 5.15 (s, 1H, COCH(Ar-Cl)₂), 7.19-7.17 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, CH₂ArCH₂OH), 7.18-7.25 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, CH₂ArCH₂OH), 7.25-7.32 (m, 4H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, 2 x Ar-Cl), 7.33-7.41 (m, 4H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, 2 x Ar-Cl), 7.09-7.41 (br, 4H, NH), 8.48 (t, J=5.9 Hz, 1H, CONHCH₂Ar), 8.57 (d, J=7.9 Hz, 1H, CHNHCO)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1229 ([2M+H]⁺, 3), 614 (MH⁺, 100)

C₃₀H₃₃Cl₂N₅O₅ • H₂O • 0.7 CF₃COOH (712.35)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 52.94 H: 5.05 N: 9.83

Gef.: C: 52.77 H: 5.13 N: 9.88

(*R*)-*N*^α-Bis(4-chlorphenyl)acetyl-*N*^G-ethoxycarbonyl-*N*-[(4-hydroxymethylphenyl)methyl]argininamid (**66**)

Die Abspaltung erfolgt mit 95 %iger Trifluoressigsäure.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Chloroform/Methanol (7:1)).

Ausbeute: 39 mg (0.058 mmol, 29 %), farbloser amorpher hygroskopischer Feststoff

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.12 (t, J=7.1 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1.29-1.72 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 3.01-3.13 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 3.90 (q, J=7.1 Hz, 2H, CO₂CH₂CH₃), 4.24 (d, J=5.9 Hz, 2H, NHCH₂ArCH₂OH), 4.28-4.36 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 4.46 (d,

J=4.9 Hz, 2H, ArCH₂OH), 5.11-5.16 (m, 2H, ArCH₂OH, COCH(Ar-Cl)₂), 6.38-6.56 (br, 1H, NH), 7.10-7.18 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, CH₂ArCH₂OH), 7.18-7.27 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, CH₂ArCH₂OH), 7.25-7.33 (m, 4H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, 2 x Ar-Cl), 7.33-7.40 (m, 4H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, 2 x Ar-Cl), 7.10-7.40 (br, 1H, NH), 7.75-8.03 (br, 2H, NH), 8.48 (t, J=5.7 Hz, 1H, CONHCH₂Ar), 8.58 (d, J=8.2 Hz, 1H, CHNHCO)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1257 ([2M+H]⁺, 2), 628 (MH⁺, 100)

C₃₁H₃₅Cl₂N₅O₅ • 0.4 CF₃COOH (674.16)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 56.66 H: 5.29 N: 10.38

Gef.: C: 56.58 H: 5.41 N: 10.66

(*R*)-*N*⁶-Benzyloxycarbonyl-*N*^α-bis(4-chlorphenyl)acetyl-*N*-[(4-hydroxymethylphenyl)]argininamid (**67**)

Die Abspaltung erfolgt mit 95 %iger Trifluoressigsäure.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Chloroform/Methanol (7:1)).

Ausbeute: 47 mg (0.070 mmol, 35 %), farbloser amorpher hygroskopischer Feststoff

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.29-1.73 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 2.99-3.14 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 4.24 (d, J=5.7 Hz, 2H, NHCH₂ArCH₂OH), 4.28-4.35 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 4.46 (d, J=5.5 Hz, 2H, ArCH₂OH), 4.96 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.11-5.15 (m, 2H, ArCH₂OH, COCH(Ar-Cl)₂), 6.44-6.66 (br, 1H, NH), 7.11-7.19 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, CH₂ArCH₂OH), 7.19-7.29 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, CH₂ArCH₂OH), 7.25-7.30 (m, 4H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, 2 x Ar-Cl), 7.31-7.42 (m, 9H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, 2 x Ar-Cl, Ph), 7.10-7.40 (br, 1H, NH), 7.82-8.01 (br, 2H, NH), 8.48 (t, J=5.9Hz, 1H, CONHCH₂Ar), 8.58 (d, J=8.0 Hz, 1H, CHNHCO)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1380 ([2M+H]⁺, 5), 690 (MH⁺, 100), 475 (21)

$C_{36}H_{37}Cl_2N_5O_5 \bullet H_2O$ (674.16)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 61.02 H: 5.55 N: 9.88

Gef.: C: 61.00 H: 5.28 N: 10.08

(*R*)-*N*^G-Bis(4-chlorphenyl)acetyl-*N*^G-(2,2-dimethylpropanoyl)-*N*-[(4-hydroxymethylphenyl)methyl]argininamid (**68**)

Die Abspaltung erfolgt mit 95 %iger Trifluoressigsäure.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel Chloroform/Methanol (7:1)).

Ausbeute: 43 mg (0.062 mmol, 31 %), farbloser amorpher hygroskopischer Feststoff

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.11 (s, 9H, COC(CH₃)₃), 1.19-1.77 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂NH), 3.00-3.21 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂NH), 4.24 (d, J=5.8 Hz, 2H, NHCH₂ArCH₂OH), 4.29-4.39 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 4.46 (s, 2H, ArCH₂OH), 5.08-5.18 (m, 2H, ArCH₂OH, COCH(Ar-Cl)₂), 6.34-6.69 (br, 1H, NH), 7.10-7.17 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, CH₂ArCH₂OH), 7.17-7.29 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, CH₂ArCH₂OH), 7.23-7.32 (m, 4H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, 2 x Ar-Cl), 7.32-7.41 (m, 4H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, 2 x Ar-Cl), 7.10-7.40 (br, 3H, NH), 8.50 (t, J=5.2 Hz, 1H, CONHCH₂Ar), 8.58 (d, J=7.6 Hz, 1H, CHNHCO), 8.73-8.99 (br, 1H, NH)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1281 ([2M+H]⁺, 5), 640 (MH⁺, 100)

$C_{33}H_{39}Cl_2N_5O_5 \bullet 0.5 CF_3COOH$ (697.61)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 58.54 H: 5.71 N: 10.04

Gef.: C: 58.52 H: 5.85 N: 10.20

6.4.5 HPLC-Untersuchung zur Bestimmung der stereochemischen Reinheit der Argininamide und Peptide **38, 43, 46, 50, 60, 68**

Probenvorbereitung:

Die Argininamide und Peptide **38, 43, 46, 50, 60, 68** werden in 500 µl halbkonz. Salzsäure gelöst und 15 h bei 90-95 °C (im thermostatierten Heizbad) inkubiert. Nach zehnmütiger Zentrifugation (4000 rpm, Raumtemperatur) wird der Überstand quantitativ entnommen und über Nacht im Vakuumkonzentrator bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in soviel 0.1 M HCl gelöst, dass man eine Konzentration von 10 mg/ml erhält.

Reagenzien:

Derivatisierungsreagenz: 13.4 mg o-Phthaldialdehyd (OPA) und 16.3 mg *N*-Acetyl-*L*-Cystein (NAC; Aldrich 98 %) werden in 1 ml Methanol (p.a.) gelöst und auf Eis im Dunkeln aufbewahrt.

Boratpuffer zur Derivatisierung: 0.1 M Na₂B₄O₇ • 10 H₂O werden in 2 N NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 9.5 eingestellt.

Natriumacetatpuffer für die mobile Phase: 5.443 g CH₃CO₂Na • 3 H₂O werden in 1 l Millipore-Wasser gelöst und mit 1 %iger HOAc auf einen pH-Wert von 6.5 eingestellt.

5 mg (*RS*)-Arginin werden in 1 ml 0.1 M HCl gelöst.

Derivatisierung:

22.5 µl Probenlösung werden mit 22.5 µl 0.1 M Boratpuffer und 45 µl Derivatisierungsreagenz versetzt und 1 min geschüttelt. Nach einer Derivatisierungsdauer von exakt 15 min (Raumtemperatur, Lichtausschluß) wird die Reaktionsmischung mit 450 µl 40 mM Natriumacetatpuffer pH=6.5 (mobile Phase) verdünnt.

Chromatographische Untersuchung:

Die Analyse wird an einer HPLC-Anlage (TSP Spectra System AS 3000) mit einer Purospher RP-18e Säule (5 µm) (250 x 4 mm) [Merck, Darmstadt] durchgeführt.

Mobile Phase: 40 mM Natriumacetatpuffer pH=6.5, Acetonitril

Gradient: 0-33 % Acetonitril in 40 min

Fluss: 0.9 ml, Temperatur: Raumtemperatur, UV-Detektion: 338 nm

Injektionsvolumen: 20 μ l

Zum Spiken wurden die Probenlösungen im Verhältnis 1:1 mit (RS)-Argininlösung versetzt

6.5 Darstellung nicht strahlender (kalter) Analoga potentieller Radioliganden für NPY Y₁-Rezeptoren

6.5.1 Synthese des Ornithinamids 73 • HBr

6.5.1.1 Synthese von (*R*)-*N* ^{α} -Benzyloxycarbonyl-*N* ^{δ} -*tert*-Butoxycarbonylornithin (69)

5.00 g (*R*)-*N* ^{δ} -Benzyloxycarbonylornithin (21.51 mmol) werden in einem 250 ml Kolben unter Stickstoffatmosphäre in einem Gemisch aus 80 ml Wasser und 30 ml Dioxan suspendiert. Nach der Zugabe von 3.80 g (45.0 mmol) Natriumhydrogencarbonat werden portionsweise 4.04 g (23.66 mmol) Chlorameisensäurebenzylester innerhalb von 30 min bei 0 °C zugetropft. Über Nacht wird bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer auf 50 ml eingeeengt und am pH-Meter mit 2 N Salzsäure auf pH 2 eingestellt. Es wird dreimal mit je 50 ml Essigester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, das Trockenmittel wird abfiltriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgedampft und das verbleibende Produkt an der Ölpumpe getrocknet.

(*R*)-*N* ^{α} -Benzyloxycarbonyl-*N* ^{δ} -*tert*-Butoxycarbonylornithin (69)

Ausbeute: 7.43 g (20.42 mmol, 95 %), farbloser Feststoff

Schmp.: 96-98 °C (Lit.: 97-99 °C [Schnabel, 1967])

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3435, 3313 (NH), 3026 (Ar-H), 2978, 2971 (CH), 1709, 1658 (CO), 1254, 1107, 962

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.26-1.79 (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 1.31 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃), 2.80-2.95 (m, 2H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 3.84-3.99 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 5.10 (s, 2H, OCH₂Ph), 6.78 (t, 1H, J=5.6 Hz, CH₂NHCO₂C(CH₃)₃), 7.23-7.46 (m, 5H, Ph), 7.55 (d, J=7.8 Hz, NHCHCH₂CH₂), 12.51 (br, 1H, CO₂H)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 750 ([2M+NH₄]⁺, 50), 733 ([2M+H]⁺, 42), 384 ([M+NH₄]⁺, 61), 367 (MH⁺, 55), 157 (100)

C₁₈H₂₆N₂O₆ (366.41)

6.5.1.2 Darstellung von (R)-N^α-Benzyloxycarbonyl-N^δ-tert.-butoxycarbonyl-N-[(4-methoxyphenyl)methyl]ornithinamid (70)

3.04 g (8.30 mmol) (R)-N^α-Benzyloxycarbonyl-N^δ-tert.-butoxycarbonylornithin (**69**) werden in 50 ml abs. THF gelöst und mit 1.35 g (8.30 mmol) N,N'-Carbonyldiimidazol versetzt. Sobald die CO₂-Entwicklung beendet ist, gibt man zu dieser Lösung 1.14 g (8.30 mmol) 4-Methoxybenzylamin, gelöst in wenig abs. THF. Man rührt über Nacht, entfernt das Lösungsmittel i. Vak.. Der Rückstand wird in 50 ml Wasser suspendiert und dreimal mit je 30 ml Chloroform extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Die Rohprodukte werden durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Chloroform/Methanol (10:1) gereinigt.

(R)-N^α-Benzyloxycarbonyl-N^δ-tert.-butoxycarbonyl-N-[(4-methoxyphenyl)methyl]ornithinamid (**70**)

Ausbeute: 2.70 g (5.56 mmol, 67 %), farbloser Feststoff

Schmp.: 104-106 °C

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3421, 3323 (NH), 3017, 3005 (Ar-H), 2976, 2969, 2960 (CH), 1713, 1661 (CO), 1267, 1199, 809

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.31-1.74, (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 1.37 (s, 3H, CO₂C(CH₃)₃), 2.81-2.99 (m, 2H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 3.72 (s, 3H, ArOCH₃), 3.92-4.07 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 4.21 (d, J=5.9 Hz, 2H, NHCH₂Ar-OMe), 5.03 (s, 2H, OCH₂Ph), 6.79 (t, J=5.0 Hz, 1H, CH₂NHCO₂C(CH₃)₃), 6.81-6.90 (m, 2H, AA' Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OMe), 7.07-7.21 (m, 2H, BB' Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OMe), 7.28-7.41 (m, 5H, Ph), 8.33 (t, J=5.7 Hz, 1H, NHCH₂Ar-OMe)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 971 ([2M+H]⁺, 2), 508 ([M+Na]⁺, 8), 486 (MH⁺, 100), 430 ([M-C₄H₈]⁺, 19), 386 ([M+H-Boc]⁺, 13)

$C_{26}H_{35}N_3O_6$ (485.57 g/mol)

6.5.1.3 (*R*)-*N*^δ-*tert*-butoxycarbonyl-*N*-[(4-methoxyphenyl)methyl]ornithin-amid (**71**)

2.92 g (6.01 mmol) (*R*)-*N*^α-Benzyloxycarbonyl-*N*^δ-*tert*-butoxycarbonyl-*N*-[(4-methoxyphenyl)methyl]ornithinamid werden in 30 ml Methanol suspendiert. Nach Zugabe von 500 mg Katalysator (Pd/C, 10 %) wird 15 h im Autoklaven bei einem H₂-Druck von 5 bar unter Rühren hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert, das Lösungsmittel wird i. Vak. abgedampft. Das so erhaltene Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt.

