

**Methodenentwicklungen zur Festphasensynthese.
Parallelsynthese neuer Naturstoff- Hybride, -Derivate und –
Makrozyklisierungsprodukte über chemische Marker
Strategien.**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom- Chemiker Alejandro García Hernán

geboren am 19.12.1973 in Alicante (Spanien)

Gutachter

1.

2.

Tag der öffentlichen Verteidigung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Molekulare Naturstoff-Forschung (Leitung Frau Prof. Dr. Susanne Grabley) am Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung in Jena in der Zeit von Juni 1998 bis September 2001 unter Anleitung von Herr Prof. Dr. Ralf Thiericke (CyBio Screening GmbH, Jena) durchgeführt. Prof. Dr. Bruno Schönecker (Friedrich Schiller Universität Jena) hat die externe Betreuung übernommen.

A mis padres

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ralf Thiericke und Frau Prof. Dr. Susanne Grabley danke ich für die interessante Aufgabenstellung, für die stete Unterstützung und das Vertrauen, das sie in mich setzten.

Herrn Prof. Dr. Bruno Schönecker danke ich für die Betreuung dieser extern durchgeführten Promotion und für sein Interesse an dieser Arbeit.

Dr. Ernst Römer, Dr. Isabel Sattler, Dr. Frank Tries, Dr. Ralf Wyrwa, Dr. Karin Adelhelm, Dr. Uta Holfter und Dr. Katrin Undisz danke ich für zahlreiche Diskussionen und Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Für die finanzielle Unterstützung, die ich während meiner Arbeit erfahren habe, bedanke ich mich bei dem Hans Knöll Institut für Naturstoffforschung e.V., Jena.

Ein großes Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning und seiner Gruppe an der Universität Clausthal, die mich in ihre Labors aufgenommen und mich mit ihrem Wissen unterstützt haben. Darüber hinaus möchte Ich mich für die Hilfe im Labor bei Antje Grützmann, Christina Täuber, Bianca Schneider, Heike Heinecke, Tessa Heinrich und Ulrike Valentin bedanken.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilungen Molekulare Naturstoff-Forschung und Screening Center des Hans-Knöll-Instituts gilt mein herzlicher Dank für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, für die ständige Hilfsbereitschaft und für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Schließlich möchte ich Herrn Dr. Felipe Pineda für seine ermutigende Freundschaft und meinen Eltern und meiner Familie die bedingungslose Unterstützung danken.

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis.....	iv
1 <u>Allgemeiner Teil</u>	1
1.1. Allgemeine Einführung.....	1
1.2. Festenphasenchemie.....	3
1.2.1. Allgemeine Aspekte der Festenphasenchemie.....	3
1.2.2. Trägermaterialien.....	4
1.2.3. Bindung und Abspaltung des Substrates vom Trägermaterial.....	5
1.3. Praktische Aspekte der Analytik in der Festenphasenchemie und in der Parallelsynthese.....	7
1.4. Anforderungen an die Naturstoffe für die Parallelsynthese.....	9
2. <u>Aufgabenstellung</u>	11
3. <u>Ergebnisse</u>	14
3.1. Einbau eines chemischen Markers.....	14
3.2. Immobilisierung von Naturstoffen an chemischen Markern.....	20
3.2.1. Einleitung.....	20
3.2.2. Direkte Kopplung von Naturstoffen und Naturstoffderivaten an chemische Markern.....	20
3.2.3. Umfunktionalisierung des Markers mit Bernsteinsäureanhydride zur Immobilisierung von Lobelin und Yohimbin.....	23
3.2.4. Umfunktionalisierung des Markers mit Bromessigsäure zur Immobilisierung von Nortropin.....	26
3.3. Parallelsynthese von Nortropin Derivaten.....	30
3.3.1. Einleitung.....	30
3.3.2. Variierung bei der Derivatisierung des chemischen Markers.....	31
3.3.3. Variierung bei der Derivatisierung eines Festenphase-gebundenen Nortropinderivates.....	35
3.4. Synthesewege zur Herstellung von Substanzbibliotheken mit Nortropin als Gerüstbaustein.....	40
3.4.1. Einleitung.....	40
3.4.2. Immobilisierung von Nortropin und Oxidation der Hydroxylgruppe zum Keton.....	41
3.4.3. Reduktive Aminierung des Ketons.....	45
3.4.4. Variierung der Aminekomponente.....	48
3.4.5. Acylierung an sekundären Aminen des Tropangerüsts.....	49
3.4.6. Reduktion der Nitro-Gruppe und Testung verschiedener Acylierungsreagenzien.....	51
3.5. Synthese von Naturstoff Hybriden und makrozyklische Derivate.....	54
3.5.1. Einleitung.....	54
3.5.2. Einführung einer Verzweigungsstelle nach dem chemischen Marker.....	54
3.5.3. Synthese von einem Naturstoff Hybrid.....	58
3.5.4. Synthese von einem makrozyklischen Nortropin Derivat.....	60
4. <u>Zusammenfassung</u>	65
5. <u>Experimenteller Teil</u>	69
5.1. Chemikalien und Lösungsmittel.....	69
5.2. Analytik.....	69
5.2.1. Hochleistungs Flüssigkeitschromatographie- Massenspektroskopie.....	69
5.2.2. Präparative Hochleistungsflüssigchromatographie.....	70
5.2.3. FT-ATR-IR Spektroskopie.....	70

5.2.4. UV-VIS Spektroskopie.....	70
5.2.5. NMR Spektroskopie.....	71
5.2.6. Chloranil Test. Qualitativer Nachweis von Aminogruppen.....	71
5.2.7. Quantitative Colorimetrische Bestimmung der Fmoc Gruppen.....	72
5.2.8. Derivatisierung des Harzes mit einem chemischen Marker. 1,3- Diaminopropan mit p-Nitrophenylalanin verknüpft am Wang Linker. Synthese des festgebundenes {3-[2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(4-nitrophenyl)-propionylamino]-propyl}-carbaminsäure benzylesters.....	73
5.3. Herstellung von Amino-, Amido- und Carboxy- Gruppen nach Immobilisierung und Abspaltung vom Harz von Fmoc- geschütztem Glycin.....	74
5.3.1. Immobilisierung und Abspaltung von PS-Wang Harz von Fmoc-Glycin. Substanz 1: Fmoc Glycin.....	74
5.3.2. Immobilisierung und Abspaltung am PS-Wang Harz von Fmoc-Glycin durch eine Carbamate-1,3-Diaminopropan Bindung. Substanz <u>2</u> (3-Aminopropylcarbonyl)-methyl]-carbaminsäure 9H-fluoren-9-ylmethyl ester).....	75
5.3.3. Immobilisierung und Abspaltung vom PS-Rink Harz von Fmoc-Glycin. Substanz <u>3</u> (Carbamoylmethyl-carbam säure 9H-fluoren-9-ylmethyl ester).....	77
5.4. Immobilisierung von Naturstoffen an chemischen Markern. Festphasen- Immobilisierung am mit dem chemischen Marker (1,3- Diaminopropan mit p-Nitrophenylalanin verknüpft) derivatisierten Wang Linker.....	78
5.4.1. Direkte Immobilisierung von 21-Hydroxyprogesteronhemisuccinat und 17 β -Estradiolhemisuccinat. Substanzen <u>4</u> (3-[2-{3-[2-(10,13-Dimethyl-3-oxo-2,3,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-16-yl)-2-oxo-ethoxycarbonyl]-propionylamino}-3-(4-nitrophenyl)-propionylamino]-propyl-ammonium und <u>5</u> -[2-[3-(3-Hydroxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yloxy-carbonyl)-propionylamino]-3-(4-nitro-phenyl)-propionylamino]-propyl-ammonium-trifluoroacetat.....	78
5.4.2. Immobilisierung von Yohimbin und Lobelin mit Bernsteinsäureanhydrid als zweites Linker. Substanzen <u>6</u> : 3-[2-[3-(1-Methoxycarbonyl-1,2,3,4,4a,5,7,8,13,13b,14,14a-dodecahydro-indolo[2',3':3,4]pyrido[1,2-b]isoquinolin-2-yloxy-carbonyl)-propionylamino]-3-(4-nitro-phenyl)-propionylamino]-propyl-ammonium und <u>7</u> : 3-[2-(3-{2-[1-Methyl-6-(2-oxo-2-phenyl-ethyl)-piperidin-2-yl]-1-phenyl-ethoxycarbonyl}-propionylamino)-3-(4-nitro-phenyl)-propionylamino]-propyl-ammonium-trifluoroacetat.....	81
5.4.3. Immobilisierung von Nortropin mit Bromessigsäureanhydrid als zweiten Linker und Oxidation des festgebundenen Nortropinderivats. Substanzen <u>8</u> : 3-[2-[2-(3-Hydroxy-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-8-yl)-acetylamino]-3-(4-nitrophenyl)-propionylamino]-propyl-ammonium und <u>9</u> : 3-{3-(4-Nitro-phenyl)-2-[2-(3-oxo-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-8-yl)-acetylamino]-propionylamino}-propyl-ammonium-trifluoroacetat.....	84
5.5. Parallelsynthese von Nortropin-Derivaten. Parallele Herstellung von Nortropinderivaten am chemischen Marker 1,3-Diaminopropan verknüpft mit p-Nitro-phenylalanin.....	87
5.5.1. Variation des chemischen Markers. Synthese von <u>10a</u> und <u>10b</u> : <u>R</u> und <u>S</u> 3-[2-[2-(3-Hydroxy-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-8-yl)-butyrylamino]-3-(4-nitro-phenyl)-propionylamino]-propyl-ammonium-trifluoroacetat.....	87
5.5.2. Veresterung der Hydroxy- Gruppe von Nortropin. Substanz <u>11</u> : 3-[2-(5-{3-[2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-acetoxyl]-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-8-	90

yl)-pentanoylamino)-3-(4-nitro-phenyl)-propionylamino]-propyl-ammonium-trifluoroacetat.....	
5.6. Synthesewege zur Herstellung von Substanzbibliotheken mit Nortropin als Gerüst. Einsatz eines selektiv derivatisierbaren chemischen Markers für die Festphasensynthese von Nortropinderivaten.....	93
5.6.1. Einsatz von 4-Fluor-3-nitrobenzoesäure als chemischer Marker. Immobilisierung von Nortropin und Oxidation der Hydroxy- Gruppe. Synthese von <u>12</u> : 4-(3-Hydroxy-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-8-yl)-3-nitro-benzamid und <u>13</u> : 3-Nitro-4-(3-oxo-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-8-yl)-benzamid.....	93
5.6.2. Reduktive Aminierung am Tropan Ring und Variierung der Aminkomponente. Substanzen <u>14</u> <i>endo</i> und <u>14</u> <i>exo</i> : 3-Nitro-4-(3-phenethylamino-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-8-yl)-benzamid.....	97
5.6.3. Reduktion der Nitrogruppe des chemisches Markers und Acylierung des resultierenden Anilins. Reduktion der Nitrogruppe des chemisches Markers und Acylierung des resultierendes Anilins. Substanz <u>15</u> : 3-Amino-4-(3-oxo-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-8-yl)-benzamid.....	101
5.7. Synthese von Naturstoff Hybriden und makrozyklische Derivaten.....	105
5.7.1. Einfügung ein selektiv derivatisierbare Verzweigungsstelle nach dem chemischen Markern.....	105
5.7.2. Synthese eines Naturstoffhybrides.....	106
5.7.3. Synthese von einem makrozyklischen Nortropin Derivat.....	108
6. <u>Literatur</u>	107

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	Absolut
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
Äq.	Äquivalent(e)
AS	Aminosäure
API-ES	<i>Atmospheric Pressure Ionisation- Electrospray</i> . Atmosphärische Druck Ionisierung- Elektrospray
ber.	berechnet
bez.	bezogen
br	breites Signal
d	Dublett
DBF	Dibenzofulven
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	doppeltes Dublett
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIC	N,N'- Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N-Ethyl-diisopropylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N- Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DVB	Divinylbenzol
ES-MS	Electrospray-MS
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
gef.	gefunden
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
IR	Infrarot Spektroskopie
J	¹ H-NMR-Kopplungskonstante
kat.	katalytisch
Konf.	Konformation
m	Multipllett (NMR);mittleres Signal (IR)
M	Molar
MALDI-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Massenspektroskopie
min.	Minuten
Mmt	4-Methoxytrityl

MS	Massenspektrometrie
NMI	N-Methylimidazol
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	Kernspinresonanzspektrometrie
p	Pentett
PDC	Pyridiniumdichromat
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(pyrrolidino)-phosphonium hexafluorophosphat
PS	Polystyrol
q	Quartett
quat.	Quaternäre Kohlenstoff
R	in Molekülstrukturen: Unbestimmter organischer Rest
RP	Reversed Phase
RT	Retentionszeit
s	Singulett (NMR); schmales Signal (IR)
SC	Säulenchromatographie
sept.	Septett
SG	Schutzgruppe
SPOS	Solid Phase Organic Synthesis
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
St.	Stunden
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoroessigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TIC	Total-Ionen-Chromatogramm
TMOF	Trimethylorthoformiat
Trt	Triphenylmethyl (Trityl)
tt	dreifaches Triplett
UV	Ultraviolett



Syntheseharz mit reaktiver funktioneller Gruppe (hier- NH_2 -Gruppe)

1 Allgemeiner Teil

1.1 Allgemeine Einführung

Der Mechanismus lebender Zellen ist durch komplexe chemische Interaktionen zwischen einer Vielzahl von Molekülen reguliert. Die von der modernen Medizin verwendeten Wirkstoffe können diese molekularen Interaktionen für therapeutische Zwecke gezielt beeinflussen. Acetylsalicylsäure (Aspirin), vielleicht der erfolgreichste Wirkstoff überhaupt, hemmt Enzyme, die verantwortlich sind für die Synthese von Prostaglandinen (1). Die Prostaglandine spielen eine Rolle als molekulare Signale des Schmerzes und daher hat die Einnahme von Aspirin einen anschließenden schmerzstillenden Effekt.