(*R*)-*N*^δ-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*-[(4-methoxyphenyl)methyl]ornithinamid (**71**)

Ausbeute: 2.09 g (5.95 mmol, 99 %, farbloser Schaum)

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.32-1.80, (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 1.37 (s, 3H, CO₂C(CH₃)₃), 2.81-2.95 (m, 2H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 3.72 (s, 3H, ArOCH₃), 4.10-4.17 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 4.23 (d, J=5.8 Hz, 2H, NHCH₂Ar-OMe), 6.71-6.95 (m, 3H, AA' Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OMe, CH₂NHCO₂C(CH₃)₃), 7.07-7.21 (m, 2H, BB' Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OMe), 8.31 (t, J=5.9 Hz, 1H, NHCH₂Ar-OMe)

MS (*ESI): m/z (%) = 703 ([2M+H]⁺, 2), 352 (MH⁺, 100), 252 ([M+H-Boc]⁺, 3)

$C_{18}H_{29}N_3O_4$ (351.44 g/mol)

6.5.1.4 (*R*)-*N*^δ-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*^α-diphenylacetyl-*N*-[(4-methoxyphenyl)methyl]ornithinamid (**72**)

0.44 g (2.06 mmol) Diphenylelessigsäure werden in 25 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst. Bei Raumtemperatur werden 0.33 g (2.06 mol) *N,N'*-Carbonyldiimidazol zugegeben. Es wird bis zum Ende der Gasentwicklung gerührt. Anschließend wird eine Lösung von 0.72 g (2.06 mmol) (*R*)-*N*^δ-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*-[(4-methoxyphenyl)methyl]ornithinamid (**71**) in 25 ml Dichlormethan zugegeben und über Nacht gerührt. Die Lösung wird anschließend zweimal mit je 15 ml Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird abgedampft. Das verbleibende Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Chloroform/Methanol (97:3)).

Ausbeute: 0.78 g (1.42 mmol, 69 %), farbloser Schaum

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3433, 3315 (NH), 3024, 3009 (Ar-H), 2989, 2981, 2975 (CH), 1719, 1664 (CO), 1357, 1093, 776

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.23-1.76 (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 1.36 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃), 2.78-2.95 (m, 2H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 3.72 (s, 3H, ArOCH₃), 4.11-4.37 (m, 3H, NHCH₂ArOMe, CHCH₂CH₂CH₂NH), 5.11 (s, 1H, COCHPh₂), 6.78-6.86 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OMe), 7.08-7.14 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OMe), 7.22-7.38 (m, 11H, 2 x *Ph*, NH), 8.36 (t, J=5.7 Hz, 1H, HNCH₂ArOMe), 8.46 (d, J=7.5 Hz, 1H, HNCHCH₂CH₂CH₂)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1129 ([2M+K]⁺, 8), 1113 ([2M+NH₄]⁺, 6), 584 ([M+K]⁺, 100), 546 (MH⁺, 78)

C₃₂H₃₉N₃O₅ (545.67 g/mol)

6.5.1.5 (*R*)-*N*^α-Diphenylacetyl-*N*-[(4-hydroxyphenyl)methyl]ornithinamid (73)

1.88 g (3.45 mmol) des Ornithinamids **72** werden unter N₂-Atmosphäre bei 0 °C in 80 ml wasserfreiem Dichlormethan vorgelegt. Langsam werden 7.0 ml (7.0 mmol) BBr₃-Lösung (1M in Dichlormethan) zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Bei 0 °C wird mit 10 ml Wasser vorsichtig hydrolysiert, anschließend wird i. Vak. zur Trockne eingedampft. Das Rohprodukt wird zur Reinigung an Kieselgel (Laufmittel: Chloroform/Methanol (7:1)) chromatographiert.

Ausbeute: 1.34 g (2.62 mmol, 76 %), farbloser hygroskopischer Schaum

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.38-1.80 (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 2.75 (t, J=6.9 Hz, 2H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 4.04-4.47 (m, 3H, CHCH₂CH₂CH₂, HNCH₂ArOH), 5.13 (s, 1H, Ph₂CHCO), 6.64-6.78 (m, 2H, AA'-Teil des AA'BB'-Systems, CH₂ArOH), 6.94-7.06 (m, 2H, BB'-Teil des AA'BB'-Systems, CH₂ArOH), 7.15-7.35 (m, 10H, *Ph*), 7.61 (br, 3H, NH₃⁺), 8.37 (t, J=5.8 Hz, 1H, HNCH₂ArOH), 8.54 (d, J=7.7 Hz, 1H, HNCHCH₂CH₂CH₂), 9.30 (s, 1H, ArOH)

MS (⁺FAB): m/z (%) = 863 ([2M+H]⁺, 1), 432 (MH⁺, 100), 167 (Ph₂CH⁺, 64)

$C_{26}H_{29}N_3O_3 \bullet HBr$ (512.44 g/mol)

6.5.2 Synthese des Guanylierungsmittels *N*-[5-(*tert*-Butoxycarbonylamino)pentanoyl]-*S*-methylothioharnstoff

6.5.2.1 Darstellung von (*N*-*tert*-butoxycarbonylamino)pentansäure (74)

Zu einer Lösung von 5.86 g (50.02 mmol) 5-Aminopentansäure und 10.51 g (125.05 mmol) Natriumhydrogencarbonat in 100 ml Wasser wird eine Lösung von 13.10 g (60.02 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat in 100 ml Dioxan gegeben. Die Mischung wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 100 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird mit 1 N Salzsäure bis pH 2 angesäuert und viermal mit je 50 ml Essigsäureethylester ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (100 ml) ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird verworfen, die organische trocknet man über Natriumsulfat und dampft i. Vak. ein.

(*N*-*tert*-butoxycarbonylamino)pentansäure (74)

Ausbeute: 9.67 g (44.51 mmol, 89%), farbloses Öl

1H -NMR ($[D_6]DMSO$): δ [ppm] = 1.24-1.65 (m, 4H, $NHCH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$), 1.37 (s, 9H, $NHCO_2C(CH_3)_3$), 2.19 (t, $J=6.9$ Hz, 2H, $NHCH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$), 2.89 (q, $J=6.2$ Hz, 2H, $NHCH_2CH_2CH_2CH_2CO_2H$), 6.78 (t, $J=5.4$ Hz, 1H, $CH_2NHCO_2C(CH_3)_3$), 11.97 (br, 1H, $COOH$)

MS (^+Cl): m/z (%) = 435 ($[2M+H]^+$, 1), 235 ($[M+NH_4]^+$, 20), 218 (MH^+ , 12), 179 ($[M+NH_4-C_4H_8]^+$, 100)

$C_{10}H_{19}NO_4$ (217.26 g/mol)

6.5.2.2 (*tert*-Butoxycarbonylamino)pentansäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-ester (75)

6.38 g (29.36 mmol) Boc-geschützte Aminopentansäure **74** und 3.7 g (32.30 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid werden in 100 ml Dichlormethan gelöst und im Eisbad auf 5 °C abgekühlt. Anschließend gibt man 6.66 g (32.30 mmol) DCC gelöst in 50 ml Dichlormethan tropfenweise dazu. Man rührt 1 h bei 5 °C weiter und danach weitere 16 h bei Raumtemperatur. Das ausgefallene Material wird abgesaugt, das Filtrat wird i. Vak. eingedampft und das erhaltene weiße amorphe Rohprodukt aus Ether/Hexan (1:1) umkristallisiert. [Doughty et. al, 1993]

Ausbeute: 5.17 g (16.44 mmol, 56 %), weiße glänzende Schuppen

Schmp.: 83-85 °C

IR (KBr): ν (cm⁻¹) = 3437, 3312 (NH), 2991, 2979 (CH), 1756, 1689 (CO)

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.27-1.66 (m, 4H, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CO₂Su), 1.37 (s, 9H, NHCO₂C(CH₃)₃), 2.67 (t, J=7.1 Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CO₂Su), 2.81 (s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.93 (q, J=6.2 Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CO₂Su), 6.84 (t, J=5.7 Hz, 1H, CH₂NHCO₂C(CH₃)₃)

MS (⁺CI): m/z (%) = 315.4 (MH⁺, 25), 117.1 (100)

C₁₄H₂₂N₂O₆ (314.33 g/mol)

6.5.2.3 *N*-[*tert*-Butoxy-carbonylaminopentanoyl]-*S*-methylisothioharnstoff (76)

1.38 g (6.33 mmol) *S*-Methylisothuroniumiodid (**28** • HI) werden in 60 ml wasserfreiem Aceton suspendiert. Unter Eisbadkühlung werden 1.28 g (12.66 mmol) Triethylamin zugegeben, wodurch eine klare Lösung entsteht. Unter Eisbadkühlung werden anschließend 1.99 g (6.33 mmol) **75** in 20 ml Dichlormethan zugetropft. Über Nacht wird bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird abgedampft, der Rückstand in 80 ml Chloroform aufgenommen und dreimal mit je 20 ml Wasser extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgedampft. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Chloroform/Methanol (95:5)).

Ausbeute: 1.52 g (5.25 mmol, 83 %), farbloses zähes Öl

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.24-1.69 (m, 4H, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CON), 1.37 (s, 9H, NHCO₂C(CH₃)₃), 2.17-2.38 (m, 5H, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CON, SCH₃), 2.89 (q, J=6.5 Hz, 2H, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CON), 6.80 (br, 1H, CH₂NHCO₂C(CH₃)₃), 8.79-9.23 (br, 2H, NH₂)

MS (⁺CI): m/z (%) = 290 (MH⁺, 100), 276 (10)

C₁₂H₂₃N₃O₃S (289.40 g/mol)

6.5.3 Synthese von (R)-N^G-(5-Aminopentanoyl)-N^α-diphenylacetyl-N-[(4-hydroxyphenyl)methyl]argininamid **78**

6.5.3.1 (R)-N^G-[5-(tert-Butoxycarbonylamino)pentanoyl]-N^α-diphenylacetyl-N-[(4-hydroxyphenyl)methyl]argininamid (**77**)

0.6 g (1.4 mmol) des (R)-Ornithinamids **73** wird in 15 ml wasserfreiem Acetonitril gelöst. Es wird 0.41 g (1.4 mmol) des N-substituierten S-Methylisothioharnstoffs **76** zugegeben. Anschließend wird mit Gasableitungsrohr 24 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird abgedampft und das gewünschte Produkt säulenchromatographisch an Kieselgel (Laufmittel: Chloroform/Methanol (8:1)) gereinigt.

Ausbeute: 0.31 g (0.38 mmol, 27 %), weißes hygroskopisches Pulver

¹H-NMR (CD₃OD): δ [ppm] = 1.39-1.90 (m, 8H, CHCH₂CH₂CH₂NH, COCH₂CH₂CH₂CH₂NH), 1.42 (s, 9H, CO₂C(CH₃)₃), 2.17-2.37 (m, 2H, COCH₂CH₂CH₂CH₂NH), 2.99-3.20 (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂NH, COCH₂CH₂CH₂CH₂NH), 4.24 (d, J=5.1 Hz, 2H, NHCH₂Ar-OH), 4.36-4.44 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 5.07 (s, 1H, COCHPh₂), 6.64-6.72 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 7.01-7.14 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 7.20-7.31 (m, 10H, 2 x Ph)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1345 ([2M+H]⁺, 2), 673.4 (MH⁺, 100)

C₃₇H₄₈N₆O₆ • 1.75 HBr (814.41)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 54.57 H: 6.16 N: 10.32

Gef.: C: 54.47 H: 6.09 N: 10.23

6.5.3.2 (*R*)-*N*^G-(5-Aminopentanoyl)-*N*^α-diphenylacetyl-*N*-[(4-hydroxyphenyl)methyl]argininamid (**78**)

0.5 g **77** • 1.75 HBr (0.61 mmol) wird in 7 ml abs. Dichlormethan gelöst und mit 7 ml Trifluoressigsäure versetzt. Anschließend rührt man über Nacht bei Raumtemperatur. Die Säure und das Lösungsmittel wird i. Vak entfernt. Um Säurereste zu entfernen wird das Rohprodukt mit 30 ml Methanol versetzt und 5 min gerührt. Der Alkohol wird danach i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 0.51 g (0.61 mmol, 100 %), zähes farbloses Harz

¹H-NMR (CD₃OD): δ [ppm] = 1.28-1.93 (m, 8H, CHCH₂CH₂CH₂NH, COCH₂CH₂CH₂CH₂NH), 2.41-2.52 (m, 2H, COCH₂CH₂CH₂CH₂NH), 2.95-3.22 (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂NH, COCH₂CH₂CH₂CH₂NH), 4.24 (d, J=5.1 Hz, 2H, NHCH₂Ar-OH), 4.38-4.49 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 5.06 (s, 1H, COCHPh₂), 6.63-6.75 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 7.00-7.16 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 7.21-7.35 (m, 10H, 2 x Ph)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1145 ([2M+H]⁺, 1), 573 (MH⁺, 22), 474 (30), 287 (100)

C₃₂H₄₀N₆O₄ • 3 H₂O • 2 CF₃COOH (826.78)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 50.84 H: 5.85 N: 10.16

Gef.: C: 50.89 H: 5.57 N: 10.38

6.5.4 Synthese der „kalten“ Markierungsreagenzien 79 und 81

6.5.4.1 Propansäure-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-ester (79)

4.2 ml (32.5 mmol) Propansäureanhydrid, 2.0 g (17.4 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid und 50 µl konz. Salzsäure werden 15 min unter Rückfluß erhitzt. Man läßt die braune Flüssigkeit auf Raumtemperatur abkühlen und extrahiert mit Hexan (2 x 40 ml). Die untere der beiden Phasen wird mit 30 ml Essigsäureethylester versetzt, zuerst mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (2 x 20 ml), dann mit gesättigter Natriumchloridlösung (2 x 20 ml) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak entfernt, das zurückbleibende Öl wird mit 40 ml Diethylether versetzt und 24 h bei –20 °C aufbewahrt. Die entstandenen weißen Kristalle werden abgesaugt, mit –20 °C kaltem Diethylether gewaschen (2 x 20 ml) und i. Vak. getrocknet.

Ausbeute: 1.28 g (7.48 mmol, 23 %, weiße Kristalle)

Schmp.: 42–44 °C (Lit.: 43–45 °C [Elliot et al., 1999])

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 1.14 (t, J=7.5 Hz, 3H, COCH₂CH₃), 2.69 (q, J=7.4 Hz, COCH₂CH₃), 2.81 (s, 4H, COCH₂CH₂CO)

MS (EI): m/z (%) = 171 ([M]⁺, 3), 87 (20), 57 (100)

C₇H₉NO₄ (171.15 g/mol)

6.5.4.2 Darstellung von BOLTON-HUNTER-Reagenz (81)

Succinimidyl-3-(4-hydroxyphenyl)propanoat (RUDINGER-Reagenz) (**80**)

Zu einer Lösung von 5.0 g (43.4 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid in 200 ml Dimethoxyethan werden unter Rühren im Eisbad 7.22 g (43.4 mmol) 3-(4-Hydroxyphenyl)propansäure in 18 ml Dimethoxyethan gegeben. 8.96 g (43.4 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid in 15 ml Dimethoxyethan werden langsam zugefügt und der Ansatz wird über Nacht im Eisbad weitergerührt. Der entstandene Niederschlag (Dicyclohexylharnstoff) wird abfiltriert und das Lösungsmittel i. Vak. abgedampft. Aus dem zurückbleibenden gelben Öl kristallisiert das Rohprodukt nach kurzer Zeit aus. Das Produkt wurde zweimal aus 2-Propanol (20 ml) umkristallisiert.

Ausbeute: 6.97 g (26.47 mmol, 61 %), weißes Pulver

Schmp.: 130-132 °C (Lit.: 129 °C [Rudinger und Ruegg, 1973])

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 2.81 (s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.82-2.96 (m, 4H, ArCH₂CH₂CO), 6.63-6.71 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 7.03-7.11 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 8.99-9.63 (br, 1H, OH),

MS (EI): m/z (%) = 263 ([M]⁺, 3), 166 (15), 107 (100)

C₁₃H₁₃NO₅ (263.25 g/mol)

Succinimidyl-3-(4-hydroxy-3-iodphenyl)propanoat (BOLTON-HUNTER-Reagenz) (**81**)

Zu 1.0 g (3.80 mmol) RUDINGER-Reagens in 38 ml Ethylacetat wird langsam eine Lösung von 1.23 g (7.58 mmol) Iodmonochlorid in 3.8 ml Ethylacetat getropft. Nach dem Rühren über Nacht im Eisbad unter Lichtschutz kann **81** als feiner gelblicher Niederschlag abfiltriert werden. Das Produkt wird mit 10 ml eiskaltem Ethylacetat gewaschen und i. Vak getrocknet.

Ausbeute: 0.78 g (2.01 mmol, 53 %), weißes Pulver

Schmp.: 190-193 °C (Lit.: 189-193 °C [Geßele, 1998])

¹H-NMR ([D₆]DMSO): δ [ppm] = 2.80 (s, 4H, COCH₂CH₂CO), 2.81-2.96 (m, 4H, ArCH₂CH₂CO), 6.73-6.82 (m, 1H, ArOH), 7.06-7.13 (m, 1H, ArOH), 7.58-7.62 (m, 1H, ArOH), 10.12 (s, 1H, OH)

MS (⁺CI): m/z (%) = 407.1 ([M+NH₄]⁺, 100), 281.2 ([MH-I]⁺, 89)

C₁₃H₁₂INO₅ (389.14 g/mol)

6.5.5 Untersuchungen zur Herstellung potentieller Radioliganden

6.5.5.1 Herstellung der N^G -(5-Amidopentanoyl)argininamide **82**, **83**

Allgemeine Versuchsvorschrift

0.101 g (0.122 mmol) des Amins **81** • 3 H₂O • 2 CF₃COOH werden in 10 ml abs. DMF gelöst, mit 0.366 mmol DIPEA und 0.122 mmol **79** oder **81** versetzt und 2 d bei 40 °C gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. abgedampft, das ölige Produkt in 30 ml Wasser aufgenommen und mit Essigsäureethylester (3 x 10 ml) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit Wasser (20 ml) gewaschen, und anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. eingedampft.

(*R*)- N^G -Diphenylacetyl-*N*-[(4-hydroxyphenyl)methyl]- N^G -[5-(propanamido)pentanoyl]argininamid (**82**)

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Chloroform/Methanol (9:1) gereinigt

Ausbeute: 0.035 g (0.052 mmol, 43 %) hygroskopischer Schaum

¹H-NMR (CD₃OD): δ [ppm] = 1.16-1.94 (m, 8H, CHCH₂CH₂CH₂NH, COCH₂CH₂CH₂CH₂NH), 1.22 (t, J=7.5 Hz, 3H, COCH₂CH₃), 2.24-2.53 (m, 2H, COCH₂CH₂CH₂CH₂NH), 2.65 (q, J=7.5 Hz, 2H, COCH₂CH₃), 2.94-3.26 (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂NH, COCH₂CH₂CH₂CH₂NH), 4.24 (d, J=5.3 Hz, 2H, NHCH₂Ar-OH), 4.32-4.49 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 5.07 (s, 1H, COCHPh₂), 6.66-6.72 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 7.01-7.15 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 7.20-7.32 (m, 10H, 2 x Ph)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 651 ([M+Na]⁺, 15), 629 (MH⁺, 100)

C₃₅H₄₄N₆O₅ • 2 H₂O (664.79)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 57.03 H: 6.41 N: 9.67

Gef.: C: 56.97 H: 6.52 N: 9.63

(*R*)-*N*^α-Diphenylacetyl-*N*^δ-{*N*'-[3-(4-hydroxy-3-iodophenyl)propanamido]pentanoyl}-*N*-[(4-hydroxyphenyl)methyl]argininamid (**83**)

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Chloroform/Methanol (7:1) gereinigt

Ausbeute: 0.052 g (0.057 mmol, 47 %), hygroskopischer, weißer Feststoff

¹H-NMR (CD₃OD): δ [ppm] = 1.20-1.90 (m, 8H, CHCH₂CH₂CH₂NH, COCH₂CH₂CH₂CH₂NH), 2.26-2.48 (m, 2H, COCH₂CH₂CH₂CH₂NH), 2.74-3.26 (m, 8H, CHCH₂CH₂CH₂NH, COCH₂CH₂CH₂CH₂NH, COCH₂CH₂Ar), 4.26 (d, J=5.2 Hz, 2H, NHCH₂Ar-OH), 4.32-4.49 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 5.06 (s, 1H, COCHPh₂), 6.63-6.75 (m, 3H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH, ArH), 7.00-7.16 (m, 3H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH, ArH), 7.23-7.35 (m, 11H, 2 x Ph, ArH)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 869 ([M+Na]⁺, 2), 847 (MH⁺, 55), 474 (100)

C₄₁H₄₇IN₆O₆ • 3 H₂O (900.80 g/mol)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 52.67 H: 5.73 N: 6.37

Gef.: C: 52.84 H: 5.64 N: 6.38

6.5.5.2 (*R*)-*N*^α-Diphenylacetyl-*N*-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-*N*^δ-[5-(4-Fluorbenzamido)pentanoyl]argininamid (**86**)

0.034 g (0.041 mmol) des Amins **81** • 3 H₂O • 2 CF₃COOH werden in 5 ml abs. Dichlormethan gelöst, mit 0.010 g (0.101 mmol) Triethylamin und mit 0.006 g (0.041 mmol) para-Fluor-benzoylchlorid versetzt und 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. abgedampft, das ölige Produkt in 30 ml Wasser aufgenommen und mit Essigsäureethylester (3 x 10 ml) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit Wasser (20 ml) gewaschen, und anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. eingedampft.

Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Chloroform/Methanol (9:1) gereinigt

Ausbeute: 0.013 g (0.018 mmol, 45 %), hygroskopischer Schaum

¹H-NMR (CD₃OD): δ [ppm] = 1.12-1.98 (m, 8H, CHCH₂CH₂CH₂NH, COCH₂CH₂CH₂CH₂NH), 2.21-2.46 (m, 2H, COCH₂CH₂CH₂CH₂NH), 2.78-3.21 (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂NH, COCH₂CH₂CH₂CH₂NH), 4.22 (d, J=5.4 Hz, 2H, NHCH₂Ar-OH), 4.29-4.55 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 5.10 (s, 1H, COCHPh₂), 6.62-6.74 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 6.99-7.21 (m, 4H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-F, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 7.20-7.32 (m, 10H, 2 x Ph), 7.85-7.98 (BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-F)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 717 ([M+Na]⁺, 15), 695 (MH⁺, 100)

C₃₉H₄₃N₆O₅ (694.79 g/mol)

6.5.5.3 Hydrogenolyse von 64 zu (R)-N^α-Diphenylacetyl-N^G-ethoxycarbonyl-N-[(4-hydroxyphenyl)methyl]argininamid (26)

0.2 g (0.31 mmol) des (R)-N^α-Bis(4-chlorphenyl)acetyl-N^G-ethoxycarbonyl-N-[(4-hydroxyphenyl)methyl]argininamids **64** • 2 H₂O werden in 10 ml Methanol suspendiert. Nach Zugabe von 10 mg Katalysator (Pd/C, 10 %) wird für 15 h im Autoklaven bei einem H₂-Druck von 1 bar unter Rühren hydriert. Der Katalysator wird abfiltriert, das Lösungsmittel wird i. Vak. abgedampft.

(R)-N^α-Diphenylacetyl-N^G-ethoxycarbonyl-N-[(4-hydroxyphenyl)methyl]argininamid (**26**)

Ausbeute: 0.17 g (0.30 mmol, 98 %), farbloser Schaum

¹H-NMR (CD₃OD): δ [ppm] = 1.23 (t, J=7.1 Hz, 3H, CO₂CH₂CH₃), 1.20-1.82 (m, 4H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 3.00-3.24 (m, 2H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 4.05 (q, J=7.1 Hz, 2H, CO₂CH₂CH₃), 4.25 (d, J=5.8 Hz, 2H, HNCH₂Ar-OH) 4.34-4.45 (m, 1H, CHCH₂CH₂CH₂NH), 5.06 (s, 1H, Ph₂CH), 6.65-6.77 (m, 2H, AA'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 6.98-7.10 (m, 2H, BB'-Teil eines AA'BB'-Systems, Ar-OH), 7.15-7.37 (m, 10H, Ph)

MS (⁺ESI): m/z (%) = 1091 ([2M+H]⁺, 1), 546 (MH⁺, 100)

C₃₀H₃₅N₅O₅ • 1.25 H₂O (568.16)

Elementaranalyse:

Ber.: C: 63.36 H: 6.55 N: 12.34

Gef.: C: 63.42 H: 6.65 N: 12.32

6.6 Pharmakologische Testung

6.6.1 Untersuchung der NPY Y₁-antagonistischen Aktivität an HEL-Zellen

6.6.1.1 Vorbereitung der Reagenzien

1) Beladungspuffer Einwaage pro Liter (H₂O Millipore)

120 mM	NaCl	7.013 g
5 mM	KCl	327.8 mg
2 mM	MgCl ₂ x 6H ₂ O	406.6 mg
1.5 mM	CaCl ₂ x 2H ₂ O	220.5 mg
25 mM	Hepes	5.958 g
10 mM	Glucose (wasserfrei)	1.802 g

Der Puffer wird mit 20 %iger Natronlauge auf pH 7.4 eingestellt, sterilfiltriert und in Portionen von 500 ml im Kühlraum aufbewahrt.

2) Beladungssuspension

1 ml Beladungspuffer mit 2 % BSA:	200 mg BSA + 10.0 ml Beladungspuffer
4 µl Pluronic F-127 (20 % in DMSO):	20 µl Pluronic F-127 + 80 µl DMSO bei Raumtemperatur lagern
4 µl Fura-2/AM 1 mM in DMSO:	1.00 mg Fura-2/AM in 1.0 ml DMSO, portioniert bei Raumtemp. lagern

Die Beladungssuspension wird an jedem Versuchstag frisch hergestellt. 1 ml der Beladungssuspension reichen für 4·10⁶ Zellen.

3) Digitonin-Lösung (2 %ig)

40 mg Digitonin (50 %) werden in 1.0 ml H₂O suspendiert und auf 95 - 98 °C erhitzt. Man filtriert die klare Lösung, nachdem sie auf Raumtemperatur abgekühlt ist.

4) EGTA-Lösung (600 mM)

228.2 mg EGTA (Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) werden in 1.0 ml Tris-Puffer (pH 8.7) gelöst.

5) HCl (10 mM) zum Lösen von NPY

10.56 µl HCl suprapur, Merck, 30 % und 10 mg BSA werden in 10.0 ml H₂O gelöst.

6) NPY-Stammlösung

Man löst 0.257 mg NPY (M = 4274 g/mol) in 300 µl 10 mM HCl mit BSA (Reagenz 5) und erhält dabei eine $2 \cdot 10^{-4}$ M Lösung. Durch zweimalige 1:10 Verdünnung mit Reagenz 5 stellt man eine $2 \cdot 10^{-6}$ M Lösung her. Die NPY-Lösung wird bei -20 °C aufbewahrt.

6.6.1.2 Testung der NPY-Antagonisten

Beladung:

24 h vor der Testung werden die HEL-Zellen in eine große Kulturflasche passagiert (ca. $\times 1/6$), so dass am folgenden Versuchstag eine Zelldichte von 2 bis $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml erreicht wird. Man zentrifugiert ca. 150 ml der Zellsuspension ab (Raumtemp., 200 g, 7 min), nimmt in ca. 5 ml Beladungspuffer auf, zählt mit der Neubauer-Zählkammer aus und stellt auf $1 \cdot 10^6$ Zellen pro 0.75 ml ein. Für eine Versuchsreihe werden ca. $25 \cdot 10^6$ Zellen beladen, die restlichen Zellen werden für die Autofluoreszenzwerte zurückbehalten.