Das Auffinden eines neuen Wirkstoffes hat in manchen Fällen die Untersuchung von bisher unbekanntem zellulären Prozessen und Mechanismen erlaubt und dadurch das Verständnis des Mechanismus einer Krankheit ermöglicht (1, 2). Sulfanilamide, die aktiven Metabolite der Antibiotika von Sulfonamid-Typ (z.B. Prontosil) bewirken die Zunahme des Blut-pH-Wertes und die Wasserexkretion (2). Es wurde zufälligerweise beobachtet, dass die Sulfanilamide außer ihrer antibiotischen Wirkung auch das Enzym Carboanhydrase hemmen. Dies führte zur Beschreibung des Enzyms und anschließend zur Entwicklung neuer Wirkstoffe mit diuretischen Effekten, die zur Behandlung von Ödemen, Glaucoma und Bluthochdruck verwendet werden (2).

Die Suche nach einem neuen Wirkstoff beginnt mit der Etablierung eines biologischen Tests die die Wirksamkeit von Wirkstoffkandidaten prüfen kann. In der Vergangenheit führte die Betrachtung der Wirkungen am Patienten von bereits eingesetzten Medikamenten zur Nutzung in neuen therapeutischen Anwendungsgebieten. Heutzutage ist der Mechanismus einer Reihe von Krankheiten bis zur molekularen Ebene verstanden. Bestimmten molekulare Interaktionen werden für einen therapeutischen Zweck als interessant identifiziert und selektive Wirkmechanismen postuliert. Im Fall von Antiinfektiva ist es das Verständnis des Metabolismus von Mikroorganismen, das zur Aufklärung eines Wirkmechanismus führte. Ein aktuelles Beispiel dafür ist die Suche nach Wirkstoffen, die das Enzym Reverse-Transkriptase, verantwortlich für die Verbreitung des HIV-Virus, hemmen.

Durch Methoden der Molekularbiologie können dann sehr selektive Testsysteme entwickelt werden, die nur bestimmte Interaktionen betrachten. Dadurch ist es möglich Wirkstoffe zu finden, die spezifisch eine bestimmte Interaktion in der Zelle beeinflussen.

Fortschritte in der Molekularbiologie und die Automatisierung erlauben die Prüfung von sehr vielen Verbindungen auf ihre Wirksamkeit. Mit heutigen Technologien, wie zum Beispiel die Miniaturisierung der Testvolumina, Erhöhung der Empfindlichkeit den Signaldetektion und die Parallelisierung bei der Handhabung von Flüssigkeiten, können bis zu 300,000 Verbindungen am Tag auf ihre biologische Wirkung getestet werden (3). Große Substanzbibliotheken werden heute auf ihre Wirksamkeit an bekannten biologischen Systemen und zur Untersuchung unbekannter zellulärer Prozesse getestet.

Die Möglichkeit der Testung von vielen Substanzen hat die Entwicklung von technischen Methoden gefördert, die eine große Anzahl an Proben generieren können. Man kann die Quelle der Testsubstanzen in der heutigen Wirkstoffsuche grob in zwei große Gruppen unterteilen: aus lebenden Organismen gewonnene Naturstoffe oder mittels Methoden der synthetischen Organischen Chemie hergestellte. Im Fall der synthetischen Chemie hat die 1963 von Merrifield entwickelte organische Festphasensynthese für Peptide eine bedeutende Rolle in dieser Entwicklung gespielt (4). Im Bereich der Naturstoff-Isolierung¹ kommen Methoden zur Anwendung, wie die Automatisierung der Probenvorbereitung (6) und die parallele Optimierung der Kultivierungsbedingungen (5), die zur Herstellung einer großen Anzahl an diversen Strukturen zur Wirkstoffsuche dienen.

Um die Chancen der Findung von Wirksubstanzen aus Bibliotheken synthetischer Substanzen als auch aus natürlichen Quellen zu erhöhen, hat man neue Kriterien bei der Auswahl von Synthesesequenzen, Synthesebausteinen, Rohmaterial und Isolierungsmethoden erarbeitet. Durch diese Kriterien sollten nur Substanzen von potentiellen Interesse als Wirksubstanzen synthetisiert bzw. isoliert werden. Im Fall der synthetischen Chemie werden mathematische Modelle genutzt, die bei der Auswahl der zu synthetisierenden Substanzen

¹ Das Wort Naturstoff wird im Sinne von Sekundärmetabolit in dieser Arbeit verwendet. Damit sind hier Substanzen gemeint, die Endprodukte eines spezifischen Stoffwechselweges sind und die in ihrem Vorkommen nicht zwingend als lebenserhaltend für den Produzentenorganismus zu betrachten sind.

behilflich sein können: bestimmte physikalisch-chemische Eigenschaften wie Lipophilie oder Bioverfügbarkeit (7), die Anpassung einer Struktur an ein bestimmtes dreidimensionales Rezeptormodell (7) oder die strukturelle Diversität der geplanten Verbindungsbibliothek (8). Im Bereich der Naturstoffisolierung ist eine sorgfältige Entscheidung über das zu untersuchende Material die wichtigste Voraussetzung für die Generierung von interessanten Proben. Als Kriterien dienen z.B. Kenntnisse aus der traditionellen Medizin verschiedener Kulturen, die Diversität der Ökosysteme, aus denen das Material stammt und taxonomische Kenntnisse über bekannte Produzenten interessanter Stoffe (9, 10).

1.2 Festphasenchemie

1.2.1 Allgemeine Aspekte der Festphasenchemie

Die Synthese an der festen Phase wurde in den 60^{er} Jahren von Merrifield eingeführt (4). Am Anfang wurde sie ausschließlich für die Synthese von oligomeren Peptiden (ein Tetrapeptid in der Erstveröffentlichung von Merrifield) angewendet. Die Vorteile der Anwendung eines heterogenen Mediums für die organische Synthese wurden aber früh für die Lösung anderer synthetischer Probleme erkannt und ausgenutzt (11). Diese Vorgehensweise vereinfacht die Automatisierung der Syntheseverfahren (siehe unten) und ermöglicht so die Bereitstellung große Probenanzahlen für die Wirkstoffsuche (12-16). Als Festphasenchemie bezeichnet man üblicherweise eine chemische Veränderung in einem heterogenen Medium, typischerweise an einem Polymer. Das Ziel der Synthese ist aber nicht, die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Polymers zu verändern, sondern ein niedermolekulares Produkt daran zu bilden. Nach erfolgter Synthese wird das erwünschte Produkt normalerweise abgespalten, und eine Aufreinigung, biologische und chemische Analyse und Wertebearbeitung zugeführt.

Die Aufarbeitung der Substanzen zwischen den verschiedenen Syntheseschritten besteht häufig aus der Abtrennung der Reagenzlösungen durch Filtration und dem Waschen der Harze. Das vereinfacht die Automatisierung der Syntheseverfahren und ermöglicht die Durchführung eines großen Anzahl an parallelen Ansätzen. Die Möglichkeit, einen großen Überschuss an Reagenzien zu verwenden, steigert die Ausbeute der einzelnen Reaktionsschritte und führt zu einer höheren Reinheit des erwarteten Produktes. Die technische Ausrüstung für die Durchführung von Synthesen an der festen Phase reicht von

einfachen Spritzen mit einer Fritte bis zu komplizierten Syntheserobotern. In allen Systemen erlaubt die Vereinfachung der Aufreinigungsschritte und die hohe Reinheit des gewünschten Produktes im Idealfall eine schnelle Charakterisierung und eine Testung auf Wirksamkeit ohne langwierige chromatographische Aufarbeitung.

1.2.2 Trägermaterialien in der Festphasenchemie

Das Grundmaterial, das im Verlauf der Synthese und bei Abspaltung des Substrates chemisch inaktiv bleibt, wird in dieser Arbeit als Trägermaterial oder Harz bezeichnet. Das Trägermaterial spielt die Rolle eines Gerüsts, an dem die chemischen Transformationen nur an bestimmten Reaktivitätszentren stattfinden. Dafür befinden sich an diesem Material reaktive Gruppen, die sich über seine Oberfläche regelmäßig verteilen. Diese reaktive Gruppen dienen direkt oder nach einer Derivatisierung als Bindungs- und Abspaltungsstellen der Substrate (siehe 1.2.3).

Trotz seiner chemischen Inaktivität in einer Reaktionssequenz haben die Eigenschaften des polymeren Materials einen sehr großen Einfluss auf das Ergebnis bei der Durchführung von Festphasensynthesen (17). Im Unterschied zur homogenen Lösungschemie geht das Quellen des Harzes und die Diffusion der Reagenzien und Substrate am Trägermaterial der Synthese voran. Für die Festphasensynthese dominiert die Anwendung von Gel-Typ Materialien. Diese Materialien sind unter Reaktionsbedingungen vom Lösungsmittel solvatisiert (quellen) und bilden dann eine pseudo-feste Phase, an der die chemische Reaktion stattfindet (18,19). Eine gute Solvatisierung erlaubt zugleich eine gute Zugänglichkeit von Reagenzien an die reaktiven Zentren. Eine hohe Beladung, das heißt eine hohe Dichte an reaktiven funktionellen Gruppen im Harz, ist von praktischem Vorteil. Damit kann man einen großen Anteil an Produkt in Verhältnis zum eingesetzten Harzvolumen (Beladungsdichte) erhalten und außerdem führt dies zu einem geringeren Lösungsmittelsverbrauch. Meistens werden Harze mit einer Beladung von ca. um 1mMol/g verwendet. Reaktionen, bei denen sich intermolekulare Wechselwirkungen oder Reaktionen zwischen den Substratmolekülen als störend auswirken, wie zum Beispiel bei intramolekularen Makrozyklisierungen, können Träger mit geringerer Beladung Verwendung (z.B. <0.25 mMol/g) finden (20, 21).

Eine einfache Handhabung ist eine wichtige Eigenschaft des polymeren Materials (22). Es werden Materialien in verschiedenen Formaten verwendet: kleine sphärische Partikel („Beads“) oder andere Oberflächen wie kronenförmige Pins oder kleine Scheiben. Ein weit verbreitetes Format für die Synthese an der festen Phase sind Polymerkügelchen. In dieser Form kann das Polymer einfach für verschiedene folgende Reaktionen verteilt werden, was bei der Synthese von kombinatorischen Bibliotheken, wie z.B. bei der „split and mix“ Methode, sehr wichtig ist (16). Darüber hinaus ist die Untersuchung des Polymers mittels analytischer Methoden wie Gelphasen NMR oder Infrarot-Spektroskopie in dieser Form vereinfacht.

Wegen seiner chemischen und mechanischen Stabilität, seiner guten Quellung in organischen Lösungsmitteln und guten Beladung wurden kommerziell erhältliches Polystyrol-Divinylbenzol und Tentagel ausgewählt. Diese Materialien wurden als Polymerkügelchen (Beads) verwendet. Styrol-Divinylbenzol Copolymer (PS), ein mikroporöses Polystyrol mit 1-2% Divinylbenzol (DVB), wurde bereits von Merrifield in der ersten Festphasensynthese von Peptiden genutzt (23). Es besitzt eine gute Quellbarkeit in DCM, Dioxan, DMF, DMSO, THF, NMP und Pyridin. Da in ACN, Diethylether, MeOH und H₂O praktisch keine Quellung erfolgt, muss bei deren Verwendung ein Co-Solvens mit gutem Quellverhalten hinzugefügt werden. PS-Harze sind mit einer Vielzahl von funktionellen Gruppen und Linkern (s.1.2.3) in Beladung von 0.5 - 4 mMol/g kommerziell erhältlich. Tentagel ist ein 1988 entwickeltes Polyethylenglycol-Polystyrol-Pfropfpolymer (24). Dieses Material besteht zu 30% aus einer Polystyrol-Matrix (1% quervernetzt mit DVB) und zu 70% aus PEG (M_w ~ 3000 g/mol), das durch Oligomerisation mit Oxiran an das Polystyrol angebunden wird. Es besitzt eine gute Quellbarkeit in den gleichen Lösungsmitteln wie das PS-Harz und wegen der polaren Gruppen aus dem PEG Anteil zusätzlich in H₂O und MeOH. Wie beim PS-Harz sind diese Harze mit verschiedenen Linkern kommerziell erhältlich. Die Beladung der käuflich erwerbbaeren Harze liegt um die 0.15 - 0.6 mMol/g.

1.2.3 Bindung und Abspaltung des Substrates vom Trägermaterial

Die Bindung und Abspaltung der Substrate am Träger findet mittels reaktiver Gruppen am Polymer statt. Diese Reaktivitätszentren werden üblicherweise als *Linker* (englisch: *to link* = binden) bezeichnet. In den meisten Anwendungen erfolgt die Immobilisierung nur vorübergehend, sie können somit als immobilisierte Schutzgruppen betrachtet werden (25).

Um einen Verlust an Substrat zu verhindern, muss die Bindung während der verschiedenen Synthese- und Waschschrte stabil sein. Zuletzt muss die Abspaltung des Produkts effizient und ohne deren Zerstörung verlaufen. Die Struktur des Linkers war in früheren Zeiten ein Bestandteil der Struktur des Polymers. Im Falle von Merrifield's erster Festphasenpeptid-Synthese wurde eine reaktive Bindungsstelle für die Immobilisierung der Carbonsäure durch Chloromethylierung des Polystyrolnetzes erzeugt (4). In der Regel handelt es sich heutzutage um bifunktionelle Moleküle, bei denen eine Bindungsstelle für die Immobilisierung des Linkers am polymeren Material und die andere zur Verknüpfung und Abspaltung des Substrats dient (25). Beispiele sind die Wang- und Rink-Linker, die am Polymer über eine Ether-Bindung an eine Phenoxyfunktion gebunden sind (s. unten und Ref: 25, 26).

Die Kriterien, die zur Auswahl der Linker in dieser Arbeit führten, waren eine allgemeine Stabilität in einer Vielzahl von Reaktionsbedingungen, eine einfache Entfernung der notwendigen Abspaltungsreagenzien, Automatisierbarkeit der Spaltungsreaktionen und Orthogonalität in der Stabilität zu anderen Schutzgruppen. Vor allem wegen ihrer relativ milden Spaltungsbedingungen im schwach Sauren wurden der Wang- (p-Alkoxybenzyl Alkohol) und der Rink- (Trialkoxy-diphenyl-methylester) Linker verwendet (Abb. 1. 1). Sehr säurelabile Schutzgruppen (wie z.B. Trityl-Gruppen) können entfernt werden, ohne daß eine Spaltung des Linkers stattfindet (26, 27).