Pro $1 \cdot 10^6$ Zellen werden 0.25 ml Beladungssuspension hinzugefügt. Man erhält dadurch eine Beladungskonzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml, 1 μ M Fura-2/AM, 0.2 % DMSO und 0.025 % Pluronic F-127.

Die Zellen werden 30 min bei Raumtemp. im Dunklen beladen, anschließend bei Raumtemp. abzentrifugiert (200 g, 7 min) und in frischem Beladungspuffer aufgenommen. Man lässt die Zellen weitere 30 min bei Raumtemp. im Dunklen zur Nachinkubation stehen, wäscht einmal mit Beladungspuffer und nimmt dann in 5 ml Beladungspuffer auf. Die Zelldichte wird erneut mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt, und die Zellen werden auf eine Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

Die beladenen Zellen werden bis zur Messung noch mindestens 15 min in Dunkelheit bei Raumtemp. stehengelassen, um bei der Messung eine Stabilisierung des Signals zu erreichen.

Die zur Autofluoreszenzmessung zurückbleibenden Zellen werden einmal mit Beladungspuffer gewaschen und ebenfalls auf eine Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen eingestellt.

Fluoreszenz-Messung

Versuchsbedingungen für die Fluoreszenz-Messung:

Anregung:	340 / 380 nm, Spalt 10 nm
Emission:	510 nm, Spalt 10 nm
Auflösung:	0.1
Rührer:	low
Küvettemperierung:	25 °C
Küvetten:	Acryl-Küvetten, Sarstedt

Vor der Messung werden die Küvetten vorbereitet. Man gibt 1 ml Beladungspuffer, einen Rührstein und unmittelbar vor der Messung 1 ml Zellsuspension (entspricht $1 \cdot 10^6$ Zellen/Küvette) zu.

Man startet die Messung, wobei die Startlinie konstant bleiben sollte, gibt nach 10 - 20 s 10 μ l einer Lösung des Antagonisten (100, 50, 10 oder 1 μ M) in Ethanol/Wasser (1:1) und genau nach 1 min 10 μ l NPY ($2 \cdot 10^{-6}$ M) zu, so dass man eine finale NPY-Konzentration von 10 nM erhält. In jeder 3. Küvette wird als 100 %-Wert nur 10 nM NPY vermessen.

Pro Messreihe wird eine Kalibrierung durchgeführt, wobei mit Hilfe der nicht beladenen Zellen die Autofluoreszenz-Werte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/Küvette bei 340 und 380 nm bestimmt werden.

Im Anschluss an eine Messreihe werden R_{\min} und R_{\max} durch die Zugabe von 10 μ l Digitonin-Lösung (R_{\max}) und anschließend 30 μ l der EGTA-Lösung (R_{\min}) bestimmt.

Die Ca^{2+} -Signale werden mit Hilfe der Grynkiewicz-Gleichung [Grynkiewicz, 1984]

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \cdot \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \cdot SFB$$

berechnet.

In der Formel ist der Faktor K_d die Dissoziationskonstante des Fura-2- Ca^{2+} -Komplexes ($K_d = 224$ nM). SFB ist ein empirisch zu ermittelnder Faktor, der die Fluoreszenzbeiträge der beiden Fluorophore (Fura-2 und Fura-2- Ca^{2+} -Komplex) bei 380 nm berücksichtigt. R ist das Verhältnis der Fluoreszenzsignale bei Anregung mit 340 bzw. 380 nm (F_{340} / F_{380}).

Durch Vergleich der Signalhöhe von 10 nM NPY (100 %-Wert) mit der geringeren Signalhöhe in Gegenwart eines Antagonisten kann die prozentuale Hemmung berechnet werden. Die prozentualen Hemmungen wurden bei den verschiedenen Konzentrationen in der Regel als Mittelwert aus 2 - 3 Messungen bestimmt.

6.6.2 Y_1 -Bindungsassay mit intakten SK-N-MC-Zellen

Die SK-N-MC-Zellen werden 2 bis 4 Tage vor dem Versuch gleichmäßig in 24-Well-Platten ausgesät. Das Medium (Eagle's minimum essential medium mit nicht essentiellen Aminosäuren, Sigma, Deisenhof) wird abgesaugt, und die konfluenten Zellen werden zweimal mit 0.5 ml Puffer A (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 25 mM NaHCO_3 , pH = 7.4) gewaschen. Anschließend wird der Bindungspuffer (Puffer A enthält 1 % BSA und 0.1 g/l Bacitracin, Sigma, Deisenhof), Testsubstanzen (mind. 6 Konzentrationen über einen Bereich von drei Zehnerpotenzen) und der Radioligand [^3H]Propionyl-NPY (Amersham, Braunschweig) mit einer spezifischen Aktivität von 2.7 - 3.3 TBq/mmol zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 1 nM vorliegt. Nach 2.5 h Inkubation bei Raumtemp. unter leichtem Schütteln werden die Überstände abgesaugt, die Zellen in den Wells zweimal mit je 0.5 ml

Puffer A (4 °C) gewaschen und mit 200 µl Lyse-Puffer (8 M Harnstoff, 3 M HOAc, 2% Triton-X-100) versetzt. Nach 15 min Schütteln wird der Lyse Puffer in Szintillationsgefäße überführt. Die Wells werden noch einmal mit 200 µl Lyse-Puffer nachgespült. Die vereinigten Lysate werden mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus, Roth) versetzt und im Beta-Zähler LS 1801 (Beckmann, München) vermessen. Die totale und die unspezifische Bindung (in Anwesenheit von 10^{-6} pNPY Bachem, Heidelberg) wird in jeder Messreihe bestimmt. Die Proben werden als Triplikate vermessen [Geßele, 1998].

6.6.3 Y₂-Bindungsassay an SMS-KAN-Zellmembranen

Der Y₂-Radioligand-Bindungsassay erfolgt in Analogie zu der von BECK-SICKINGER beschriebenen Methodik [Beck-Sickinger et al., 1994] unter Verwendung von [³H]Propionyl-NPY als Radioligand anstelle von "BOLTON-HUNTER" modifiziertem NPY.

Die Membranpräparation wird mit Bindungspuffer (25 mM Hepes, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH = 7.4, 1 % BSA, Bacitracin 100 µg/ml, Pentamethylsulfonylfluorid (PMSF) 100 µM, (Sigma)) auf einen Proteingehalt von 1 µg/µl eingestellt. Nach Zugabe von Bindungspuffer, Testsubstanzen (mind. 6 Konzentrationen über einen Bereich von drei Zehnerpotenzen) und Radioligand [³H]Propionyl-NPY wird nach 1.5-2 h Inkubation bei Raumtemp. in silikonbeschichteten Polypropylenröhrchen (Sigmacote, Sigma, Deisenhof) 20 min bei 13000 rpm (Heraeus Minifuge) zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die Pellets werden zweimal mit je 0.5 ml PBS (4 °C) vorsichtig gewaschen, mit 200 µl Lyse-Puffer (8 M Harnstoff, 3 M HOAc, 2% Triton-X-100) versetzt und nach 10 min Inkubation bei Raumtemp. im Lysepuffer und mehrmaligem Aufziehen mit einer Pipette in Szintillationsgefäße überführt. Die Reaktionsgefäße werden noch einmal mit 200 µl Lyse-Puffer nachgespült. Die vereinten Lysate werden mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Beta-Zähler vermessen.

Es werden wieder die totale und die unspezifische Bindung ermittelt und alle Bestimmungen dreifach durchgeführt.

6.6.4 Y₅-Radioligand-Bindungsassay an stabil transfizierten HEC-1B-Zellen

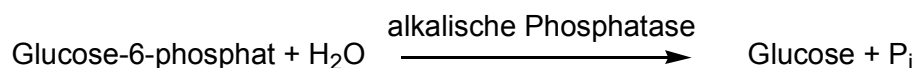
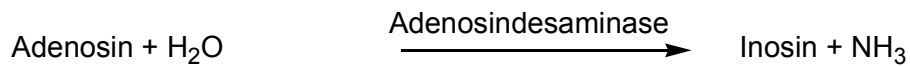
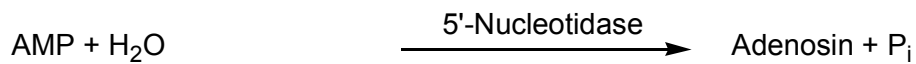
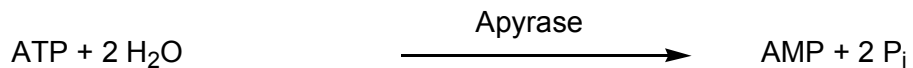
Die HEC-1B-Zellen, die stabil den Neuropeptid Y Y₅-Rezeptor exprimieren werden 2-3 Tage vor dem Versuch gleichmäßig in 24 Well-Platten ausgesät, so dass sie am Versuchstag gerade konfluent sind. Nach dem Absaugen des Mediums (EMEM, Sigma, Deisenhofen) werden die Zellen zweimal mit 0.5 ml Puffer A (25 mM Hepes, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH = 7.4) gewaschen, und anschließend werden 200 µl Bindungspuffer (Puffer A mit 1 % BSA und 0.1 g/l Bacitracin (Sigma, Deisenhofen)) zugesetzt. Danach werden 25 µl der Testsubstanzen (3 bis 4 Konzentrationen über einen Bereich von zwei Zehnerpotenzen) und 25 µl [³H]Propionyl-pNPY (10 nM, Amersham, Braunschweig) mit einer spezifischen Aktivität von 2.7 -3.3 TBq/mmol zupipettiert. Unter leichtem Schütteln werden die Zellen 2.5 h bei Raumtemp. inkubiert. Nach dem Absaugen der Überstände und zweimaligem Waschen mit je 0.5 ml eiskaltem Puffer A, werden die Zellen mit 200 µl Lyse-Puffer (8 M Harnstoff, 3 M HOAc, 2 % Triton-X-100) versetzt. Der Lyse-Puffer wird nach 15 min Schütteln bei Raumtemp. in Szintillationsgefäße überführt, und die Wells werden einmal mit 200 µl Lyse-Puffer nachgespült. Die vereinten Lysate werden mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus, Roth, Karlsruhe) versetzt und im Beta-Zähler LS 1801 (Beckmann, München) vermessen. Die totale und die nichtspezifische Bindung (in Anwesenheit von 10⁻⁶ pNPY (Bachem, Heidelberg)) werden in jeder Messreihe bestimmt. Die Proben werden als Triplikate vermessen [Moser, 2000].

6.6.5 Assay zur Bestimmung der 3',5'-cAMP-Konzentration in Zellen

6.6.5.1 Versuchsprinzip

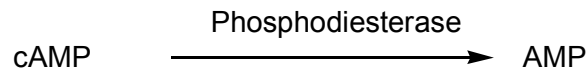
„Cleaning“-Reaktion

Neben der zu bestimmenden cAMP-Menge enthalten die extrahierten Proben noch ATP, AMP, Adenosin und Glucose-6-phosphat, die die enzymatische Umsetzung beeinflussen und daher im ersten Schritt zerstört werden. Die Enzyme werden anschließend durch Erhitzen inaktiviert.



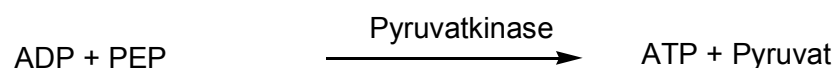
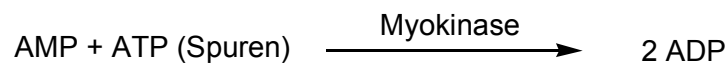
PDE-Reaktion

In diesem Reaktionsschritt erfolgt die quantitative Hydrolyse der cAMP-Menge zu AMP. Parallel dazu wird eine interne Kontrolle durchgeführt, ob in der "Cleaning"-Reaktion alle störenden Substanzen abgebaut wurden. Zur Bestimmung dieses "tissue blank"-Wertes (intrinsische Fluoreszenz der Probe, die nicht aus der cAMP-Umsetzung stammt) wird eine Probe ohne PDE inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt durch Erhitzen.



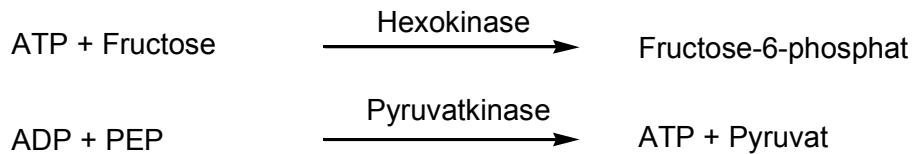
Myokinase-/Pyruvatkinase-Reaktion

In diesem Schritt wird AMP quantitativ zu ATP umgesetzt. Die Empfindlichkeit des Assays ist auch von der zugesetzten ATP-Menge abhängig. Die Reaktion läuft über Nacht bei Raumtemperatur ab.



Hexokinase-/Pyruvatkinase-Reaktion

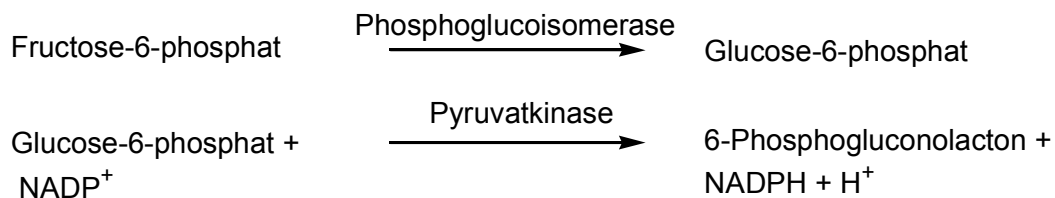
Im Amplifikationsschritt wird Fructose zu Fructose-6-phosphat umgesetzt, das entstandene ADP dabei zu ATP regeneriert. Über die Reaktionsdauer von 1-3 h kann die Empfindlichkeit des Tests beeinflusst werden. Alle Proben werden gleich lang inkubiert und die Enzyme anschließend durch Erhitzen inaktiviert.



Indikatorreaktion

Nach der Isomerisierung von Fructose-6-phosphat zu Glucose-6-phosphat wird dieses NADP^+ -abhängig oxidiert und eine äquimolare Menge NADPH gewonnen, die fluorimetrisch bestimmt wird.

Die Empfindlichkeit des cAMP-Assays kann variiert werden über die Einstellungen am Fluorimeter (Veränderung der Spaltbreite auf der Emissionsseite), die Dauer des Amplifikationsschrittes (1-3 h), die eingesetzte ATP-Menge und über das Assayvolumen (bei Verringerung des Volumens werden geringere Mengen detektierbar).



6.6.5.2 Stimulation der Zellen

Die SK-N-MC-Zellen wurden 2-4 Tage vor dem Versuch in 6 Well-Platten ausgesät. Die konfluenten Zellen wurden zweimal mit je 1 ml Inkubationspuffer gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well 1.0 ml Inkubationspuffer mit 50 μM IBMX (temperiert auf 37 °C) zugegeben. Die Zellen wurden 15 min bei 37 °C inkubiert.

Zur Testung von NPY-Antagonisten wurde zu den Zellen nach 1 min Inkubation mit verschiedenen Antagonisten-Konzentrationen zunächst pNPY und nach einer weiteren Minute Forskolin pipettiert. Die Testsubstanzen wurden zunächst in Konzentrationen getestet, die fünf- bis zehnmal höher lagen als der jeweilige IC_{50} -Wert im Ca^{2+} -Assay oder im Bindungs-Assay. Für die Negativ- und die Positivkontrolle wurden die Antagonisten jeweils in der höchsten getesteten Konzentration eingesetzt. An jedem Versuchstag wurde der 0 % und der 100 %-Wert sowie die Zellzahl als Mittelwert aus drei Wells bestimmt. Zur Testung von Y_1 -Antagonisten an SK-N-MC-Zellen wurde pNPY in der Konzentration 10^{-7} M und Forskolin in der Konzentration 50 μM eingesetzt. Wenn keine Testsubstanz, pNPY oder Forskolin zugegeben wurde, wurde das entsprechende Lösungsmittel pipettiert.

Pipettierschema [μ l]

	Testsubstanz	Negativkontrolle	Positivkontrolle
1. Testsubstanz	10	10	10
2. pNPY (10^{-7} od. 10^{-6} M)	10	-	-
3. Forskolin (50 od. 100 μ M)	10	-	10

	0 %-Wert	100 %-Wert
1. pNPY	10	-
2. Forskolin	10	10

Die Zellen wurden anschließend 15 min bei 37 °C inkubiert. Jedes Well wurde nach dem Absaugen des Puffers mit 1 ml Inkubationspuffer gewaschen und zum Stoppen der Reaktion mit 1.0 ml eiskaltem Ethanol versetzt. Die Platten wurden für 30 min auf Eis gestellt.

6.6.5.3 Probenaufbereitung

Der ethanolische Extrakt wurde in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt und jedes Well mit 0.5 ml Ethanol nacheluiert. Die vereinten Extrakte wurden 5 min bei 13 000 g zentrifugiert. Von den klaren Oberständen wurden 1.4 ml über Nacht im Trockenschrank (ca. 40 °C) zur Trockne eingedampft und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren. Am Tag des cAMP-Assays wurde der Rückstand in 100 μ l 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8.0) aufgenommen und mit dem Heidolph-Mixer gründlich gemischt. Der 100 %-Wert und die Positivkontrollen der Antagonisten werden zusätzlich 1:1 verdünnt.

6.6.5.4 Durchführung des cAMP-Assays

Für die Eichgerade (Doppelbestimmung) wurden jeweils 5 μ l der cAMP-Lösungen (0.1-2.0 μ M) und 5 μ l 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 als Nullwert in Eppendorf-Gefäße pipettiert. Von den aufbereiteten Proben wurden ebenfalls 5 μ l und zusätzlich für die Bestimmung des "tissue blank"-Wertes 3 beliebige Proben eingesetzt.

Schritt 1: „Cleaning“-Reaktion

5 µl Probe + 25 µl "Cleaning"-Reaktionsmix, kurz abzentrifugieren, Inkubation für 30 min bei 37 °C, Erhitzen für 10 min bei 90 °C, kurz abzentrifugieren.

Schritt 2: PDE-Reaktion:

Für die "tissue blank"-Werte 25 µl Reaktionsmix ohne PDE zugeben, erst dann die PDE zur Reaktionsmischung zusetzen. Für alle übrigen Proben + 25 µl PDE-Reaktionsmix, kurz abzentrifugieren, Inkubation für 30 min bei 37 °C, Erhitzen für 5 min bei 90 °C, kurz abzentrifugieren.

Schritt 3: Myokinase-Reaktion:

+ 25 µl Myokinase-Reaktionsmix, kurz abzentrifugieren, Inkubation über Nacht bei RT.

Schritt 4: Hexokinase-Reaktion:

Alle Proben auf Eis stellen, + 25 µl Hexokinase-Reaktionsmix, kurz abzentrifugieren, Inkubation für 2 h bei 37 °C, Erhitzen für 5 min bei 90 °C, kurz abzentrifugieren.

Schritt 5: Indikator-Reaktion:

+ 1 ml Indikator-Reaktionsmix, mischen, Inkubation für 15 min bei RT, 5 min bei 13000 g zentrifugieren, Fluoreszenzmessung in Halbmikroquarzküvetten.

6.6.5.5 Geräteeinstellungen

Gerät:	LS 50 B Luminiszenz Spektrometer
Modus:	Instrument, Read
Anregung:	340 nm bei 2.5 nm Spaltbreite
Emission:	460 nm bei 5-8 nm Spaltbreite
Messintervall:	3 s

6.6.5.6 Berechnungen**6.6.5.6.1 Berechnung des cAMP-Gehaltes**

Für die Berechnung der Eichgraden wurde die Stoffmenge des eingesetzten cAMP gegen die relative NADPH-Fluoreszenz aufgetragen. Der Mittelwert der "tissue blank"-Werte wurde bestimmt, um die intrinsische Fluoreszenz des Zellextraktes in den untersuchten Proben zu berücksichtigen. Der cAMP-Gehalt je Probe errechnet sich wie folgt:

$$n \text{ [pmol cAMP/Probe]} = \frac{\text{Fluoreszenzwert Probe [FE]} - \text{Fluoreszenzwert „tissue blank“ [FE]}}{\text{Steigung Eichgerade [FE/pmol cAMP]}}$$

Der cAMP-Gehalt pro Well wird folgendermassen berechnet:

$$n \text{ [pmol cAMP/Well]} = \frac{n_{\text{Probe}} \cdot V_{\text{EtOH}} \cdot V_{\text{Tris-HCl}} \cdot \text{Verd.}}{V_{\text{Überstand}} \cdot V_{\text{Probe}}}$$

FE	relative Fluoreszenzeinheiten
n_{Probe}	Stoffmenge cAMP in der Probe
V_{EtOH}	Volumen EtOH, mit dem cAMP extrahiert wurde (1,5 ml)
$V_{\text{Tris-HCl}}$	Volumen Tris-HCl-Puffer, in dem der eingedampfte Rückstand aufgenommen wurde (100 µl)
$V_{\text{Überstand}}$	Volumen EtOH, das eingedampft wurde (1,4 ml)
Verd.	in die Bestimmung eingesetztes Probenvolumen (5 µl) Verdünnungsfaktor (bei 100 %-Wert und Positivkontrollen: 2)

6.6.5.6.2 Berechnung der prozentualen Hemmung der cAMP Bildung

Bei der Testung der Antagonisten wurde untersucht, in welchem Ausmaß die Testsubstanzen die durch pNPY hervorgerufene Hemmung der Adenylylcyclase in Forskolin-stimulierten Zellen aufheben können. Die Berechnung der prozentualen Hemmung erfolgte nach der Formel:

$$\text{Hemmung Antagonist [\%]} = \frac{\text{cAMP (Antagonist) [pmol]} - \text{c AMP (0 \%-Wert) [pmol]} \cdot 100 \%}{\text{cAMP 100 \%-Wert) [pmol]} - \text{c AMP (0 \%-Wert) [pmol]}}$$

Es wurden alle Bestimmungen dreifach ausgeführt und die Mittelwerte für die prozentuale Hemmung ermittelt. Jeder Antagonist wurde in mindestens zwei unabhängigen Versuchen getestet und aus den Mittelwerten wurden die IC₅₀-Werte nach der logit-Transformation berechnet.

7 Literaturverzeichnis

- ABRAHAM A., Nair M. G., Kisliuk R. L., Gaumont Y., Galivan J. (1990): Synthesis of folate and antifolate poly- γ -glutamates by [(9-fluorenylmethoxy)oxy]carbonyl chemistry and biological evaluation of certain methotrexate polyglutamate polylysine conjugates as inhibitors of the growth of H35 hepatoma cells. *J. Med. Chem.* **33**, 711-717
- ADANG A. E. P., Hermkens P. H. H. (2001): The contribution of combinatorial chemistry to lead generation : An interim analysis. *Curr. Med. Chem.* **8**, 985-998
- ADANG A. E. P., Lucas H., Man A. P. A., Engh R. A., Grootenhuis P. D. J., (1998): Novel acylguanidine containing thrombin inhibitors with reduced basicity at the P1 moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*; EN; **8**; **24**; 3603-3608
- AIGLSTORFER I. (1999): Argininamide und Argininamid-Analoga: Synthese und Struktur-Wirkungs-Beziehungen neuer Neuropeptid Y Y₁-Rezeptorantagonisten. *Dissertation: Universität Regensburg*
- AIGLSTORFER I., Uffrecht A., Geßele K., Moser C., Schuster A., Merz S., Malawska B., Bernhardt G., Dove S., Buschauer A. (1998): NPY Y₁ antagonists: structure-activity relationships of arginine derivatives and hybrid compounds with arpromidine-like partial structures. *Regul. Pept.* **75-76**, 9-21
- ALLEN J., Novotny J., Martin J., Heinrich G. (1987): Molecular structure of mammalian neuropeptide Y: analysis by molecular cloning and computer-aided comparison with crystal structure of avian homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2532
- ALLEN C. J., Ghilardi J. R., Vigna S. R., Mannon P. J., Taylor I. L., McVey D. C. (1993): Neuropeptide Y/peptide YY receptor binding sites in the heart: Localisation and pharmacological characterization. *Neuroscience (Oxford)* **53**, 889-898
- ANDERSON G. W., Zimmermann J. E., Callahan F. M. (1964): The use of esters of *N*-hydroxysuccinimide in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1839-1842
- ARVIDSSON K., Land T., Langel U., Bartfai T., Ehrenberger A. (1993): Solution structure by 2D ¹H-NMR of a chimeric peptide recognized by galanin and neuropeptide Y receptors. *Biochemistry* **32**, 7787-7798

- ATHERTON E., Sheppard R. C. (1987): in *The Peptides*, S. Udenfried und J. Meienhofer (Eds), *Academic Press, New York*, **Vol. 9, 1**, 10-57
- BALASUBRAMANIAM A., Sheriff S., Rigel D. F., Fischer I. E. (1990): Characterization of neuropeptide Y binding sites in rat cardiac ventricular membranes. *Peptides* **11**, 545-550
- BARKER P. L., Gendler P. L., Rapoport H. (1981): Acylation of dibasic compounds containing amino amidine and aminoguanidine functions. *J. Org. Chem.* **46**, 2455-2465
- BARD J. A., Walker M. W., Branchek T. A., Weinshank R. L. (1995): Cloning and functional expression of a human Y₄ subtype receptor for pancreatic polypeptide, neuropeptide Y and peptide YY. *J. Biol. Chem.* **270**, 26762-26765
- BECK A., Jung G., Gaida W., Koppen H., Lang R., Schnorrenberg G. (1989): Highly potent and small neuropeptide Y agonist obtained by linking NPY 1-4 via spacer to α -helical NPY 25-36. *FEBS Lett.* **244**, 119-122
- BECK-SICKINGER A. G., Wieland H. A., Wittneben H., Willim K. D., Rudolf K., Jung G. (1994): Complete L-alanine scan of neuropeptide Y reveals ligand binding to Y₁ and Y₂ receptors with distinguished conformations. *Eur. J. Biochem.* **225**, 947-958
- BERGMANN M., Zervas L. (1932): Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. *Chem. Ber.* **65**, 1192-1197
- BERNTHSEN A., Klinger H. (1878): Über Sulfinverbindungen des Thioharnstoffs. *Chem. Ber.* **11**, 493-498
- BLEAKMAN D., Miller R. J., Colmers W. F. (1993): The biology of neuropeptide Y and related peptides. Colmers W. F., Wahlestedt C. (eds.), *Humana Press, Totawa, NJ*, 241-272
- BLOMQUIST A.G., Herzog H. (1997): Y-receptor subtypes – how many more? *Trends Neurosci.* **20**, 294-298
- BODANSKY A., Bodansky M. (1994): The practice of peptide synthesis. *Springer Verlag, Berlin*, 130-145