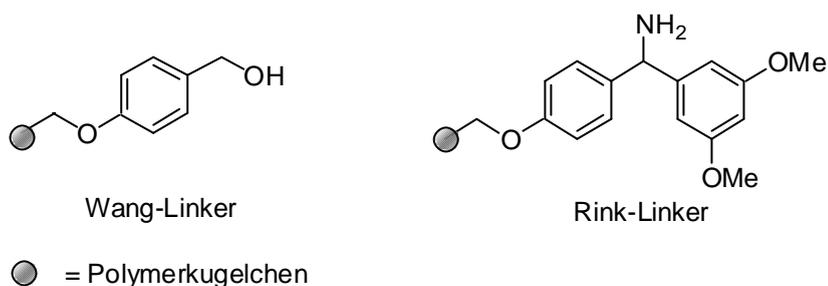


Abb. 1.1 Strukturformeln der säurelabilen Linker von Wang- und vom Rink- Typ

Ein möglicher Mechanismus für die Abspaltung von beiden Linkern ist in Abb. 1.2 dargestellt. Ein Überschuss an TFA Säure und nucleophile, die das generierte Kation deaktivieren (wie z. B. Wasser oder Silane) werden häufig für eine vollständige Spaltung verwendet.

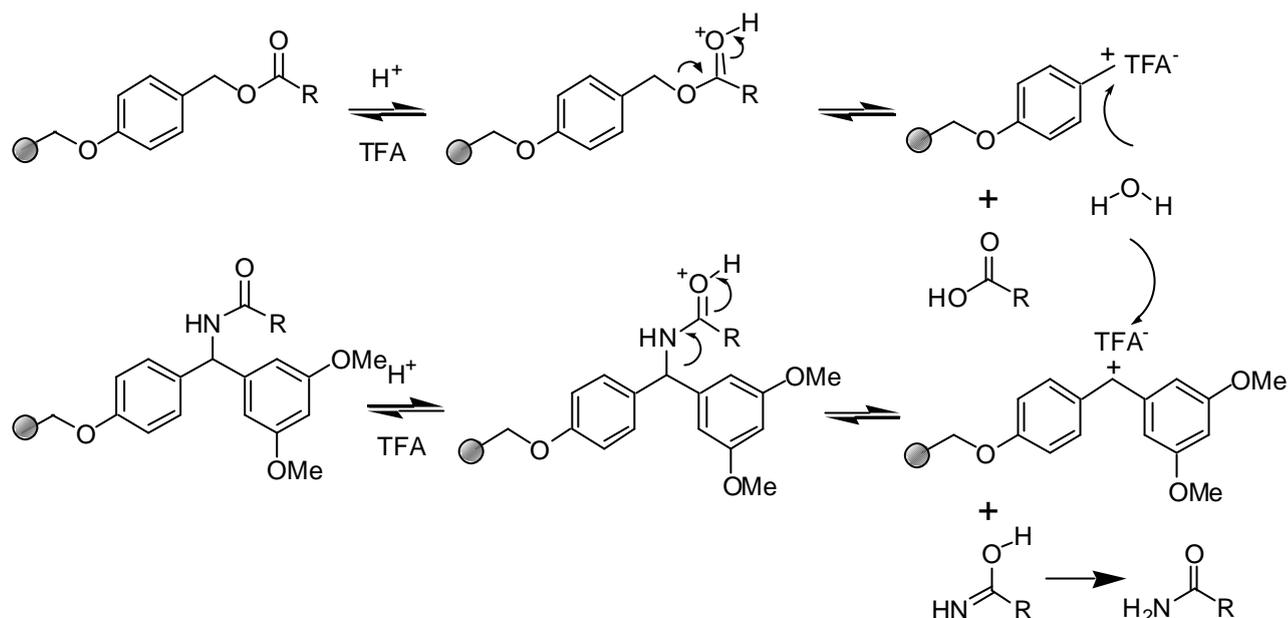


Abbildung 1.2 Vorgeschlagenen Mechanismus für die Säure-katalysierte Spaltung von Acyl-Verbindungen an Wang- und Rink-Linkern

1.3 Praktische Aspekte der Analytik in der Festenphasenchemie

Eine besondere Problematik der Synthese am polymeren Träger ist die Schwierigkeit der Überwachung von Reaktionen. Traditionelle Methoden der Synthese in der flüssigen Phase, wie die Dünnschichtchromatographie oder die NMR-Spektroskopie, können zur Verfolgung von Reaktionen an der festen Phase ohne besondere Optimierung nicht eingesetzt werden². Deswegen wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Analysemethoden für trägergebundene Moleküle entwickelt (28). Besonders erwähnenswert sind Farbreaktionen mit funktionellen Gruppen sowie Gelphasen NMR- sowie die Infrarot-Spektroskopie (29). Sie geben gute qualitative Hinweise über den Verlauf einer Reaktion und die Bildung eines Zwischenproduktes. Eine vollständige Charakterisierung des Endproduktes erfolgt aber normalerweise nach Abspaltung vom Harz und nachfolgender Analyse mit herkömmlichen Verfahren in Lösung.

Ein essentieller Aspekt der Parallelsynthese ist die Generierung von einer großen Anzahl an Proben bereits bei der Optimierung und Validierung von Reaktionswegen. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen spielt eine sehr wichtige Rolle, da ein erfolgreiches

² Eine Ausnahme ist die Anwendung eines löslichen Polymers an dem traditionelle Analysemethoden für die Lösungschemie wie DC und NMR verwendet werden können (32)

Ergebnis bei allen verschiedenen Ansätze nur bei Reaktionen mit sehr hoher Ausbeuten und Reinheit gelingt (29). Die Suche nach den besten Reaktionsbedingungen erfolgt häufig auch durch die Parallelisierung verschiedener Ansätze (30). Darüber hinaus müssen manche Syntheseschritte auf die Variation mit verschiedenen Reagenzien (z. B. Alkylierungs- und Acylierungsmittel) validiert werden. Deswegen stellen Automatisierbarkeit und hoher Probendurchsatz bei der Aufnahme und Auswertung analytischer Daten einen wichtigen Aspekt bei der Parallelsynthese dar. Die begrenzte Menge an Substanz, die zur Verfügung steht, ist ein kritischer Punkt für die Optimierung von Reaktionsbedingungen und für die Synthese von Naturstoffderivaten. Daher ist es sinnvoll, Analysemethoden auszuwählen, die nur geringe Substanzmengen benötigen und so auch den Verbrauch an Substanz reduzieren können.

Zwei Analyseverfahren, die den oben genannten Anforderungen Genüge leisten und die im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden, sind MALDI-TOF-MS (Matrix-Assisted-Laser-Desorption Time-Of-Flight Mass-Spectrometry) und HPLC-UV-API-ES-MS (High-Performance-Liquid-Chromatographie-Ultra-Violet-Atmospheric-Pressure-Ionisation-Electro-Spray-Mass-Spectrometry) oder HPLC-MS. MALDI-TOF-MS bietet die Möglichkeit, Massenspektren von Mischungen mit einem sehr geringen Aufwand bei der Probenvorbereitung aufzunehmen (40). Es ist lediglich notwendig eine Mischung der zu analysierenden Probe und eine Matrix auf die Sonde aufzubringen. Die mit diesem Verfahren ionisierten Substanzen zeigen normalerweise keine Fragmentierung, was die Auswertung der Massenpeaks vereinfacht (29). Eine einzige Polymerkugel ergibt genügend Material (einige pmol) für eine Analyse (37). Die Anwendung von MALDI-TOF-MS bei der Qualitätskontrolle von Reaktionsprodukten ist jedoch wegen der unterschiedlichen Ionisierungseigenschaften der verschiedenen Komponenten in der Mischung limitiert. Bei sehr gut ionisierbaren Substanzen verursachen diese Unterschiede die Maskierung von zusätzlichen Molekülen im Reaktionsgemisch. Dieser Effekt macht eine Aussage über das Mengenverhältnis der verschiedenen Komponenten in der Mischung unmöglich (40). Diese Technik ist deshalb nur ein qualitativer Beweis der Anwesenheit einer Substanz.

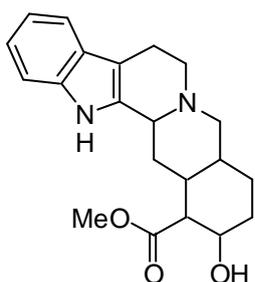
HPLC-UV-API-ES-MS wird häufig zur Optimierung von Reaktionsbedingungen und zur Qualitätskontrolle verwendet. Die Trennung der Substanzen verläuft unter sehr milden Bedingungen im Vergleich mit Techniken wie der Gas- Chromatographie. Dieses Verfahren erlaubt auch eine semiquantitative Aussage der Reaktionsausbeuten durch Integration der

UV-Signale. Die geringe Fragmentierung der Moleküle bei der API-ES-MS Spektroskopie führt wie bei der MALDI-TOF-MS zu übersichtlichen Massenspektren (29, 33, 34, 41, 42). HPLC Geräte sind inzwischen standardmäßig mit einem Auto-Sampler ausgerüstet, was eine Automatisierung des Verfahrens und damit einen größeren Probendurchsatz erlaubt (47). Außerdem können die Messparameter auf eine präparative HPLC-Anlage übertragen werden, was eine eventuelle weitere Aufreinigung der Produkte vereinfacht (43). Diese Methoden stellen aber weitere Anforderungen an die physikalisch- chemischen Eigenschaften der Substanzen. Um eine gute Detektion zu gewährleisten werden deswegen in manchen Fällen im Verlauf der Synthese analytisch aktive Gruppen (wie z.B. langwellig absorbierende Chromophore für eine UV Detektion, oder leicht ionisierbare Amine für massenspektrometrische Untersuchungen), zur Markierung der Syntheseprodukte eingesetzt (36-38, 40, 44-46). Durch diese Markierung wird die Auswertung der Ergebnisse vereinfacht. In dieser Arbeit werden diese analytisch aktiven Gruppen, die für einen analytischen Zweck eingefügt sind, als chemische Marker bezeichnet.

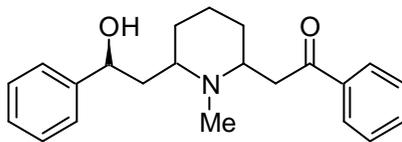
1.4 Anforderungen an Naturstoffe für die Parallelsynthese

Ein geeigneter Naturstoff für die Parallelsynthese soll bestimmte Bedingungen erfüllen, wie sie z.B. von Atuegbu et al. aufgestellt wurden (39). Eine ausreichende Menge an Ausgangssubstanz (in Gramm-Mengen) ist die wichtigste Voraussetzung für die Methodenentwicklung an der festen Phase und die Herstellung einer großen Anzahl von Derivaten (Substanzbibliotheken). Daher ist ein wichtiger Punkt eine schnelle und einfache Isolierung des Naturstoffes aus der natürlichen Quelle. Ein Naturstoff muss zudem mehrere funktionelle Gruppen enthalten, die sich deutlich in ihrer Reaktivität unterscheiden. Dies erlaubt dann eine selektive Modifizierung des Naturstoffs an verschiedenen Reaktivitätszentren. Eines von diesem Zentren soll zur Verknüpfung mit der festen Phase dienen. Labile strukturelle Gruppen sind im Naturstoff möglichst zu vermeiden, da das Molekül bei verschiedenen Verknüpfungs- und Spaltungs-Bedingungen stabil bleiben sollte. Es erfüllen z.B. die Rauwolfia Alkaloide alle diese Anforderungen. Die Rauwolfia-Alkaloide sind in großer Menge kommerziell erhältlich. Die Hydrolyse des Methylesters in Yohimbin verschafft eine Bindungsstelle zur Anknüpfung an die Festphase. Außerdem konnten andere funktionelle Gruppen im Naturstoffgerüst (z. B. Hydroxygruppen) kombinatorisch derivatisiert werden.

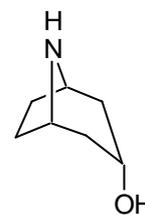
Für die Durchführung dieser Arbeit stand eine Sammlung von Naturstoffen vom Hans-Knöll-Institut Jena und Boehringer Ingelheim in ausreichender Menge zur Verfügung. Die Naturstoffe wurden nach den oben aufgeführten Kriterien ausgewählt. Naturstoffe wie (Lobelin, Yohimbin und Nortropin) erschienen für diese Arbeit besonders geeignet. Sie besitzen ein nichtlabiles Grundgerüst. Darüber hinaus enthalten sie funktionelle Gruppen, die sich deutlich in ihrer Reaktivität unterscheiden (Ester-, Amino-, Keto- und Hydroxygruppen) (Abb.1.2).



Yohimbin



Lobelin



Nortropin

Abb. 1.2 Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Naturstoffe

2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war die Anwendung von Technologien der Parallelsynthese an der Festphase zur Erzeugung einer großen Anzahl von Naturstoffderivaten durch chemische Derivatisierungen von Sekundärmetaboliten. Diese Substanzen sollten zum Auffinden neuer Leitstrukturen für die Wirkstoffentwicklung und zum Herausarbeiten neuer Wirkmechanismen beitragen. Eine allgemeingültige Übertragung der erarbeiteten Syntheseprinzipien auf verschiedene Naturstoffe sollte im Vordergrund stehen. Wegen seiner häufig kostenaufwändigen Isolierung sollte der Verbrauch an Naturstoff bei der Parallelsynthese und Optimierung der Reaktionsbedingungen minimal sein. Daher sollten für die Detektion der synthetisierten Substanzen Analysemethoden angewandt werden, die nur geringe Substanzmengen benötigen und einen großen Probendurchsatz gewährleisten. Dazu sollte in dieser Arbeit HPLC-MS-Analyse eingesetzt werden, die eine Aussage zur Ausbeutebestimmung und Hinweise zur Identifizierung aller Syntheseprodukte mit einem geringen Probeaufwand gewährleisten und mittels eines Auto-Samplers automatisiert werden kann. Substanzen, die den oben genannten analytischen Methoden genügen, benötigen Strukturelemente deren physikalisch-chemische Eigenschaften eine Detektion erlauben. Diese Strukturelemente sollten in Form eines chemischen Markers als Hilfsmittel zur Detektion aller an der Festphase synthetisierten Substanzen eingeführt werden.