- BODANSKY M. (1993): Principles of peptide synthesis. *Springer Verlag, Heidelberg, New York*, 34-35
- BOLTON A. E., Hunter W. M. (1973): The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}I -containing acylating agent. *Biochem. J.* **133**, 529-539
- BOSIN T. R., Hanson R. N., Rodricks J. V., Simpson R. A., Rapoport H. (1973): Routes to functionalized guanidines. The synthesis of guanidino diesters. *J. Org. Chem.* **38**, 1591-1600
- BOULANGER Y., Chen Y., Commodari F., Senecal L., Laberge A. M., Fowner A., St.-Pierre S. (1995): Structural characterizations of neuropeptide tyrosine (NPY) and its agonist analog [Ahx5-17]NPY by NMR and molecular modeling. *Int. J. Peptide Protein Res.* **45**, 86-95
- BROOK M. A., Chan T. H. (1983): A simple procedure for the esterification of carboxylic acids. *Synthesis* **3**, 201-203
- BUEHLMAYER P. (1999): Preparation of substituted benzenesulfonamide derivatives as antagonists of the neuropeptide NPY receptor subtype Y_5 . PCT Int. Appl. WO 9932466, *Chem. Abstr.* **131**: 58649
- BUSCHAUER A., Wegner K., Schunack W. (1984): Isohistamine. *Arch. Pharm.* **317**, 9-14
- BUSCHAUER A. (1988): Imidazolylalkylguanidine mit Diarylpartialstruktur. *Sci. Pharm.* **56**, 81-88
- BUSCHAUER A. (1989): Synthesis and in vitro pharmacology of arpromidine and related Phenyl(pyridylalkyl)guanidines, a potential new class of positive inotropic drugs. *J. Med. Chem.* **32**, 1963-1970
- CHENG Y. C., Prusoff W. H. (1973): Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor, which causes 50 percent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 1164-1175
- COMELY A. C., Gibson S. E. (2001): Tracelessness unmasked: a general linker nomenclature. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40** (6), 1012-1032
- CLARK I. T., Kalra P. S., Croweley W. R., Kalra S. P. (1984): Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behaviour in rats. *Endocrinology* **115**, 427-429

- CONNELL R. D., Lease T. G., Ladouceur G. H., Osterhout M. H. (1998): Preparation of amide derivatives as selective neuropeptide Y receptor antagonists. PCT Int. Appl. WO 9835957; *Chem. Abstr.* **129**: 202941
- COWELY D. I., Hoflack I. M., Pelton J. T. (1992): Structure of neuropeptide Y dimer in solution. *Eur. J. Biochem.* **205**, 1099-1106
- COX H. M., Tough I. R., Zandvliet D. W., Holliday N. D. (2001): Constitutive neuropeptide Y Y₄ receptor expression in human colonic adenocarcinoma cell lines. *Br. J. Pharmacol.* **132**, 345-53
- CRISCIONE L., Rigollier P., Batzl-Hartmann C., Rueger H., Stricker-Krongrad A., Wyss P., Brunner L., Whitebread S., Yamaguchi Y., Gerald C., Heurich R. O., Walker M. W., Chiesi M., Schilling W., Hofbauer K. G., Levens N. (1998): Food intake in free-feeding and energy-deprived lean rats is mediated by the neuropeptide Y₅ receptor. *J. Clin. Invest.* **102**, 2136-2145
- CROSS L. J. M., Beck-Sickinger A. G., Bienert M., Gaida W., Jung G., Krause E., Ennis M. (1996): Structure activity studies of mast cell activation and hypotension induced by neuropeptide Y (NPY), centrally truncated and C-terminal NPY analogues. *Br. J. Pharmacol* **117(2)**, 325-332
- DAHMEN S., Bräse S. (2000): A Novel Solid-Phase Synthesis of Highly Diverse Guanidines: Reactions of Primary Amines Attached to the T2 Linker. *Organic Lett.*, **23/2**, 3563-3565.
- DIXIT S. G., Joshi M. S. (1998): Combinatorial Chemistry-Principles and Practices. *J. Sci. Ind. Res.*, **57**, 173-183
- DODD D. S., Wallace O. B. (1998): Solid-phase-synthesis of *N,N'*-substituted Guanidines. *Tetrahedron Lett.* **39**, 5701-5704
- DOETSCH J., Adelmann M., Englaro P., Doetsch A., Haenze J., Blum W. F., Kiess W., Rascher W. (1997): Relation of leptin and neuropeptide Y in human blood and cerebrospinal fluid. *J. Neurol. Sci* **151(2)**, 185-188

- DOODS H., Gaida W., Wieland H. A., Dollinger H., Schnorrenberg G., Esser F., Engel W., Eberlein W., Rudolf K. (1999): BIIE 0246: A selective and high affinity neuropeptide Y Y₂ receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **384** (2-3), R 3-5
- DOUGHTY M. B., Chu S. S., Miller D. W., Li K., Tessel R. E. (1990): Benextramine: a long-lasting neuropeptide Y receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **185**, 113-114
- DOUGHTY M. B., Chandra S. C., Li K. (1993): Benextramine-Neuropeptide Y Receptor Interactions: Contribution of the Benzylic Moieties to [³H]Neuropeptide Y Displacement Activity. *J. Med. Chem.* **36**, 272-279
- DOURTOGLOU V., Gross B., Lambropoulou V., Zidoudrou C. (1984) : O-Benzotriazolyl-*N, N, N'*, *N'*-tetramethyluronium fluorophosphate as coupling reagent for the synthesis of peptides of biological interest. *Synthesis* 572-574
- DOVE S. (2002): persönliche Mitteilung
- DOVE S., Michel M. C., Knieps S., Buschauer A. (2000): Pharmacology and quantitative structure-activity relationships of imidazolylpropylguanidines with mepyramine-like substructures as non-peptide neuropeptide Y Y₁ receptor antagonists. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **78**, 108-115
- DREWRY D. H., Gerritz S. W., Linn J. A. (1997): Solid-Phase Synthesis of Trisubstituted Guanidines. *Tetrahedron Lett.* **38**, 3377-3380
- EKEBLAD E., Edvinson L., Wahlestedt C., Uddmann R., Hakanson R. (1984): Neuropeptide Y coexists and co-operates with noradrenaline in perivascular fibres. *Regul. Pept.* **8**, 225-235
- EDVINSSON L., Adamsson M., Jansen I. (1990): Neuropeptide antagonistic properties of D-*myo*-inositol-1,2,6-triphosphate in guinea pig basilar arteries. *Neuropeptides* **17**, 99-105
- EDWALD D. A., Stemweis P. C., Miller R. J. (1988): Guanine nucleotide-binding protein G₀-induced coupling of neuropeptide Y receptors to Ca²⁺-channels in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3633-3637

- EKMAN R., Juhasz P., Heilig M., Agren H., Costello C. E. (1996): Novel neuropeptide Y processing in human cerebrospinal fluid from depressed patients. *Peptides* **17** (7), 1107-1111
- ELLINGBOE J. W. (1998): Combinatorial Chemistry methodology and combinatorial library design. *Med. Chem. Res.* **8** (4/5), 181-186
- ELLIOT J. T., Hoekstra W. J., Maryanoff B. E., Prestwich G. D. (1999): Photoactivatable Peptides based on BMS-197525: A potent antagonist of human thrombin receptor (PAR-1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 279-284
- ERICKSON J. C., Clegg K. E., Palmiter R. D. (1996): Sensitivity of leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* **381**, 415-418
- EVA C., Keinanen K., Monyer H., Seeburg P., Sprengel R. (1990): Molecular cloning of a novel G-protein-coupled receptor that may belong to the neuropeptide receptor family. *FEBS Lett.* **271**, 81-84
- FELIX A. M. (1974): Cleavage of protecting groups with boron tribromide. *J. Org Chem.* **39**, 1427-1429
- FLOOD J. F., Morley J. E. (1989): Dissociation of the effects of neuropeptide Y in feeding and memory: Evidence for pre and postsynaptic mediation. *Peptides* **10**, 963-966
- DEL FRESNO M., El-Faham A., Carpino L. A., Royo M., Albericio F. (2000): Substituted guanidines: introducing diversity in combinatorial chemistry. *Org. Lett.* **2** (23), 3539-3542
- FUHLENDORFF J., Langeland-Johansen N., Melberg S. G., Thogersen H., Schwartz T. W. (1990): The antiparallel pancreatic polypeptide fold in the binding of neuropeptide Y to Y₁ and Y₂ receptors. *J. Biol. Chem.* **265**, 11706-11712
- FUHLENDORFF J., Gether U., Aakerlund L., Langeland-Johansen N., Thogersen H., Melberg S. G., Olsen U. B., Thastrub O., Schwartz T. W. (1990a): [Leu³¹, Pro³⁴] Neuropeptide Y: A specific Y₁ receptor agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 182-186

- FUKAMI T., Fukuroda T., Kanatani A., Ihra M. (1999): Preparation of pyrazole derivatives for the treatment of bulimia, obesity, and diabetes. *European Patents: EP 0945438, EP 094539, EP095440*
- GERALD C., Walker M. W., Criscione L., Gustafson E. L., Batzl-Hartmann C., Smith K. E., Vaysse P., Durkin M. M., Laz T. M., Linemeyer D. L., Schaffhauser A. O., Whitebread S., Hofbauer K. G., Taber R. I., Branchek T. A., Weinshank R. L. (1996): A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature* **382**, 168-171
- GEßELE K. (1998): Zelluläre Testsysteme zur pharmakologischen Charakterisierung neuer Neuropeptid Y-Rezeptorantagonisten: Rezeptor-Bindungsstudien und funktionelle Untersuchungen zur Calciummobilisierung und cAMP-Bildung. *Dissertation, Universität Regensburg*
- GHOSH A. K., Hol W. G. J., Fan E. (2001): Solid-phase Synthesis of N-Acyl-N'-Alkyl/Aryl Disubstituted Guanidines. *J. Org. Chem.* **66**, 2161-2164
- GLAUM S. R., Miller R. J., Reim H., Mc Lean D., Gerigc L. M., Mc Kenzie R. G. F., Grundemar L. (1997): Characterization of Y₃ receptor-mediated synaptic inhibition by chimeric neuropeptide Y/peptide YY peptides in the rat brainstem. *Br. J. Pharmacol.* **120**, 481-487
- GLOVER I., Hneef I., Pitts I., Woods S., Moss D., Tickle I., Blundell T. (1983): Conformational flexibility in a small globular hormone: X-ray analysis of avian pancreatic polypeptide. *Biopolymers* **22**, 293-304
- GORDON K., Balasubramanian S. (1999): Solid phase synthesis: designer linkers for combinatorial chemistry: a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74**, 835-851
- GRAICHEN F. (1999): Synthese von N-mono und N,N-disubstituierten Guanidinen unter Einsatz von polymergebundenem Diphenylimidocarbonat. *Diplomarbeit, Universität Regensburg*
- GREENE T. W., Wuts P. G. M. (1998): Protective Groups in organic synthesis. 3rd ed. /editors, T. W. Green, P. G. M. Wuts. John Wiley & Sons, New York
- GREENHILL J., Lue L., Ellis G. P., Luscombe D. K. (1993): Progress in Medicinal Chemistry. Eds.; *Elsevier Science: New York, Vol. 30, Chapter 5*

GREGOR P., Feng Y., DeCarr L. B., Cornfield L. J., McCaleb M. L. (1996): Molecular characterization of a second mouse pancreatic polypeptide receptor and its inactivated human homologue. *J. Biol. Chem.* **271**, 27776-27781

GREGOR P., Millham M. L., Feng Y., DeCarr L. B., McCaleb M. L., Cornfield L. J (1996a): Cloning and characterization of a novel receptor to pancreatic polypeptide, a member of the neuropeptide Y receptor family. *FEBS Lett.* **381**, 58-62

GROUZMANN E., Buclin T., Martire M., Cannizzaro C., Dömer B., Razaname A., Mutter M. (1997): Characterization of a selective antagonist of neuropeptide Y at the Y₂ receptor. Synthesis and pharmacological evaluation of a Y₂ antagonist. *J. Biol. Chem.* **272**, 7699-7706

GROUZMANN E., Buclin T., Martire M., Cannizzaro C., Dörner B., Razaname A., Mutter M. (1998): Addition or correction for Grouzmann et al., *J. Biol. Chem.* **272**, 7699-7706. *J. Biol. Chem.* **273**, 27033

GRUNDEMAR L., Wahlestedt C., Reis D. J. (1991): Neuropeptide Y acts at an atypical receptor to evoke cardiovascular depression and to inhibit glutamate responsiveness in the brainstem. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **258**, 633-638

GRUNDEMAR L., Hakanson R. (1994): Neuropeptide Y effector systems: perspectives for drug development. *Trends Pharmacol. Sci.* **15**, 153-159

GRYNKIEWICZ G., Poenie M., Tsien R. Y. (1984): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450

GUILLIER F., Orain D., Bradley M. (2000): Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry. *Chem. Rev.* **100**, 2091-2157

HAGISHITA S., Okada T., Fujimoto M. (1998): Preparation of novel benzolactam derivatives as neuropeptide antagonists and medicinal compositions comprising them. PCT Int. Appl. (1998), WO 9841510; *Chem. Abstr.* **129**: 260474

HAN C., Chorev H. (1999): Reductive alkylation of amines by S-ethyl-thioesters. *J. Org. Chem.* **64** (6), 1972-1978

- HAN Y., Chorev M. (1999): A novel, one-pot reductive alkylation of amines by S-ethyl thioesters mediated by triethylsilane and sodium triacetoxyborohydride in the presence of palladium on carbon. *J. Org. Chem.* **64**, 1972-1978.
- HEDGE S. S., Bonhaus D. W., Stanley W., Eglen R. M., Moy T. W., Loeb M., Shetty S. G., Desouza A., Krstenanksy J. (1995): Pharmacological evolution of 1229U91, a novel high-affinity and selective neuropeptide Y Y₁-receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**, 1261-1266
- HEILIG M., Soderpalm B., Engel I. A., Widerlov E. (1989): Centrally administered neuropeptide Y (NPY) produces anxiolytic-like effects in animal anxiety models. *Psychopharmacology* **98**, 524
- HERZOG H. (2000): Protein and cDNA sequences encoding human and mouse neuropeptide Y receptores (NPY-Y7), and uses thereof in drug screening assays. *PCT Int. Appl.* 26 pp. Patent, WO-00000606
- HERZOG H., Hort Y. J., Ball H. J., Hayes G., Shine J., Selbie L. A. (1992): Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5794-5798
- HIGUCHI H., Costa E., Yang W.-Y. T. (1988): Neuropeptide Y inhibits the nicotine-mediated release of catecholamines from bovine adrenal chromaffin cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **244**, 468-474
- HIPSKIND P. A., Lobb K. L., Nixon J. A., Britton T. C., Bruns R. F., Catlow J., Dieckman-McGinty D. K., Gackenhimer S. L., Gitter B. D., Iyengar S., Schober D. A., Simmons R., A., Swanson S., Zarrinmayeh H., Zimmeffilan D. M., Gehlert D. R. (1997): Potent and selective 1,2,3-trisubstituted indole NPY Y₁-antagonists. *J. Med. Chem.* **40**, 3712-3714
- HUTZLER C. (2001): Synthese und pharmakologische Aktivität neuer Neuropeptid Y Rezeptorliganden: Von N,N'-disubstituierten Alkanamiden zu hochpotenten Y₁-Antagonisten der Argininamid-Reihe. *Dissertation, Universität Regensburg*
- INUI A. (1999): Neuropeptide Y: a key molecule in anorexia and cachexia in wasting disorders? *Molecular Medicine Today* **5**, 79-85

- JUNG G., Beck-Sickinger A. G., Dürr H., Gaida W., Schnorrenberg G. (1991): α -Helical, small molecular size analogues of neuropeptide Y: structure-activity-relationships. *Biopolymers* **31**, 613
- KAISER E., Colescott R. L., Bossinger C. D., Cook P. I. (1970): Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **34**, 595-598
- KALRA S. P., Dube M. G., Fournier A., Kalra P. S. (1991): Structure-function analysis of stimulation of food intake by neuropeptide Y: effects of receptor agonists. *Physiol. Behav.* **50**, 5-9
- KANATANI A., Kanno T., Ishihara A. (1999): The novel neuropeptide Y Y₁ receptor antagonist J-104870: A potent feeding suppressant with oral bioavailability. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **266**, 88-91
- KANATANI A., Mashiko S., Murai N., Sugimoto N., Ito J., Fukuroda T., Fukami T., Morin N., MacNeil D. J., Van Der Ploeg L. H. T., Saga Y., Nishimura S., Ihara M. (2000): Role of the Y₁ receptor in the regulation of neuropeptide Y-mediated feeding: comparison of wild-type, Y₁ receptor-deficient, and Y₅ receptor-deficient mice. *Endocrinology* **141** (3), 1011-1016
- KAYE W. H., Berretini W., Gwirtsman H., George D. T. (1990): Altered cerebrospinal fluid neuropeptide Y and peptide YY immunoreactivity in anorexia and bulimia nervosa. *Arch. Gen. Psychiat.* **47**, 548-556
- KEARNEY P. C., Fernandez M., Flygare J. A. (1998): Solid-phase synthesis of 2-Aminothiazoles. *J. Org. Chem.* **63**, 196-200
- KEMPTER G., Ehrlichmann W., Scharschmidt C., Jumar A., Klepel M., Kuehne S. (1979): Partially-hydrogenated quinazolinyl-2-carbamic acid esters and benzocondensed derivatives. *DE 137713 Chem. Abstr.* **92**: 128949
- KIMMEL J. R., Pollock H. G. (1971): A new pancreatic polypeptide hormone. *Fed. Proc.* **30**, 1318
- KNIEPS S. (1995): Guanidine der Arpromidinreihe als Modellsubstanz zur Entwicklung nicht-peptidischer Neuropeptid-Y-Rezeptorliganden: Synthese und pharmakologische Prüfung neuer NPY Y₁-Antagonisten. *Dissertation, Freie Universität Berlin*

- KNIEPS S., Dove S., Michel M. C., Rottmeier K., Wernet W., Bernhardt G., Buschauer A. (1996): ω -Phenyl- ω -(2-pyridyl)alkyl-substituted bisguanidines are moderate neuropeptide Y antagonists. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **6**, 27-30
- KNIEPS S., Michel M. C., Dove S., Buschauer A. (1995): Non-peptide neuropeptide Y antagonists derived from the histamine H₂ agonist arpromidine: Role of the guanidino group. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **5**, 2065-2070
- KNORR R., Trzeciak A., Bannwarth W., Gillessen D. (1989): New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Lett.* **30**, 1927-1930
- KODUKULA K., Arcuri M., Cutrone J. Q., Hugill R. M., Lowe S. E., Pirnik D. M., Shu Y. Z., Fernandes P. B., Seethala R. J. (1995): BMS-192548, a tetracyclic binding inhibitor of neuropeptide Y receptors from aspergillus niger WB 2346. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity. *J. Antibiot.* **48**, 1055-1059
- KRSTENANSKY I. L., Owen T. I., Buck S. H., Hagaman K. A., Lean L. R. (1990): C-terminal modifications of neuropeptide Y and its analogs leading to selectivity of the mouse brain receptor over the porcine spleen receptor. *Neuropeptides* **17**, 117-120
- LAPATSANIS I., Miliadis G., Froussios K., Kolovos M., (1983): Synthesis of *N*-(2,2,2-Trichloroethoxycarbonyl)-(L)-amino acids and *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-(L)-amino acids involving succinimidoxymethyl anion as a leaving group in amino acid protection. *Synthesis Communications* **8**, 671-673
- LARHAMMER D., Blomquist A. G., Yee F., Jazin E., Yoo H., Wahlestedt C. (1992): Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y₁ type. *J. Biol. Chem.* **267**, 10935-10938
- LARHAMMER D., Soderberg C., Blomquist A. G. (1993): The biology of neuropeptide Y and related peptides. Colmers W. F., Wahlestedt C. (eds.), *Humana Press Inc., Totowa*, 1-11
- LAYER R. W. (1963): Chemistry of imines. *Chem. Rev.* **63**, 489-510
- LEE B. H., Gerfen G. J., Miller M. J. (1984): Constituents of microbial iron chelators. Alternate synthesis of δ -*N*-hydroxy-(L)-ornithine derivatives and applications to the synthesis of rhodotorulic acid. *J. Org. Chem.* **49**, 2418-2423

- LEE C. C., Miller R. J. (1998): Is there really an NPY Y₃ receptor? *Regul. Pept.* **75-76**, 71-78
- LEE J., Griffin J. H. (1996): Solid-phase total synthesis of bacitracin A. *J. Org. Chem.* **61**, 3983-3986
- LEE M. S., Nakanishi H., Kahn M. (1999): Enlistment of combinatorial techniques in drug development. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2**, 332-341
- LI M., Wilson L. J., Portlock D. E. (2001): A simple solid-phase synthesis of disubstituted guanidines using Rink amide resin as an amine component. *Tetrahedron Lett.* **42**, 2273-2275
- LIN K. (1975): Altering plant flowering and sexual reproduction. US 3901684; *Chem. Abstr.* **84**: 30495
- LIN P., Ganesan A. (1998): Solid-phase-synthesis of *N*-acyl-*N'*-carbamoylguanidines. *Tetrahedron Lett.* **39**, 9789-9792
- LUNDELL I., Blomquist A. G., Berglund M. M., Schober D. A., Johnson D., Statnick M. A., Gadski R. A., GeWert D. R., Larhammer D. (1995): Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY. *J. Biol. Chem.* **270**, 29123-29128
- LUNDELL I., Berglund M. M., Larhammar D. (2000): Y₄ receptor in different species. Functional expression and binding. *Methods Mol. Biol.* **153**, 45-51
- MARSH D. J., Erickson J. C., Hollopeter G., Palmiter R. D. (1997): Role of the Y₅ neuropeptide Y receptor in feeding and obesity. *Regul. Pept.* **71**, 212-217
- MATSUMOTO M., Nomura T., Momose K., Ideda Y., Kondou Y., Akihott H., Tongami J., Kimura Y., Odada M., Yamaguchi T. (1996): Inactivation of a novel neuropeptide Y/peptide YY receptor gene in primate species. *J. Biol. Chem.* **271**, 27217-27220
- MCCORMACK J. G., Cobbald P. H. (1991): Cellular Calcium – A Practical Approach. *Oxford, University Press*, 1-37
- McOMIE J. F. W., West D. E. (1973): 3,3'-Dihydroxybiphenyl. H. Baumgarten (ed), in *Org. Synth. Collect.* **Vol. V**, 412-423

- MEHTA A., Jaouhari R., Benson T. J., Douglas K. T. (1992): Improved efficiency and selectivity in peptide synthesis: Use of triethylsilane as a carbocation scavenger in deprotection of t-butyl esters and t-butoxycarbonyl-protected sites. *Tetrahedron Lett.* **33**, 5441-5444
- MEISTER A., Moser C., Knieps S., Kracht J., Berhardt G., Schlicker E., Buschauer A. (1999): Is 3,3-methyliminodipropyl-1,1'-bis{N²-[4-(4-bromophenyl)-4-(2-pyridyl)butyl]-N³-cyclo-hexylguanidine} (SK 48) a nonpeptide NPY Y₂ receptor agonist? *5th International NPY Meeting*, 17-22. April 1999, Grand Cayman, Abstracts P 34
- MERZ S. (1997): Synthese und Neuropeptid Y Y₁-antagonistische Wirkung von N-substituierten N^α-(Diphenylacetyl)argininamiden. *Diplomarbeit, Universität Regensburg*
- MICHEL M. C., Motulsky H. J. (1990): A competitive nonpeptidergic antagonist at neuropeptide Y receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **611**, 392-394
- MICHEL M. C., Buschauer A. (1992): Neuropeptide Y and its antagonists. *Drugs Fut.* **17**, 39-45
- MICHEL M. C., Beck-Sickinger A., Cox H., Doods H. N., Herzog H., Larhammer D., Quirion R., Schwartz T., Westfall T. (1998) XVI. International Union of Pharmacology. Recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacol. Rev.* **50**, 143-150
- MITSUNOBU O.; Yamada M.; Mukaiyama T. (1967): Preparation of esters of phosphoric acid by the reaction of trivalent phosphorus compounds with diethyl azodicarboxylate in the presence of alcohols. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **40**, 935-9
- MOSER C. (1999): Pharmakologische Untersuchungen zur NPY Y₁-, Y₂-, und Y₅-Rezeptorselektivität peptidischer und nichtpeptidischer Liganden: Klonierung und funktionelle Expression des humanen Y₅-Rezeptors in HEC-1-B-Zellen. *Dissertation, Universität Regensburg*
- MOSER C., Bernhardt G., Michel J., Schwarz H., Buschauer A. (2000): Cloning and functional expression of the hNPY Y₅ receptor in human endometrial cancer (HEC-1B) cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol* **78**, 134-142

- MOTULSKY H. J., Michael M. C. (1988): Neuropeptide Y mobilizes Ca^{2+} and inhibits adenylate cyclase in human erythroleukemia cells. *Am. Phys. Soc.* E880-E885
- MÜLLER M. (1998): Neue Leitstrukturen zur Entwicklung nichtpeptidischer Neuropeptid Y Y_1 -Rezeptorantagonisten: Synthese und Struktur-Wirkungsbeziehungen basisch substituierter Carbonsäureamide. *Dissertation, Universität Regensburg*
- MÜLLER M., Knieps S., Geßele K., Dove S., Bernhardt G., Buschauer A. (1997): Synthesis and neuropeptide Y Y_1 receptor antagonistic activity of *N,N*-disubstituted ω -guanidino- and ω -aminoalkanoic acid amides. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **330**, 333-342
- NAGARAJAN S., Ho T. L., DuBois G. E. (1992): A simple method for synthesis of unsymmetrical trisubstituted guanidines. *Synth. Commun.* **22**, 1191-1198
- NICOLAOU K. C., Sorensen E. (1996): Classics in Total Synthesis, Targets, Strategies, Methods. *VCH Weinheim*
- OHLSTEIN E. H., Ruffolo R. R. (2000): Drug discovery in the next millenium. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 177-191
- PALCZEWSKI K. , Kumasaka T., Hori T., Behnke C. A., Motoshima H., Fox B. A., Le Trong I., Teller D. C., Okada T., Stenkamp R. E., Yamamoto M., Miyano M. (2000): Crystal structure of rhodopsin: a G-protein-coupled receptor. *Science*; **289**: 739-45.
- PATEK M., Smrcina M., Nakanishi E., Izawa H. (2000): Solid-phase Synthesis of Substituted Guanidines Using a Novel Acid Labile Linker. *J. Comb. Chem.* **2**, 370-377
- PAUL R., Anderson G. W. (1960): *N,N'*-Carbonyldiimidazole, a new peptide-forming reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 4596-4600
- PEDRAZZINI T., Seydoux J., Kunstner P., Aubert J. F., Grouzmann E., Beennann F., Brunner H. R. (1998): Cardiovascular response, feeding behaviour and locomotor activity in mice lacking the NPY Y_1 receptor. *Nat. Med.* **4**, 722-726
- PEDRAZZINI T., Seydoux J. (2000): Neuropeptide Y Y_1 receptor-deficient mice: generation and characterization. *Methods Mol. Biol.* **153**, 91-100

- PHENG L. H., Perron A., Quirion R., Cadieux A., Fauchere J. L., Dumont Y., Regoli D. (1999): Neuropeptide Y-induced contraction is mediated by neuropeptide Y Y₂ and Y₄ receptors in the rat colon. *Eur. J. Pharmacol.* **374**, 85-91
- PIERROZ D., Catzellis C., Aebi A., Rivier J., Aubert M. (1996): Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulin-like growth factor I secretion in intact adult male rats. *Endocrinology* **137**, 3-12
- PING DU J., Salon J. A., Tamm J. A., Hou C., Cui W., Walker M. W., Adham N., Dhanoa D. S., Islam I., Vaysse P. J., Dowling B., Shifman Y., Boyle N., Rueger H., Schmidlin T., Yamaguchi Y., Branchek T. A., Weinshank R. L., Gluchowski C. (1997): Modeling the G-protein-coupled neuropeptide Y Y₁ receptor agonist and antagonist binding sites. *Protein Eng.* **10(2)**, 109-117
- PODONA T., Guardiola-Lemaitre B., Caignard D. H., Adam G., Pfeiffer B., Renard P., Guillaumet G. (1994): 3,4-Dihydro-3-amino-2H-1-benzopyran Derivatives as 5-HT_{1A} Receptor Ligands and Potential Anxiolytic Agents. 1. Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies. *J. Med. Chem.* **37(12)**, 1779-93
- POINDEXTER G. S., Swann R. T., Bruce M. A., Morton M. A., Huang Y., Sit S., Breitenbucher J. G. (1998): Dihydropyridine NPY antagonists: cyanoguanidine derivatives. PCT Int. Appl. WO 9854136; *Chem. Abstr.* **130**: 24976
- POTTER E. K., Mitchell L., McCloskey M. J., Tseng A., Goodman A. E., Shine J. (1989): Pre- and postjunctional actions of neuropeptide Y and related peptides. *Regul. Pept.* **25**, 167-177
- POTTER E. K., Barden J. A., McCloskey M. J. D., Selbie L. A., Tseng A., Herzog H. & Shine J. (1994): A novel neuropeptide Y analog, N-acetyl[Leu²⁸, Leu³¹]Neuropeptide Y(24-36), with functional specificity for the presynaptic (Y₂) receptor. *Eur. J. Pharm.* **267**, 253-262
- RAMAINGAM K., Woodard R. W. (1988): Synthesis of stereospecific deuterium-labeled homoserines and homoserine lactones. *J. Org. Chem.* **53**, 1900-1903
- RINK H. (1987): Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxydiphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Lett.* **37**, 6961-6964