Einbau eines chemischen Markers

Durch diesen Marker sollte die Kopplung an die feste Phase erfolgen und auch nach Abspaltung der Reaktionsprodukte von Harz als Hilfsmittel zur Detektion dienen. Die Abspaltungsreaktion, die häufig eine funktionelle Gruppe im Molekül hinterlässt, sollte als erstes Markierungselement ausgenutzt werden. Es wurde zunächst N-Fmoc geschütztes Glycin angewandt, das durch Linkersysteme an die Festphase gekoppelt werden sollte, die nach Abspaltung des Harzes Carboxy-, Amid- und Amino- Gruppen hinterlassen. Der Vergleich der Ionisierungseigenschaften der so erhaltenen Substanzen sollte die Auswahl einer optimalen Abspaltungsreaktion ermöglichen. Nach dieser Optimierung sollte die Substitution von N-Fmoc-Glycin durch N-Fmoc-4-Nitro-phenylalanin im Syntheseweg eine sehr gute UV-Detektion gewährleisten.

Immobilisierung von Naturstoffen an chemischen Markern

Anschließend sollten Untersuchungen zur Kopplung von Naturstoffen an den chemischen Markern erfolgen. Die Abspaltung der N-Fmoc-Gruppe liefert eine freie Amino-Gruppe, die zur direkten Immobilisierung von Carbonsäuren verwendet werden kann. Naturstoffe besitzen darüber hinaus in der Regel verschiedene reaktive funktionelle Gruppen, die zur Bindungsknüpfung herangezogen werden können. Im Rahmen dieser Arbeit sollten außer der Kopplung von Carbonsäuren auch Methoden zur Immobilisierung von Alkoholen und polyfunktionellen Naturstoffen untersucht werden. In diesen Fällen sollte ein zweiter Linker eingeführt werden. 21-Hydroxyprogesteronhemisuccinat und 17 β -Estradiolhemisuccinat sollten als Beispiele für Carbonsäuren durch Amid-Bindung immobilisiert werden. Eine Derivatisierung des chemischen Markers mit Bernsteinsäure sollte eine Carbonsäurefunktion für die Immobilisierung von Yohimbin und Lobelin mittels Veresterung liefern. Die Kopplung von einer Alkylhalogen-carbonsäure sollte die selektive Immobilisierung von Nortropin an seiner Amino-Gruppe mittels nukleophiler Substitution ermöglichen. Alle Reaktionen sollten nach Abspaltung von Harz mittels HPLC-MS verfolgt werden. Die Isolierung und Identifizierung durch NMR-Spektroskopische Analyse der Produkte sollten die Ergebnisse der HPLC-MS-Analyse über Reinheit und Struktur validieren.

Parallele Synthese von Nortropinderivaten

Nach Untersuchung der Immobilisierung von Naturstoffen sollten Methoden zur parallelen Erzeugung von Naturstoffderivaten an der Festphase beschrieben werden. Nortropin wurde für diese Untersuchungen wegen seiner einfachen Struktur und wegen der unterschiedlichen Reaktivität seiner Amino- und Hydroxy-Gruppen ausgewählt. Als erste Strategie sollte die Übertragung des obengenannten Systems auf die parallele Synthese mit Variierung des zweiten Linkers zur Darstellung verschiedener Nortropinderivate untersucht werden. Dafür sollte die Einsatzbreite der halogenierten Carbonsäuren, die in der Immobilisierungsreaktion von Nortropin mitwirken, getestet werden. Darüber hinaus sollten Methoden für die selektive Derivatisierung eines Festphasen-gebundenen Naturstoffes untersucht werden. Eine Möglichkeit sollte die Acylierung der Hydroxy-Gruppe von Nortropin sein, wofür die Einsatzbreite der Acylierungsreagenzien zu überprüfen war.

Synthesewege zur Herstellung von Substanzbibliotheken mit Nortropin als Gerüstbaustein

Die gewonnenen Ergebnisse für die parallele Synthese von Naturstoffderivaten sollten zur Herstellung von neuartigen Substanzen genutzt werden, die die strukturellen Eigenschaften des Naturstoffes ausnutzen. Um den Zugang zu einer möglichst großen Anzahl an Substanzen über diesem Syntheseweg zu erzielen, sollte der Naturstoff in einem Gerüst platziert werden, das in mehreren Positionen derivatisiert werden kann. Die strukturellen Eigenschaften des Naturstoffes sollten darüber hinaus die Steuerung von regioselektiven Reaktionen ermöglichen. Auch in diesem Fall bietet sich die einfache bitykliche Struktur des Nortropins als besonders geeignet an. Nach Oxidation der Hydroxy-Gruppe von Nortropin sollten Methoden für die regioselektive reduktive Aminierung untersucht werden. Eine reduktive Aminierung mit primären Aminen sollte eine weitere chemische Variabilität des Systems mittels der nachfolgenden Acylierung der resultierenden Amine bieten.

Naturstoffhybride und Makrozyklen

Letztendlich sollten alle gewonnenen Erkenntnisse zur parallelen Festphasensynthese von Naturstoffderivaten auf die Generierung von Naturstoffhybriden und Makrozyklen übertragen werden. Dafür sollte nach dem chemischen Marker eine Verzweigungsstelle mit mindestens zwei orthogonal geschützten reaktive Funktionalitäten eingeführt werden. Die sequentielle Kopplung zweier verschiedener Naturstoffe an diese reaktiven Gruppen sollte zur Bildung eines Naturstoffhybrides führen. Darüber hinaus sollte die Verzweigungsstelle die Bildung eines Substrates für eine intramolekulare Makrozyklisierung an der Festphase ermöglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Einbau eines chemischen Markers

Die Anwendung von chemischen Markern vereinfacht die Entwicklung von chemischen Verfahren an der festen Phase (28, 32, 36, 44, 45) wesentlich. Durch die Einführung von analytisch nutzbaren Gruppen lassen sich physikalisch-chemische Eigenschaften der synthetisierten Substanzen an die analytischen Verfahren anpassen (32, 46). Eine gute Detektion der End- und Zwischenprodukte von Syntheseabläufen, wodurch eine schnelle Optimierung der Reaktionsbedingungen und Qualitätskontrolle von Substanzbibliotheken ermöglicht wird, kann damit gewährleistet werden.

Die erste Aufgabenstellung dieser Arbeit war die Konzipierung einer Methode zur Anpassung der physiko-chemischen Eigenschaften der synthetisierten Naturstoffderivate zu Analysemethoden wie HPLC-MS-Analyse und MALDI-Massenspektrometrie. Dafür wurde ein chemischer Marker konzipiert und eingefügt, der unabhängig von anderen funktionellen Gruppen im Naturstoffderivat spezifisch detektiert werden kann.

Für eine Analyse mittels HPLC-UV-APCI-MS und MALDI-TOF-MS sollte der Marker folgende physiko-chemischen Eigenschaften besitzen: Für massenspektrometrische Untersuchungen ist die Ionisierbarkeit eine wichtige Voraussetzung. Dafür war es nötig eine funktionelle Einheit, an der sich eine Ladung einfach bilden kann (46), einzufügen. Für die Detektion mittels eines UV-Detektors nach HPLC Trennung ist eine chromophore Gruppe vorteilhaft. Damit sollte das Molekül Licht in einem bestimmten Wellenlängenbereich absorbieren, in dem das Lösungsmittel keine, oder nur eine geringe Absorption aufweist (47).

Die am Harz synthetisierten Naturstoffderivate waren mit einem analytisch aktiven Molekül (chemischer Marker) am Harz zu verknüpfen. Dieser Markerbaustein sollte darüber hinaus während der Derivatisierung des Naturstoffes und Abspaltung des Naturstoffderivates chemisch möglichst inaktiv bleiben. Im Bild 3.1.1 wird die verwendete Strategie für die Markierung von Syntheseprodukten veranschaulicht.

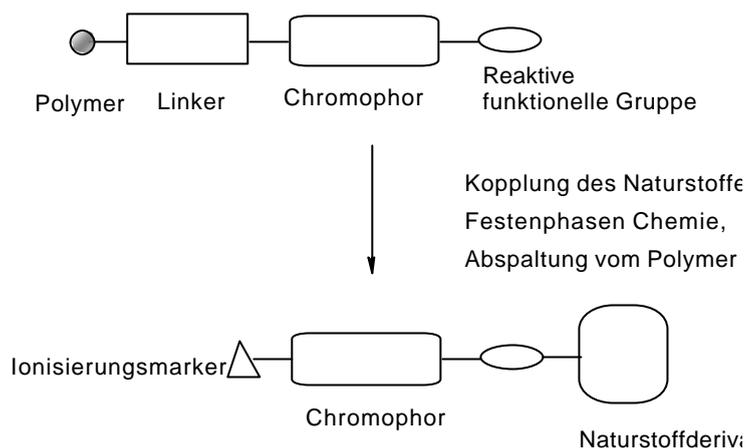


Bild 3.1.1 Markierung der Syntheseprodukte mittels eines chemischen Markers

Alle am Harz synthetisierten Substanzen sollten optimale UV Absorptions-Eigenschaften besitzen. Dafür sollte ein Chromophor zwischen Linker und Naturstoff eingefügt werden. Dadurch würden alle am Harz gebundenen Substanzen nach ihrer Abspaltung diesen Chromophor weiterhin besitzen. Mittels dieser Strategie ist natürlich auch eine einfache Detektierung alle am Harz entstandene Nebenprodukte möglich.

Das Chromophor sollte möglichst ein bifunktionelles Molekül sein. Nach der Verknüpfung mit dem Linker würde dann eine weitere Funktionalität frei bleiben, die für die Kopplung eines Naturstoffes zu Verfügung steht. Eine ähnliche Methode zur Markierung von Syntheseprodukten wird bei der Festphasensynthese von β -Turn Mimetics verwendet (36). In der genannten Arbeit wird eine Derivatisierung des Rink-Linkers mit p-Nitrophenylalanin vor der Synthese des gewünschten Moleküls durchgeführt. Nitro-substituierte Benzole zeigen eine starke Absorption im langwelligen Bereich ($\lambda = 250-300 \text{ nm.}$), was die Detektion der Substanzen und eine qualitative Ausbeutebestimmung mittels HPLC-UV-Analyse ermöglicht (36, 46).

In dieser Arbeit wurde p-Nitrophenylalanin als UV-aktiver Bestandteil des chemischen Markers eingesetzt. Die Chemie der Aminosäure sowie die selektive Kopplung an die feste Phase über die Carboxygruppe des Linkers und die selektive Schützung bzw. Entschützung der Aminogruppe sind gut bekannt und werden routinemässig in der Peptid-Chemie angewendet (45). Eine dieser Schutz-Gruppen, die 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc-) Gruppe, bietet den weiteren Vorteil der einfachen Quantifizierung ihrer Abspaltungsprodukte (105). Deswegen wurde diese Gruppe aus den möglichen Amino-Schutzgruppen, die mit Wang- und Rink-Linker kompatibel sind, ausgewählt.

Ein weiterer Vorteil der in dieser Arbeit eingesetzten chemischen Marker sollte eine Vereinfachung der massenspektrometrischen Analyse sein. Diese Molekülbaustein sollte eine funktionelle Gruppe sein, in dem sich eine Ladung während der APCI- und MALDI-Ionisierungsverfahren gut ausbilden kann. Die Generierung dieser Gruppe direkt bei der Abspaltungsreaktion des Produktes erschien als eine günstige Strategie. Auf diese Weise stand zu erwarten, daß die Ionisierungsgruppe während der Kopplung und Derivatisierung des Naturstoffes chemisch inaktiv bleibt (siehe ähnliche Strategien in 36, 46).

Mit den ausgewählten Wang- und Rink-Linkern ist die Generierung von verschiedenen funktionellen Gruppen nach Abspaltung bereits beschrieben (26, 27, 37). Ein erster Schritt war somit der Vergleich von Ionisierungseigenschaften möglicher Funktionalitäten.

Um die analytischen und physiko-chemischen Eigenschaften möglicher Säure und Amid- Gruppen zu vergleichen, wurde die Aminosäure Glycin (Gly-OH) Fmoc-geschützt und an zwei verschiedene Linkersysteme, Wang- und Rink-Linker, gekoppelt. 1,3-Diaminopropan wurde am Wang-Linker in einer Carbamat Bindung mittels Carbonyldiimidazol gekoppelt. Die Aminosäure wurde dann durch die andere freie Amino Gruppe des 1,3- Diaminopropan am Wang- Linker immobilisiert. Somit wurde die Herstellung nach Abspaltung einer Amino- Funktion erzielt (s. Bild 3.1.2).

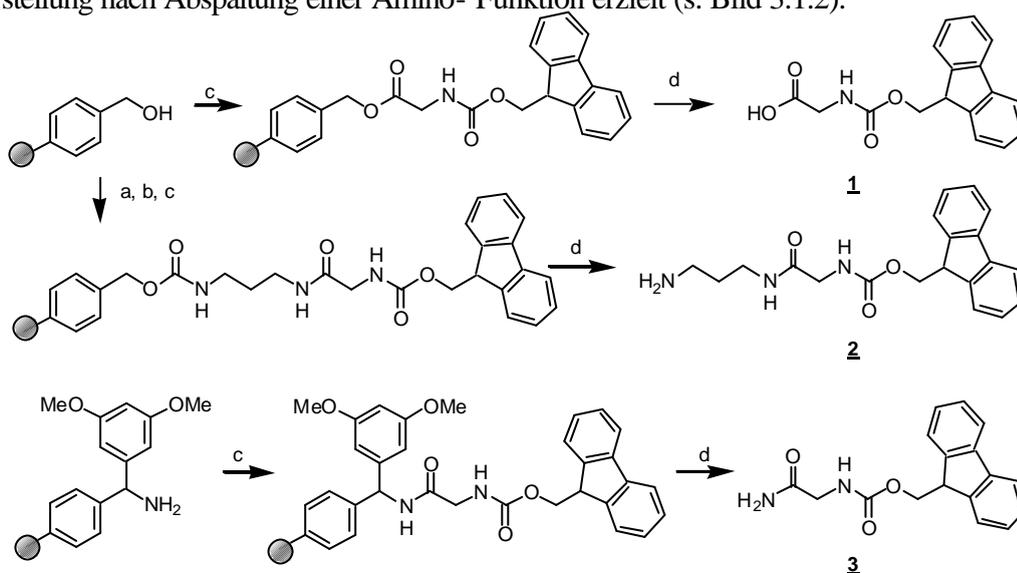


Bild 3.1.2 Gewinnung drei verschiedener funktioneller Gruppen nach Kopplung und Abspaltung von Fmoc-Gly an einem polymeren Träger.

a) Carbonyldiimidazol; THF; 6h. b) 1,3-Diaminopropan, THF, 6h. c) Fmoc-Gly-OH, HOBT, DMAP, DIC, DMF 16h. d) DCM/TFA 1:1 30 min

Die Synthesen wurden jeweils mit 500 mg Harz (0.57 mMol für Wang-Linker und 0.29 mMol für Rink-Linker) durchgeführt. Nach Abspaltung der Reaktionsprodukte vom Trägermaterial wurden die Rohprodukte durch HPLC-UV-MS und MALDI-TOF-MS analysiert. Eine zusätzliche Aufreinigung über die präparative HPLC führte zum Strukturbeweis jedes Syntheseproduktes durch Auswertung von ^1H - und ^{13}C - NMR Spektren. Die berechneten Ausbeuten beziehen sich auf die vom Anbieter angegebene maximale Beladung (s. 1.2.1) jeweiligen Harze.