- ROBINSON S., Roskamp E. J. (1997) : solid phase synthesis of guanidines. *Tetrahedron* **40**, 6697-6705
- ROSSI S. (1955): Composti tiazolici dalla carbetossi-isothiourea. *Gazz. Chim. Ital.* **85**, 898-904
- RUDINGER J. und Ruegg U. (1973): Preparation of *N*-succinimidyl 3-(4-hydroxyphenyl)propionate. *Biochem. J.* **133**, 538-539
- RUDOLF K., Eberlein W., Engel W., Wieland H., Willim K. D., Entzeroth M., Wienen W., Beck-Sickinger A. G., Doods H. N. (1994): The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide Y Y₁ receptor antagonist: BIBP 3226. *Eur. J. Pharm.* **271**, R11-13
- RUDOLF K., Eberlein W., Engel W., Beck-Sickinger A. G., Wittneben H., Wieland H. A., Doods H. (1997): BIBP 3226, a potent and selective neuropeptide Y Y₁-receptor antagonist. Structure-activity studies and localisation of the human Y₁ receptor binding site. In: Grundemar L., Bloom S. R. (eds.) *Neuropeptide Y and Drug Development*, Academic Press, 175-190
- RUEGER H., Schmidlin T., Rigollier P., Yamaguchi Y., Tintelnot-Blomley M., Schilling W., Criscione L. (1997a): Quinazoline-2,4-diazirines as NPY receptor antagonists. PCT Int. Appl. WO 97 20822. *Chem. Abstr.* **127**: 108942p
- RUEGER H., Schmidlin T., Rigollier P., Yamaguchi Y., Tintelnot-Blomley M., Schilling W., Criscione L., Mah R. (1997): Preparation of 2-aminoquinazolines as neuropeptide Y subtype Y₅ receptor antagonists. PCT Int. Appl. WO 97 20823; *Chem. Abstr.* **127**: 108941
- SAUDECK V., Pelton I. T. (1990): Sequence-specific ¹H-NMR assignment and secondary structure of neuropeptide Y in aqueous solution. *Biochem.* **29**, 4509-4515
- SAUTEL M., Martinez R., Munoz M., Peitsch M. C., Beck-Sickinger A. G., Walker P. (1995): Role of a hydrophobic pocket of the human Y₁ neuropeptide Y receptor ligand binding. *Mol. Cell. Endocrin.* **112**, 215-222
- SCHAFFHAUSER A. O., Stricker-Krongrad A., Brunner L., Cumin F., Gerald C., Whitebread S., Criscione L., Hotbauer K. G. (1997): Inhibition of food intake by neuropeptide Y Y₅ receptor antisense oligodeoxynucleotides. *Diabetes* **46**, 1792-1798

- SCHALKHAUSER F. (1998): Herstellung unsymmetrischer Guanidine in Lösung und an polymeren Trägern: Synthese und pharmakologische Wirkung neuer hochpotenter Histamin H₂-Rezeptoragonisten. *Dissertation, Universität Regensburg*
- SCHNABEL E. (1967): Improved synthesis of *tert.*-butoxycarbonyl amino acids by a constant pH reaction. *Liebigs Ann. Chem.* **7**, 188-96
- SCHNABEL E., Klostermeyer H., Berndt H. (1971): Selective acidolytic cleavage of the *tert.*-butoxycarbonyl group. *Liebigs Ann. Chem.* **7**, 90
- SCHWARTZ T. W., Sheikh S. P., O'Hare M. M. T. (1987): Receptors on pheochromocytoma cells for two members of the PP-fold family - NPY and PP. *FEBS Lett.* **225**, 209-214
- SCHNEIDER S. E., Bishop P. A., Salazar M. A., Bishop O. A., Anslyn E. V. (1998): Solid Phase Synthesis of Oligomeric Guanidiniums. *Tetrahedron* **54**, 15063-15086
- SCHÖBER D. A., Van Abbema A. M., Smiley D. L., Bruns R. F., Gehlert D. R. (1998): The neuropeptide Y Y₁ antagonist, 1229U91, a potent agonist for the human pancreatic polypeptide-preferring (NPY Y₄) receptor. *Peptides* **19**, 537-546
- SCHUSTER A. (1998): Enantiomerenanalytik von Histamin-H₂-Rezeptoragonisten der Arpromidinreihe, deren Ester-Prodrugs und Synthesebausteinen mit HPLC und CE. *Dissertation, Universität Regensburg*, 126
- SCHWARZ T. W., Fuhlendorff I., Kjems L. L., Kristensen M. S., Vervelde M., O'Hare M., Krstenansky I. L., Bjørnholm B. (1990): Signal epitopes in the three-dimensional structure of NPY interaction with Y₁, Y₂ and PP receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **611**, 35-47
- SEIKH S. P., Williams I. A. (1990): Structural characterisation of Y₁ and Y₂ receptors for neuropeptide Y and peptide YY by affinity cross-linking. *J. Biol. Chem.* **265**, 8304-8310
- SELIGMANN B., Lebl M., Lam K. S. (1998): Solid-phase Peptide Synthesis, Lead Generation and Optimization. ISBN 0-471-15518-7, 1998 by Wiley-Liss, Inc. London
- SERRADEIL-LE GAL C., Valette G., Rouby P.-E., Pellet A., Oury-Donat F., Brossard G., Lespy L., Marty E., Neliat G., De Cointet P., Maffrand I. P., Le Fur G. (1995): SR 120819A, an orally-active and selective neuropeptide Y Y₁ receptor antagonist. *FEBS Lett.* **362**, 192-196

- SHEY J. Y., Sun C. M. (1998): Soluble polymer-supported synthesis of *N,N'*-di-(Boc)-protected guanidines. *Synlett*, 1423-1425
- SHIMAMOTO K., Ishida M., Shinozaki H., Ohfuné Y. (1991): Synthesis of four diastereomeric L-2-(carboxycyclopropyl) glycines. Conformationally constrained (*L*)-glutamate analogues. *J. Org. Chem.* **56**, 4167-4176
- STAAB H. A., Lucking M., Dürr F. H. (1962): Darstellung von Imidazolen. Synthese von Amiden, Hydraziden und Hydroxamsäuren nach der Imidazolidmethode. *Chem. Ber.* **95**, 1275-1283
- STANLEY B. G., Leibowitz S. F. (1984): Neuropeptide Y induces feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci.* **35**, 2635-2642
- STANLEY B. G., Leibowitz S. F. (1985): Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3940-3943
- STANLEY B. G., Magdalin W., Seirafi A., Nguyen M. M., Leibowitz S. F. (1992): Evidence of neuropeptide Y mediation of eating produced by food deprivation and for a variant of the Y₁ receptor mediating this peptide's effect. *Peptides* **13**, 581-587
- STARK H., Krause M., Arrang J. M., Ligneau X., Schwartz J. C., Schunack W. (1994): Unsymmetrically substituted guanidines as potent histamine H₃-receptor-antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **4**, 2907-2912
- TAM S.Y.-K., Klein R. S., Wempfen I., Fox J. J. (1979): Nucleosides 112: Synthesis of some new pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazines and their C-nucleosides. *J. Org. Chem.* **44**, 4547-4553
- TATEMOTO K., Carlquist M., Mutt V. (1982): Neuropeptide Y - a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* **296**, 659-660
- THIELE T. E., Marsh D. J., Marie L. S., Bemstein I. L., Palmiter R. D. (1998): Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. *Nature* **396**, 366-369
- TONAN K., Kwata Y., Hamguchi K. (1990): Conformations of isolated fragments of pancreatic polypeptide. *Biochem.* **29**, 4424-4429

- UEKI M., Amemya M.(1987): Removal of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) group with tetrabutylammonium fluoride. *Tetrahedron Lett.* **28**, 6617-6620
- UFFRECHT A. (1996): Synthese und In-vitro-Pharmakologie nichtpeptidischer und peptidischer Neuropeptid Y-Antagonisten mit Guanidin- oder Argininamid-Partialstruktur. *Dissertation, Freie Universität Berlin*
- WAHLESTEDT C., Yanaihara N., Hakanson R. (1986): Evidence for different pre- and postjunctional receptors for neuropeptide Y and related peptides. *Regul. Pept.* **13**, 307-318
- WAHLESTEDT C., Grundemar L., Hakanson R., Heilig M., Shen G. H., Zukowska-Grojec Z., Reis D. J. (1990): Neuropeptide Y receptor subtypes Y₁ and Y₂. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **611**, 7-26
- WAHLESTEDT C., Regunathan S., Reis D. J. (1992): Identification of cultured cells selectively expressing Y₁-, Y₂ or Y₃-type receptors for neuropeptide Y/peptide YY. *Life Sci.* **50**, PL7-PL12
- WALKER P., Munoz M., Martinez R., Peitsch M. (1994): Acidic residues in extracellular loops of the human Y₁ neuropeptide Y receptor are essential for ligand binding. *J. Biol. Chem.* **269**, 2863-2869
- WANG F., Hauske J. R. (1997): Solid-Phase-Synthesis of 3,4-Dihydroquinazoline. *Tetrahedron Lett.* **38**, 8651-8654.
- WEBB T. R., Eigenbrot C. (1991): Conformationally restricted arginine analogues. *J. Org. Chem.* **56**, 3009-3016
- WEBER L. (2000): Developments in combinatorial chemistry. *Pharm. Manuf. Int.* 45-48
- WEINBERG D. H., Sirinathsinghji D. J. S., Tan C. P., Shiao L.-L., Morin N., Rigby M. R., Heavens R. H., Rapoport D. R., Bayne M. I., Cascieri M. A., Strader C. D., Linemeyer D. L., MacNeil D. J. (1996): Cloning and expression of a novel neuropeptide Y receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 16435-16438
- WIELAND H. A., Engel W., Eberlein W., Rudolf K., Doods H.N. (1998): Subtype selectivity of the novel nonpeptide neuropeptide Y Y₁ receptor antagonist BIBO 3304 and its effect on feeding in rodents. *Br. J. Pharmacol.* **125**, 549-555

- WIELAND H. A., Hamilton S. B., Krist B., Doods H. (2000): The role of NPY in metabolic homoeostasis: implications for obesity therapy. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **9**, 1327-1346
- WILDING J. P. H., Kruszynska Y. T., Lambert P. D., Bloom S. R. (1995): Acute effects of central neuropeptide Y injection on glucose metabolism in fasted rats. *Clin. Sci.* **89**, 543-548
- WILSON L. J., Klopfenstein S., R., Li M. (1999): A Traceless Linker Approach to the Solid Phase Synthesis of Substituted Guanidines Utilizing a Novel Acyl Isothiocyanate Resin. *Tetrahedron Lett.* **40**, 3999-4002
- WITIKOP B., Beiler T. W. (1954): Studies on Schiffbases in connection with the mechanism of transamination. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 5589
- WOLDBYE D. P. D. (1997): Neuropeptide Y receptors – a novel antiepileptic target? *Regul. Pept.* **71** (3), 217
- YAN H., Yang J., Marasco J., Yamaguchi K., Brenner S., Karbon W. (1996): Cloning and functional expression of cDNAs encoding human and pancreatic polypeptide receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4661-4665
- YU C. and Taylor J. W. (1999): Synthesis and study of peptides with semirigid i and i+7 side-chain bridges designed for α -helix stabilization. *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 161-175
- ZARRINMAYEH H., Nunes A. M., Ornstein P. L., Zimmerman D. M., Arnold M. B., Schober D. A., Gackenhimer S. L., Bruns R. F., Hipskind P. A., Britton T. C., Cantrell B. E., Gehlert D. R. (1998): Synthesis and evaluation of a series of novel 2-[(4-chlorophenoxy)methyl]benzimidazoles as selective neuropeptide Y Y₁ receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **41**, 2709-2719
- ZHONG H. M., Greco M. N., Maryanoff B. E. (1997): Solid-phase-synthesis of arginine containing peptides by guanidine attachment to a solfonyl linker. *J. Org. Chem.* **62**, 9326-9330
- ZIMANYI I. A., Fathi Z., Poindexter G. S. (1998): Central control of feeding behaviour by neuropeptide Y. *Curr. Pharm. Des.* **4**, 349-366

ZUANA O. D., Sadlo M., Germain M., Feletou M., Chamorro S., Tisserand F., Montrion C., Boivin J.F., Duhault J., Boutin J. A., Levens N. (2001): Reduced food intake in response to CGP 71683A may be due to mechanisms other than NPY Y₅ receptor blockade. *Int. J. Obes. Rel. Metab. Disord.* **25**, 84-94

ZUKOWSKA-GROJEC Z., Haas M., Bayork M. (1986): Neuropeptide Y and peptide YY mediate nonadrenergic vasoconstriction and modulate sympathetic responses in rats. *Regul. Pept.* **15**, 99-110