Substanz	Rohprodukt mg.	Isolierte Produkt mg.	Ausbeute %	Reinheit %	HPLC Reinheit 210/270 nm %	$[\text{M}^+]$, $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet m/z	$[\text{M}^+]$, $[\text{M}+\text{H}]^+$ API-ES m/z	$[\text{M}^+]$, $[\text{M}+\text{H}]^+$ MALDI m/z
<u>1</u>	146	64	37	44	87/ 97	297.3	297.5	299.6
<u>2</u>	297	174	84	59	92/95	354.4	354.0	355.7
<u>3</u>	109	51	65	47	70/85	296.3	296.3	298.6

Tabelle 3.1.1 Reinheit, Ausbeute, HPLC-MS und MALDI-MS Analyse der Substanzen 1, 2, 3

Alle Syntheseprodukte wurden in mäßigen bis guten Ausbeute gewonnen (37-84%). Trotz der hohen Reinheit (HPLC Analyse) waren alle Produkte mit nicht UV absorbierenden Substanzen verunreinigt. Es wurde postuliert, dass diese Verunreinigungen aus der Zerstörung bzw. Abrieb des Polymeres während des Reaktionsverlaufes stammen. Die Natur dieser Verunreinigungen wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Nach Identifizierung jedes Syntheseprodukts mittels ^1H - und ^{13}C - NMR wurden das API-ES-MS Spektrum jedes Hauptpeaks bei der HPLC-MS Analyse (Bild 3.1.3, 3.1.4 u. 3.1.5) sowie das MALDI-TOF-MS Spektrum der Rohprodukte (Bild 3.1.6 u. 3.1.7) untersucht.

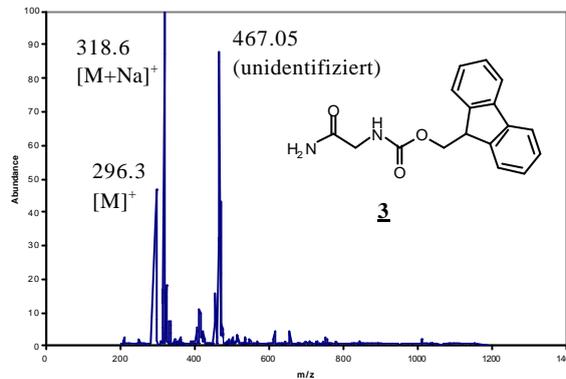
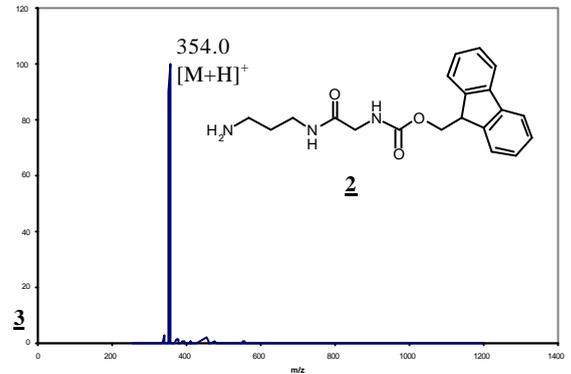
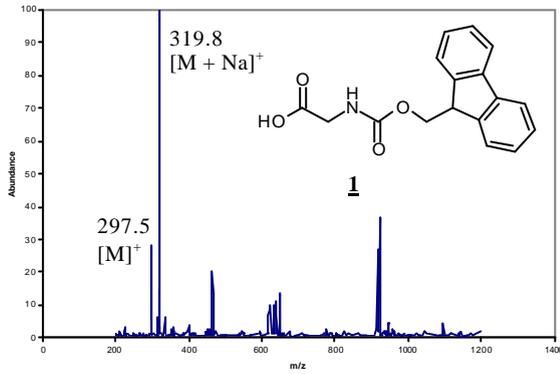


Bild 3.1.3 Massenspektrum (APCI) der Substanzen **1**, **2** und **3**

Die Untersuchung der APCI- Spektren ergab gute Hinweise zur Identifizierung aller drei Substanzen. Ein Molekularion für jede Substanz ist in allen Spektren deutlich erkennbar. Die Massenspektren der Substanzen **1** und **3** zeigen große Signale, die sich auf die Formation von Natriumaddukte beziehen. Bemerkenswerterweise ist nur das Molpeak der Substanz **2** in seinem API-ES-MS Spektrum detektiert. Die guten Ionisierungseigenschaften der Aminogruppe in **2** verhindert möglicherweise die Formation von Natriumaddukten und die Intensität der Ionisierung verdeckt Signale vom Grundgerüst.

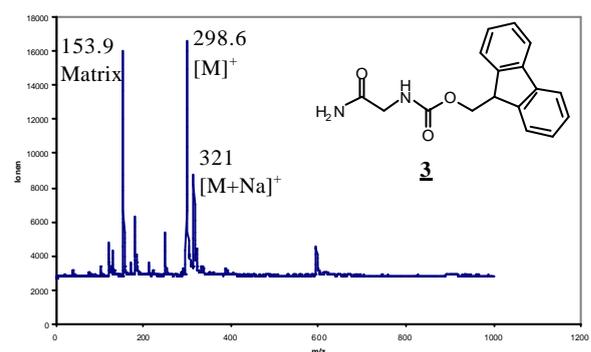
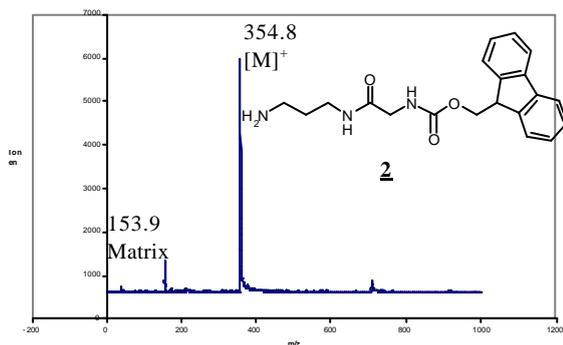
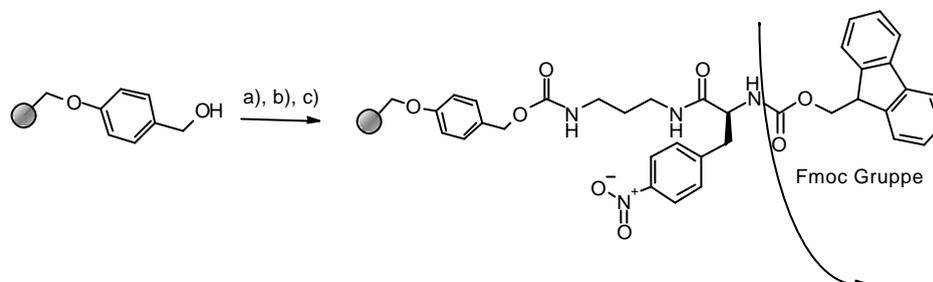


Bild 3.1.4 MALDI-TOF-Massenspektrum der Substanzen **2** und **3**

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der APCI-MS Analyse ist nur das Molpeaks von **2** in seinem Massenspektrum erkennbar. Im Fall von **3** sind Signale vom Natriumaddukt und Grundgerüst zu sehen. Es war unmöglich ein deutliches Signal im MALDI-TOF Spektrum der Substanz **1** zu gewinnen.

Die einfache Auswertung der API-ES- und MALDI-TOF-Massenspektren der Substanz **2** war bemerkenswert. Seine günstigen Ionisierungseigenschaften führten deswegen zu seiner Auswahl als Modell für die Synthese eines chemischen Markers. Die Aminosäure N-Fmoc-p-Nitrophenylalanin wurde als ausgewählten chromophor (s. oben und Teil 2) im gleichen Reaktionssequenz wie bei der Synthese von **2** substituiert (3.1.8).



a) Carbonyldiimidazol; THF; 6h. b) 1,3- Diaminopropan, THF, 6h. c) N-Fmoc-p-Nitrophenylalanin, HOBT, DMAP, DIC, DMF 16h.

Bild 3.1.5 Einbau eines chemischen Markers. Einfügung von Fmoc-p(NO₂)-phenylalanine als Chromophor.

Die Fmoc- Gruppe kann unter basische Bedingungen (20% Piperidin in DMF) abgespalten werden (47). Auf dieser Weise wird eine Aminogruppe generiert, die für die Kopplung von einem Naturstoff verwendet werden kann.

Der experimentelle Vergleich der analytischen Eigenschaften verschiedener funktioneller Gruppen führte zum Einbau eines chemischen Markers. Seine Anwendung sollte eine schnelle Identifizierung der Syntheseprodukte durch die Analyse der APCI- und MALDI- Massenspektren der Rohprodukte ermöglichen. Die Synthese von Substanz **2** zeigte, daß ein wesentlicher Anteil von nicht UV- absorbierende Verunreinigungen bei Abspaltung der Festphase generiert werden.

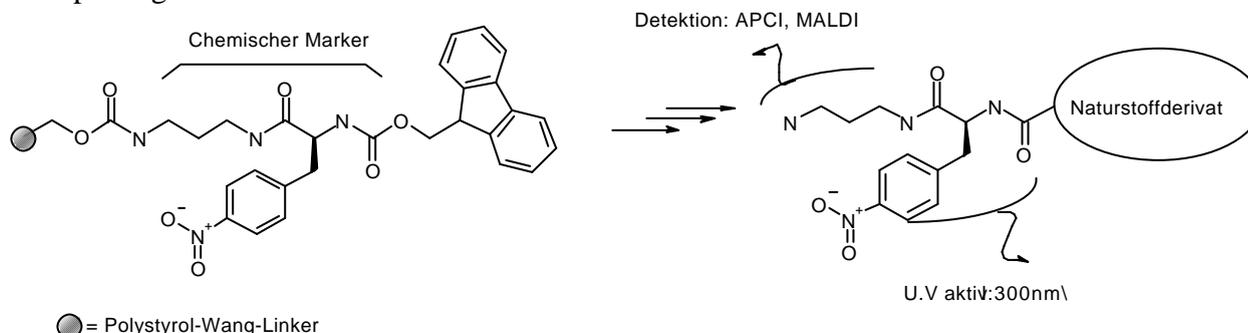


Bild 3.1.6 Einbau eines chemisches Markers. Markierung eines Naturstoffderivates

3.2 Immobilisierung von Naturstoffen an chemischen Markern

3.2.1 Einleitung

In Rahmen dieser Arbeit sollte die Immobilisierung der Naturstoffe an die feste Phase mittels eines chemischen Markers stattfinden. Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe des p-Nitrophenylalanin setzt eine Aminofunktion frei, die als reaktive Stelle für die Verknüpfung mit einem Naturstoff dienen kann. Je nachdem welche chemischen Funktionalitäten die Struktur des Naturstoffes besitzt, sollte die Kopplung direkt oder erst nach einer Derivatisierung einer von beiden Komponenten durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde die Derivatisierung des chemischen Markers bevorzugt, da in diesem Fall die Vorteile der Festphasensynthese nutzbar wird (s. 1.2 u. 2.).

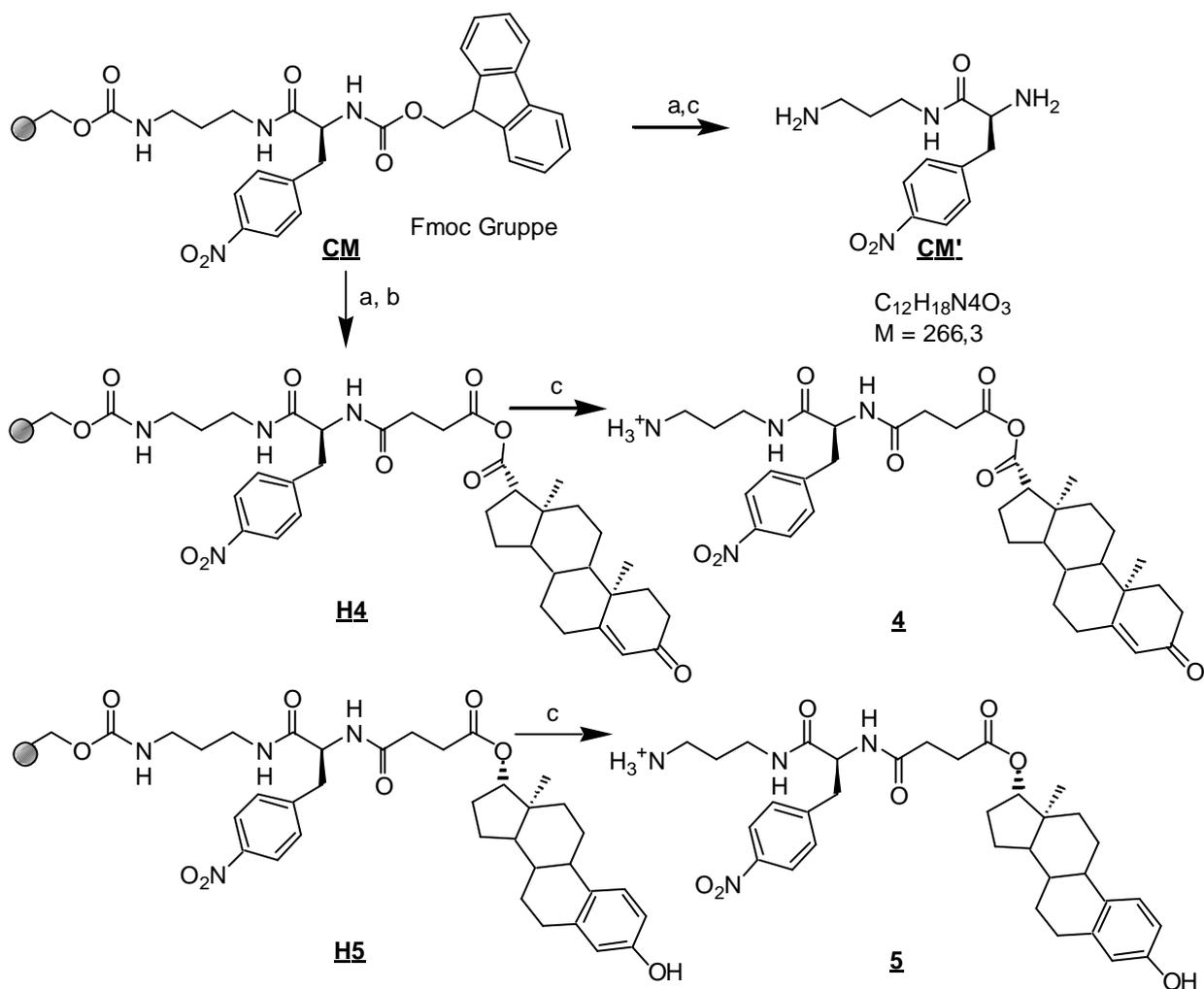
Mehrere Beispiele für die Immobilisierung von Naturstoffen an verschiedenen am Harz gebundenen funktionellen Gruppen sind in der Literatur beschrieben (38, 48, 49). Aufgabenstellung dieses Teils war deshalb eine Untersuchung über die Anwendung des eingebauten chemischen Markers zur Verfolgung der Immobilisierung verschiedener Naturstoffe an der Festphase durch die freie Aminofunktion des Markers.

3.2.2 Direkte Kopplung von Naturstoffen und Naturstoffderivate an chemischen Markern

Die Immobilisierung von Naturstoffen mit einer Carbonsäurefunktion an gebundene Aminofunktionen wurde bei der parallelen Synthese von Rauwolfia Alkaloiden (39) sowie bei der Verknüpfung von Doxorubicin und 2-Pyrrolinodoxorubicin an einer Peptidkette in der Literatur beschrieben (51). In beiden Beispielen fand die Kopplung durch die Aktivierung der Carbonsäure des Naturstoffes und die folgende Bildung einer Amidbindung mit einer harzgebundenen Aminofunktion statt (49, 51).

In Rahmen dieser Arbeit wurde mit dieser Methode die Immobilisierung der kommerziell erhältlichen Verbindungen 21-Hydroxyprogesteronhemisuccinat und 17- β Estradiolhemisuccinat durchgeführt. Die Synthesen wurden in einem ersten Versuch in einem kleinem Maßstab durchgeführt (10mg Harz \sim 0.01 mMol). Der Verbrauch an Naturstoff wurde damit möglichst klein gehalten.

Die Kopplung des Naturstoffes an der Aminofunktion des Markers sollte mittels eines colorimetrischen Tests für die Anwesenheit von Aminen und mittels der HPLC-MS Analyse der harzgebundenen Ausgangsmaterialien und Rohprodukte verfolgt werden. Folgendes Bild stellt die Reaktionsgleichungen dar.



H(Nummer) = Festphasen-gebundenes Precursor von Substanz **(Nummer)**

Bild 3.2.1 Immobilisierung vom käuflich erwerbare Naturstoffderivate an der Festenphase und Abspaltungsprodukte.

a) 20% Piperidin in DMF b) HOBt, DIC, 4-DMAP, (21-Hydroxyprogesteron- hemisuccinat oder Estradiol-17 β -hemisuccinat) c) 1:1 TFA in DCM

Nach Abspaltung der Fmoc Gruppe von **CM** (s. Bild 3.2.1) wurde ein kleiner Teil des Harzes mit Trifluoroessigsäure behandelt und die resultierende Lösung mittels HPLC-MS untersucht. Die Analyse zeigte einen sauberen Peak um $t_R = 7.2$ und Masse $[M^+] = 266$. Dieser Peak wurde zum Produkt **CM'** zugeordnet (s. Bild 3.2.1).

Nach der Reaktion wurden die Harze **H4** und **H5** gewaschen und die Abwesenheit von primären Aminen am Polymer mit dem Chloranil Test (87) nachgewiesen. Damit wurde die Vollständigkeit der Konversion des Ausgangsproduktes **CM** bewiesen. In guter Übereinstimmung zeigte die HPLC-MS-Analyse der Rohprodukte nach Abspaltung die Abwesenheit des Peaks des Ausgangsmaterials **CM** (s. Tabelle 3.2.1).

Substanz	HPLC UV Reinheit		HPLC UV Konversion		[M] ⁺ _{ber}	[M] ⁺ _{APCI}
	270nm	210nm	270nm	220nm		
21-Hydroxyprogesteronhemisuccinat 4	78	64	100	100	678,8	677,8
Estradiol-17β- hemisuccinat 5	50	53	100	100	620,8	619,0

Tabelle 3.2.1 HPLC-MS Analyse der Produkte der Amid-Bindung von zwei Naturstoffderivaten am chemischen Marker

Der endgültige Nachweis der Identität der Produkte konnte über NMR-spektroskopische Methoden geführt werden. Hierzu war die Wiederholung der Ansätze in größeren Maßstab notwendig. Die Ausbeute dieser Reaktionen nach chromatographischer Aufarbeitung betragen:

Substanz	Ausbeute %
21-Hydroxyprogesteronhemisuccinat 4	62
Estradiol-17β- hemisuccinat 5	14

Tabelle 3.2.2 Isolierte Ausbeuten nach maßstabvergrößerung der Synthesen von Substanzen **4 und **5****

Die guten Konversionen des Ausgangsmaterials **CM** in beiden Synthesen waren von ungenügender Reinheit begleitet. Möglicherweise waren die Esterbindungen in beiden Substanzen unter den sauren Abspaltungs- und Chromatographie- Bedingungen nicht stabil.

3.2.3 Umfunktionalisierung des chemischen Markers mit Bernsteinsäureanhydride zur Immobilisierung von Lobelin und Yohimbin

Für die Immobilisierung von Naturstoffen ohne Carboxyfunktion sollte eine vorherige Derivatisierung der Amino-Funktion des chemischen Markers durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kopplung von Naturstoffen, die nur eine Hydroxy- oder eine Amino- Funktion besitzen, durchgeführt.

Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe wurde durch die Acylierung mit Bernsteinsäureanhydrid die terminale Funktion des chemischen Markers in eine Carbonsäure-Funktion umgewandelt, die für die Umsetzung mit Aminen und Alkoholen geeignet ist. Diese Reaktion an immobilisierten Amino- oder Hydroxy-Gruppen ist bereits in der Literatur beschrieben. Bernsteinsäureanhydrid wird als eine Art Spacer (54, 55) für die Immobilisierung von Phenolen (56) verwendet und diente als Baustein für die Synthese von verschiedenen Heterozyklen (57, 58) und Makrozyklen (59). Die Veresterungsreaktion wurde in Pyridin mit 4-Dimethylaminopyridin als Katalysator durchgeführt.

Nach der Umfunktionalisierung des chemischen Markers sollte die Kopplung von Lobelin und Yohimbin durchgeführt werden. Dafür wurde ein HOBt-aktiver Ester „in situ“ generiert, der mit den Hydroxygruppen von Lobelin und Yohimbin umgesetzt wurde. Bild 3.2.2 stellt die Reaktionsgleichung dar.

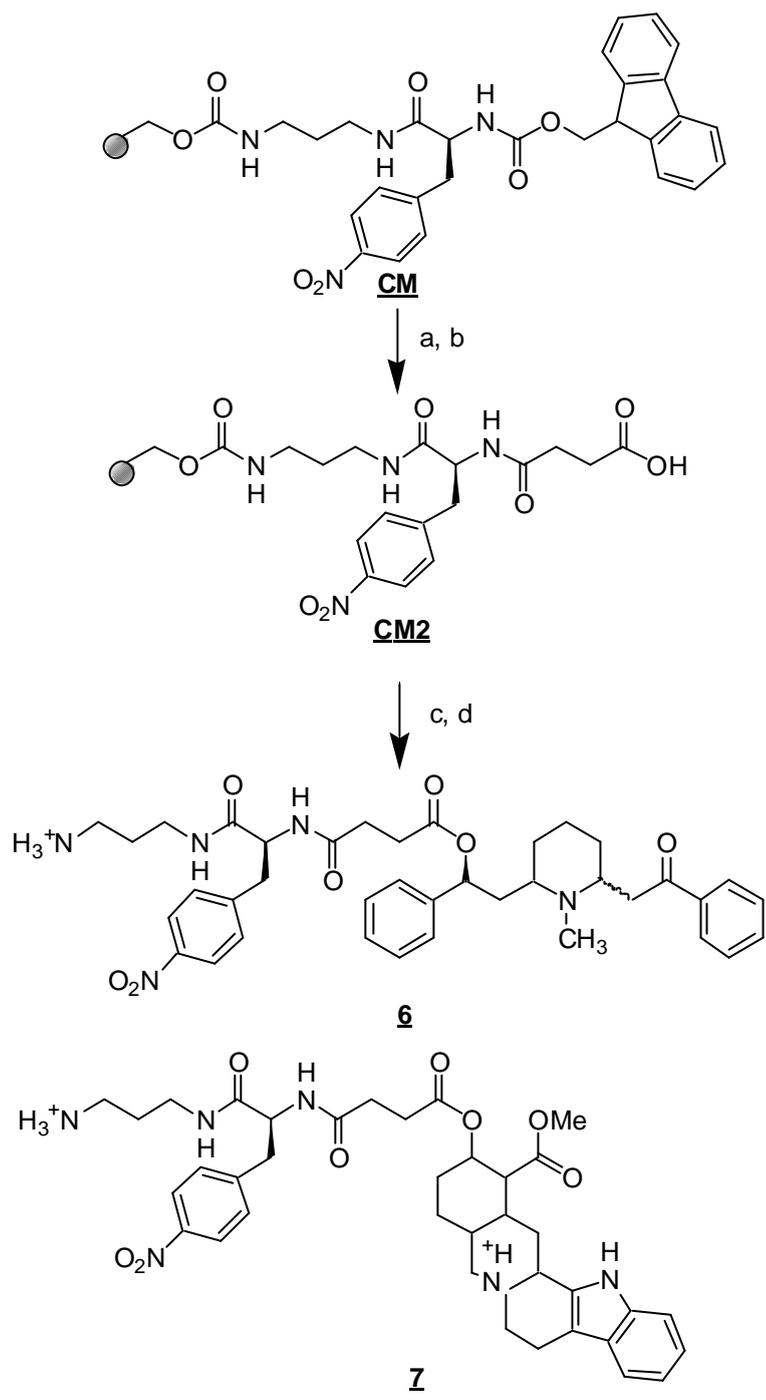


Bild 3.2.2 Umfunktionalisierung des chemischen Markers und Immobilisierung von Lobelin und Yohimbin

a) 20% Piperidin in DMF b) Bernsteinsäureanhydrid, 4-Dimethylaminopyridin, Pyridin c) HOBT, DIC, 4-DMAP, Lobelin oder Yohimbin d) 1:1 TFA in DCM

Die Acylierung des chemischen Markers wurde durch die selektive Testung auf Anwesenheit von Aminen an der Festphase verfolgt. Dieses Ausgangsprodukt vor der Kopplung der Naturstoffe konnte nach Abspaltung vom Harz mittels HPLC-MS identifiziert werden. Die Kopplung von Lobelin und Yohimbin wurde mittels HPLC-MS Analyse der

Rohprodukte nach Abspaltung verfolgt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Substanz	HPLC Reinheit		HPLC Konversion		[M+H] ⁺ _{ber}	[M+H] ⁺ _{APCI}
	%		%			
	270nm	210nm	270nm	220nm		
Lobelinderivat <u>6</u>	95	90	100	100	686,8	686
Yohimbinderivat <u>7</u>	50	41	100	100	703,8	703,3

Tabelle 3.2; 3 HPLC-MS Analyse der Produkte der Ester-Bindung von Lobelin und Yohimbin an der Festphase nach Derivatisierung des chemischen Markers mit Bernsteinsäureanhydrid

Bei der Immobilisierung des Lobelins zeigt das Chromatogramm des Rohproduktes zwei Produkte in Verhältnis 1:1. Beide Peaks besitzen die gleiche Molekülionen und sind in Übereinstimmung mit der Masse des erwarteten Produktes 6. Es wurde postuliert daß Lobelin in zwei Isomeren vorliegt. Bei der Synthese von 7 wurden UV-aktive Nebenprodukte gebildet.

Der Verlust der Chiralität am β-Kohlenstoffatom zum Keton im Lobelin in protischen Lösungsmitteln ist literaturbekannt (60) und war vermutlich der Grund der beobachteten Verdopplung der Produktpeaks. Die HPLC-MS Analyse des Naturstoffes Lobelins zeigte analoge Doppelpeaks identischer Masse. Es wurde nach der Integration des Chromatogramms die Summe der Flächen für beide Peaks für die Bestimmung der HPLC-Reinheit und Konversion verwendet.

Nach Wiederholung der Ansätze in größeren Maßstab betragen die Ausbeuten nach chromatographischer Aufarbeitung:

Substanz	Ausbeute
Lobelinderivat <u>6</u>	% 41
Yohimbinderivat <u>7</u>	31

Tabelle 3.2. 4 Isolierte Ausbeute nach Es kalierung der Synthesen von 6 und 7

Die guten Konversionen des Ausgangsmaterials **CM** in beiden Synthesen waren von ungenügender Reinheit begleitet. Eine limitierte Stabilität der Substanzen vor Abspaltungs- und Aufarbeitungsbedingungen war eine mögliche Erklärung für die mäßige Ausbeuten.

3.2.4 Umfunktionalisierung des Markers mit Bromessigsäure zur Immobilisierung von Nortropin

Die selektive Immobilisierung von polyfunktionellen Naturstoffen sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Die selektive nucleophile Substitution an einem Festphasengebundenen Halogen durch einen bifunktionellen Molekül ist Literaturbekannt (64) und wurde als Ziel der Methodenentwicklung ausgewählt. Die nucleophile Substitution des Broms von Bromessigsäure durch Amine in der Festphasensynthese von Heterozyklen (64) und Makrozyklen (36) ist literaturbekannt und bildet eine Basis der Peptoid-Synthese nach Zuckermann (65).

Um ein geeignetes Substrat für diese Reaktion herzustellen, wurde der chemische Marker mit Bromessigsäure unter Aktivester-Bedingungen acyliert. Der Naturstoff Nortropin wurde danach mittels einer nucleophilen Substitution an diesem Substrat in Dimethylformamid immobilisiert. Hierbei sollte die höhere Nucleophilie des Stickstoffs für eine selektive Derivatisierung des Nortropins ausgenutzt werden. Beide Schritte wurden nach in der Literatur beschriebenen Protokollen durchgeführt (65). Bild 3.2.3 stellt die Reaktionsgleichung dar. Die Synthese wurde im 10 mg Maßstab (~ 0.1 mMol) durchgeführt.

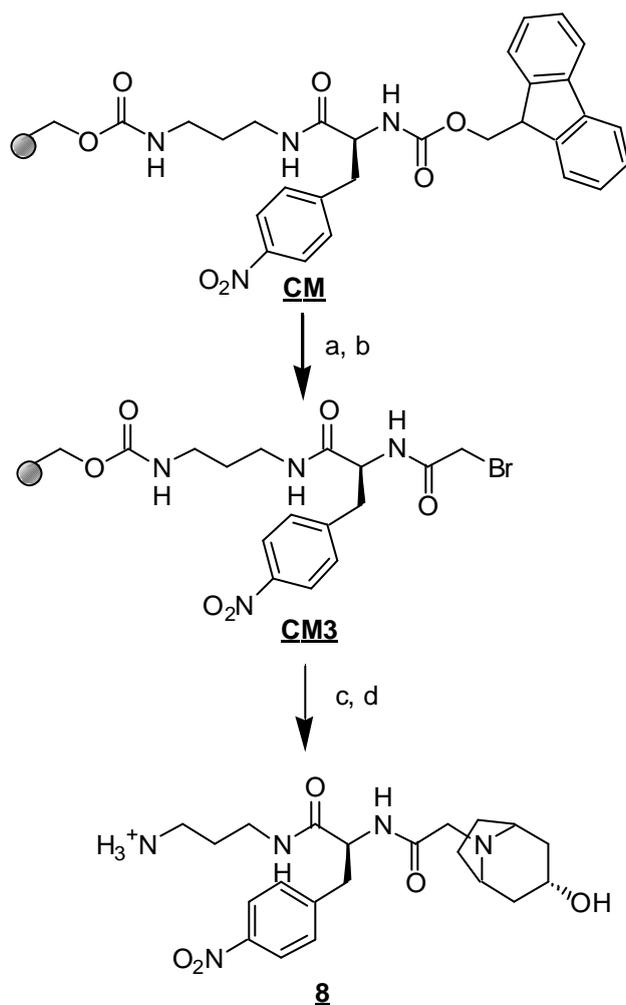


Bild 3.2.3 Umfunktionalisierung von chemischen Markern und Immobilisierung von Nortropin

a) 20% Piperidin in DMF b) Bromessigsäure, HOBt, DIC, 6 St. c) Nortropin, DMF, 6 St. d) 1:1 Trifluoroessigsäure in DCM. 30 min

Die Vollständigkeit der Acylierung nach Schritt b) wurde durch den Nachweis der Abwesenheit von Aminen in **CM3** mit dem Chloranil-Test nachgewiesen. Tabelle 3.2.5 stellt die Ergebnisse der chromatographischen Analyse nach Abspaltung von **8** dar.

Substanz	HPLC UV Reinheit		HPLC UV Konversion		[M] ⁺ _{ber.}	[M] ⁺ _{gem.}
	%		%			
	270nm	210nm	270nm	220nm		
Nortropinderivat 8	100	85	100	100	433,5	434,2

Tabelle 3.2.5 HPLC-MS Analyse der Produkte der Immobilisierung von Nortropin durch nucleophile Substitution nach Derivatisierung des chemischen Markern mit Bromessigsäure an der Festphase

Die Abwesenheit der Ausgangsprodukte und die hohe UV Reinheit des Produktes deutete auf eine sehr sauber verlaufende Reaktion. Die Synthese wurde in einem größeren Maßstab durchgeführt, um weitere Nachweise über die Identität des gebildeten Produktes zu bekommen.

Nach präparativer Aufarbeitung des Produktes konnte man mittels Vergleich der NMR Daten aus der Literatur die Anwesenheit des Tropangerüsts im Molekül bestätigen (66). Tabelle 3.2.6 stellt die Ausbeute der Synthese nach Aufarbeitung der Rohprodukte dar.

Substanz	Ausbeute %
Nortropinderivat 8	25

Tabelle 3.2.6 Ergebniss der Synthese von 8

Mittels der NMR Analyse war es nicht möglich, zwischen N- und O-Alkylierung am Nortropin zu differenzieren. Um die Identität des Produktes nachweisen zu können, wurde die Oxidation der freien Hydroxylgruppe durchgeführt. Als Oxidationsmittel wurde Pyridiniumdichromat in Dimethylformamid ausgewählt (31, 67, 68).

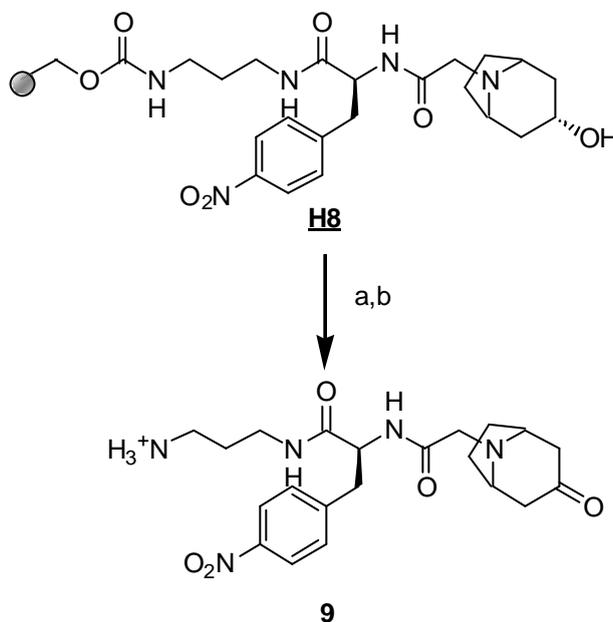


Bild 3.2.4 Oxidation der Hydroxy-Gruppe im Nortropin

a) Pyridinium dichromat, Dimethylformamid, 6h b) 1:1 Trifluoroessigsäure, DCM 30 min

Die HPLC-MS Analyse der Rohprodukte zeigte einen breiten Peak mit gleicher Retentionszeit wie **8**. Massendifferenz von 2 Einheiten zum Edukt bewies die Identität des Produktes **9**.

Substanz	HPLC Reinheit		Ausbeute %	[M] ⁺ _{ber.}	[M] ⁺ _{gem.}
	270nm	210nm			
Nortropinderivat 9	100	85	35	433,5	434,2

Tabelle 3.2.7 Ergebniss der Synthese von 9

Die Herstellung von **9** bewies die selektive nucleophile Substitution am Stickstoff des Naturstoffes bei der Synthese von **8**.

Protokolle für die Kopplung von verschiedenen Naturstoffen durch den chemischen Marker an der Festphase wurden beschrieben. Die Immobilisierung von Naturstoffen mit einer Carbonsäure-Gruppe, wie 21-Hydroxyprogesteronhemisuccinat und Estradiol-17 β -hemisuccinat, am chemischen Marker konnte direkt durch eine Amidbindung realisiert werden. Die Derivatisierung des chemischen Markers mit Bernsteinsäureanhydrid lieferte eine Festphasen-gebundene Amino-Funktion zur Immobilisierung von Lobelin und Yohimbin.

Die selektive Immobilisierung von Nortropin an der Aminofunktion wurde durchgeführt. Die Kopplung vom Naturstoff an das Harz fand nach der Derivatisierung des chemischen Markers mit Bromessigsäure statt. Die selektive nucleophile Substitution am Stickstoffatom des Naturstoffes wurde mittels Oxidation der nach der Kopplung freien Alkoholfunktion bewiesen. Die Hydroxyfunktion des Naturstoffes blieb damit für weitere Derivatisierungen frei.

Die Anwendung eines chemischen Markers hat die Verfolgung von Kopplungsreaktionen an der Festphase vereinfacht. Die Abspaltung von Reaktionsprodukten von einer kleinen Menge an Harz (10 mg ~ 0.1 mMol) und die Analyse der Abspaltungsprodukte mittels HPLC-MS kann vorteilhaft zur Aussage über die Vollständigkeit der Synthesen und die Identität der Syntheseprodukte herangezogen werden.

3.3 Parallelsynthese von Nortropin Derivaten

3.3.1 Einleitung

In Rahmen dieser Arbeit sollten die Vorteile der Festphasenchemie für die Synthese von Naturstoffderivaten ausgenutzt werden (s. 2). In diesem Teil wird der chemische Marker für die Methodenentwicklung zur Parallelsynthese von Nortropin-Derivaten genutzt.

Die bisher in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollten zur Parallelsynthese von Nortropin-Derivaten in zwei Richtungen führen. A: Die Derivatisierung des Markers vor der Immobilisierung von Nortropin sollte die Variation am N-Terminus des Naturstoffes ermöglichen. Nach Immobilisierung von Nortropin sollte die Derivatisierung am O-Terminus des harzgebundenen Moleküls zur Herstellung weiterer Derivate führen (s. Abb 3.3.1).

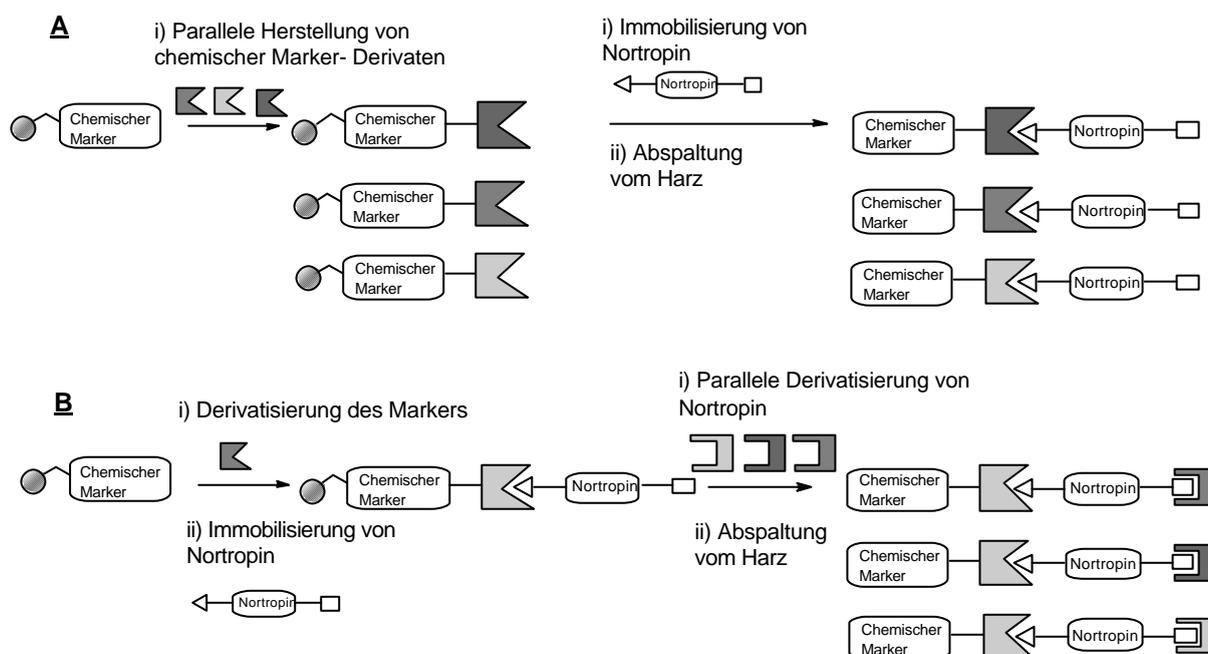


Bild 3.3.1 Möglichkeiten für die parallele Herstellung von Nortropinderivaten.

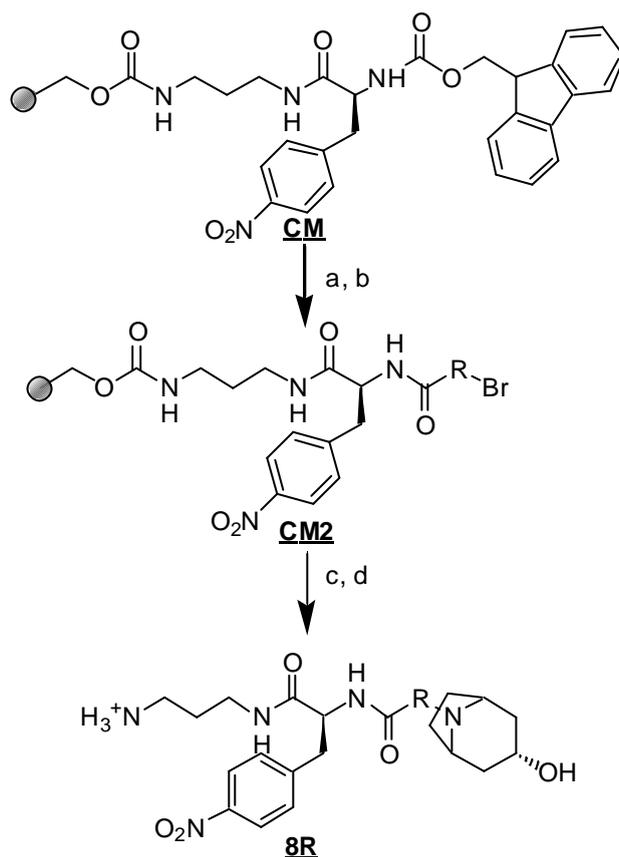
A: Variierung des zweiten Linkers vor der Immobilisierung, B: Derivatisierung an der Festphase

Für die Variation bei der Derivatisierung des chemischer Markers vor der Immobilisierung von Nortropin sollte die Anwendbarkeit verschiedener Substrate für die nucleophile Substitution untersucht werden. Für die Derivatisierung nach der Immobilisierung des Naturstoffes, sollte die Anwendbarkeit verschiedener Reagenzien für die selektive Derivatisierung der freien Hydroxy- Gruppe geprüft werden.

3.3.2 Variierung bei der Derivatisierung des chemischen Markers

In vorherigen Abschnitt wurde eine Acylierung des chemischen Markers mit Bernsteinsäure und Bromessigsäure für die Immobilisierung verschiedener Naturstoffe erprobt. In diesem Abschnitt sollte für die Herstellung verschiedener Substrate zur Immobilisierung von Nortropin der chemische Marker mit verschiedenen Carbonsäuren acyliert werden.

Bei der Auswahl der untersuchten Substrate war die Alkyl-Kettenlänge sowie die Substitution am Kohlenstoffatom, an dem die nucleophile Substitution stattfindet, zu variieren. Es kamen hierbei diverse bromsubstituierte Carbonsäuren im Betracht. Substrate für eine nucleophile aromatische Substitution wurden auch in der gleichen Reaktionssequenz eingesetzt (72-77) (s. Abb. 3.3.2). Die Reaktionen wurden entsprechend der freien reaktiven Gruppe mittels Chloraniltest bzw. destruktiv durch HPLC-MS verfolgt.



(Nummer)R: Bezeichnet eine Substanzfamilie, die auf analoger Weise hergestellt ist.

Bild 3.3.2 Parallele Synthese von Nortropin-Derivaten durch die Variierung des Substrates vor seiner Immobilisierung an der festen Phase

- a) 20% Piperidine in DMF, 30min, b) Carbonsäure, HOBt, DIC, DMF 4 h; c) Nortropin, DMF, 6 h; d) 1:1 TFA in DCM, 30 min.

In der folgenden Tabelle sind die Daten für die Acylierung des Markers mit 11 verschiedenen Halogencarbonsäuren zusammengestellt.

Position	Haloalkyl- oder Haloaryl- Carbonsäure	[M+H] ⁺ _{ber.}	[M+H] ⁺ _{gemm.}	HPLC	HPLC	Chloranil- Test
				Reinheit 220/ 270 nm.	Konversion 220/270 nm.	
1	Bromessigsäure	388.2	387.1	77/ 86	100/ 100	Negativ
2	2-Brombuttersäure	416,3	415,3	77/ 87	100/ 100	Negativ
3	a-Bromisobuttersäure	415,3	415,3	82/ 93	100/ 100	Negativ
4	a-Bromphenyllessigsäure	464,4	465	53/ 46	84/ 72	Positiv
5	3-Brompropionsäure	401,3	401	29/ 42	100/ 100	Negativ
6	3-Brombuttersäure	415.3	415	46/ 62	100/ 100	Negativ
7	4-Brombuttersäure	415.3	393,1	47/ 41	56/ 48	Positiv
8	11-Bromundecansäure	514,5	513	86/ 89	100/ 100	Negativ
9	4-(Bromomethyl)- nitrobenzoesäure.	510,5	510	34/ 48	100/ 100	Negativ.
10	4-Fluoro-3- Nitrobenzoesäure	434.4	434.1	91/ 95	91/ 95	Negativ.
11	2-Fluoro-5- Nitrobenzoesäure	434,4	434	85/ 96	100/ 100	Negativ

Tabelle 3.3.1 Reaktionsverfolgung (HPLC-MS und Test auf Anwesenheit von Aminen) nach Acylierung der chemischen Markers (s. Bild 3.3.2)

Der Chloranil-Test zeigt eine vollständige Acylierung der Aminogruppe des chemischen Markers mit allen verwendeten Carbonsäuren. Ausnahmen sind a-Bromphenyllessigsäure und 4- Brombuttersäure. Die Bildung eines γ -Lactons aus 4-Brombuttersäure beziehungsweise eine sterische Hinderung im Falle von α -Bromphenyllessigsäure sind mögliche Erklärungen für die nicht erfolgreiche Kopplung dieser Bausteine.

Die chromatographische Analyse der Rohprodukte zeigte die erwarteten Produkte in guter Reinheit. Die Synthesen der Positionen 2, 3, 4 und 6 wurden mit racemischen Bromalkylsäuren durchgeführt. Wegen des chiralen Zentrums im chemischen Marker war jeweils die Bildung zweier Diastereomere zu beobachten. Diese konnten

säulenchromatographisch getrennt werden. Die Analyse der Rohprodukte der Kopplung von 3-Brompropionsäure und 3-Brombuttersäure ergab ein Nebenprodukt mit der Masse m/z 322 ($M+H-79$). Die Eliminierung des Broms während der Kopplungs- bzw. Abspaltungs-Reaktion führte zur Bildung eines α - β ungesättigten Ketons mit der entsprechende Masse.

Die vorherigen Ergebnisse waren zur Auswertung der chromatographischen Analyse nach Abspaltung der Syntheseprodukte nach dem zweiten Syntheseschritt (s. Bild 3.3.2) hilfreich. Folgende Tabelle fasst die Ergebnisse der chromatographischen Analyse zusammen.

Position	Haloalkyl- oder Haloaryl- Carbonsäure	$[M+H]^+$ _{berechnet}	$[M+H]^+$ _{gefunden}	HPLC Reinheit 220nm	HPLC Konversion 220nm
1	Bromessigsäure	433,5	434,2	100	100
2	2-Brombuttersäure	462,4	461,5	41	51
3	α -Bromoisobuttersäure	462,4	461,5	30	83
4	α -Bromphenyl- essigsäure	510,5	510	34	76
5	3-Brompropionsäure	448,4	448,1	78	100
6	3-Brombuttersäure	462,4	462,4	0	0
7	4-Brombuttersäure	462,4	462,1	25	41
8	11-Bromundecansäure	560,6	560	80	100
9	4-(Bromomethyl)-3-nitro- benzoesäure	557,7	557,5	92	100
10	4-Fluoro-3-nitrobenzoesäure	541,6	541,6	94	100
11	2-Fluoro-5-nitrobenzoesäure	541,6	541,2	94	100

Tabelle 3.3.2 Chromatographische Analyse nach der Parallelsynthese verschiedener Nortropinderivate (s. Bild 3.3.2)

Wie im ersten Reaktionsschritt war auch die Reaktion mit Nortropin mehrheitlich erfolgreich. Bemerkenswert gut verliefen die aromatischen nucleophilen Substitutionen (Positionen 10 und 11).

Die nicht vollständige Reaktion in der Ansätzen 4 und 7 sind in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Tabelle 3.3.1. In diesen Fällen war eine nicht vollständige Kopplung der Bromalkylsäure der Grund für die schlechten Reinheiten an erwartetem Produkt. Bei den Synthesen in Positionen 2 und 3 sollte die nucleophile

Substitution an einer Bromalkylverbindung der Formel (Br-C-R₁R₂R₃) stattfinden. Eine sterische Hinderung war möglicherweise der Grund für die nicht erfolgreiche Synthese, da die Kopplung von beiden Bromalkylsäuren an die chemischen Marker bei dem ersten Syntheseansatz problemlos verlief (s. Tabelle 3.3.1). Die Bildung des erwarteten Produktes **8R** in Position 5 verlief mit guter Reinheit. Es wurde deswegen angenommen, dass die Abspaltungsbedingungen vom Harz zur Eliminierung des Broms im Zwischenprodukt (s. oben und Tabelle 3.3.1) führt.

Die Synthese mit 2-Brombuttersäure wurde in einem größerem Maßstab (100 mg Harz; 0.074 mMol) durchgeführt. Die verschiedenen Produktisomeren wurden chromatographisch aufgereinigt (s. 4 und Abb. 3.3.3).

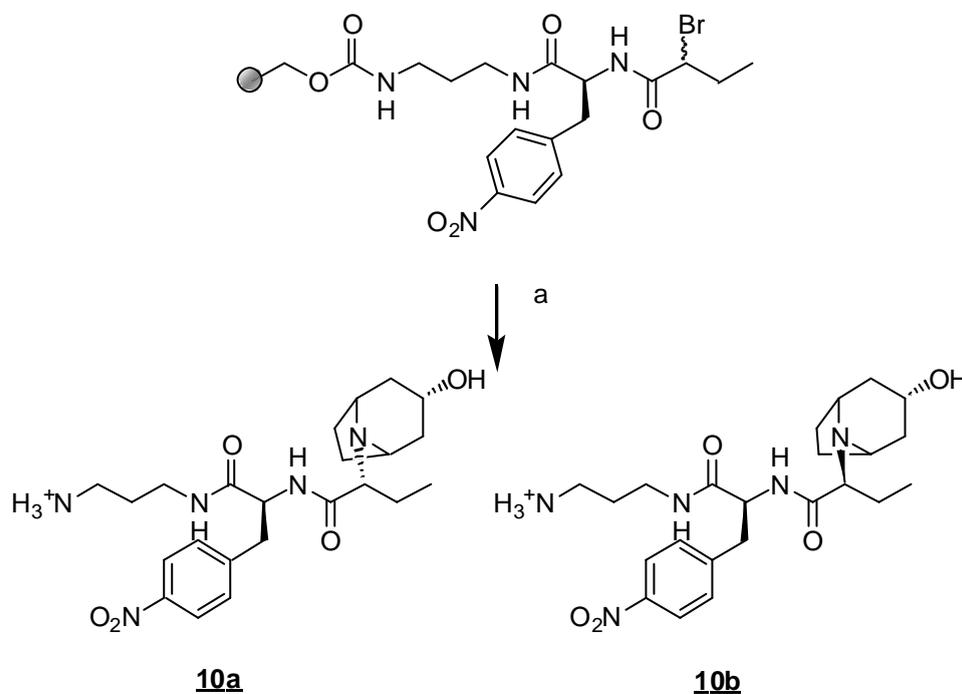


Bild 3.3.3 Festphase- Synthese von zwei diastereomeren Nortropinderivaten durch die Anwendung von *rac* 2-Brombuttersäure

a) Nortropin, DMF, 6h

3.3.3 Variierung bei der Derivatisierung eines Festphasen-gebundenen Nortropinderivates

Die erprobte Immobilisierung des Nortropins am Stickstoff ließ eine Hydroxy-Gruppe frei für weitere Umsetzungen. Die Veresterung dieser Gruppe erschien als eine selektive Methode, um die an die Festphase-gebundenen weiter zu derivatisieren. Deswegen sollten in einem ersten Schritt optimale Acylierungsbedingungen gefunden werden.

Ähnliche Optimierungsuntersuchungen für die Veresterung von immobilisierten Alkoholen oder Carbonsäuren sind für die Naturstoff- und Naturstoffanalogia-Synthese bereits literaturbekannt (79, 80). Die Veresterung von Tropanen in Lösung ist auch bei der Untersuchung seiner cholinergen Wirkung in der Literatur beschrieben (81).

Für die Untersuchung verschiedener Reaktionsbedingungen und Kopplungssysteme wurde ein Festphasen-gebundenes Nortropinderivat und N-Fmoc geschütztes Glycin zur Synthese von Substanz **11** verwendet (s. Abb. 3.3.5).

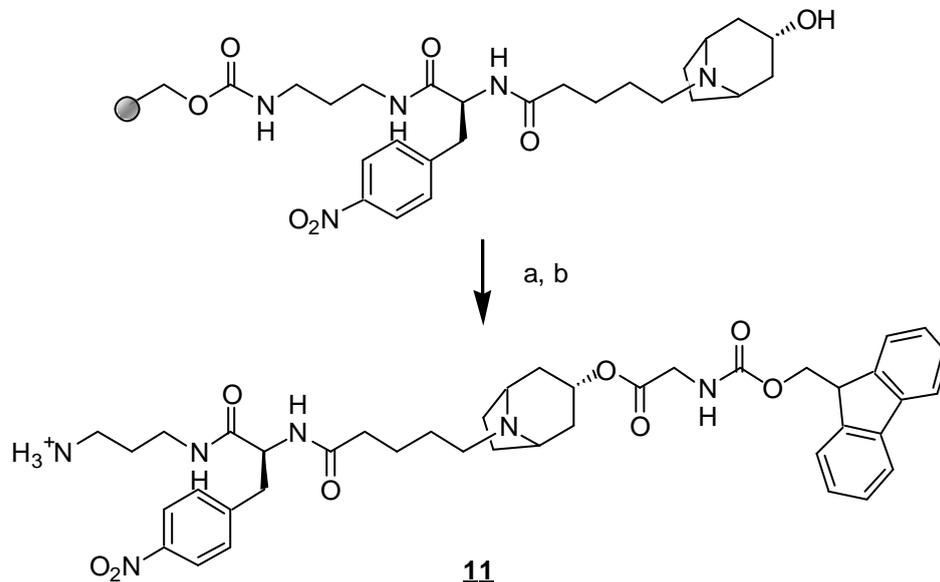


Bild 3.3.5 Untersuchung der Acylierungsbedingungen für die Hydroxy-Gruppe in Nortropin

a) Fmoc Glycin; Kopplungssystem (Tab.3.3.3) b) TFA/DCM 1:1

Um Carbonsäuren in gute Acylierungsreagenzien umzuwandeln, wurde die „in situ“ Herstellung von symmetrischen Anhydriden, und verschiedene Aktiveester sowie Säurefluoride angewendet (52). Die Ergebnisse der chromatographische Analyse sind in folgender Tabelle zusammengefaßt.

Kopplungssystem	Zeit	HPLC Reinheit %		HPLC Konversion %	
		270nm	210nm	270nm	210nm
1. DIC/ HOBt*H ₂ O	4h	43	41	46	57
	48h	49	21	100	100
2. DIC/ HOBt	4h	13	14	19	27
	48h	13	5	25	19
3. DIC/ DMAP	4h	54	43	75	74
	48h	66	54	78	76
4. PyBOP/ DIPEA	4h	52	38	62	64
	48h	67	52	100	100
5. HBTU/ DIPEA	4h	46	32	60	63
	48h	66	49	100	100
6. HBTU/ DIPEA/ DMAP	4h	45	39	75	78
	48h	48	48	64	75
7. MNSMT/ NMI/ DCM.	4h	78	36	80	85
	48h	80	40	100	100
8. TFFH/ Pyridin/ DCM	4h	45	37	56	55
	48h	88	74	100	100

Tabelle 3.3.3 Vergleich verschiedener Kopplungsreagenzien durch HPLC-MS Analyse

Die Ergebnisse zeigten keine wesentlichen Unterschiede bei vielen der angewendeten Kopplungsreagenzien. Die erhaltenen Reinheiten hingegen zeigten eine große Variabilität. Die nicht ausreichende Beseitigung verschiedener UV-absorbierender Reagenzien vor der Abspaltung des Produktes vom Harz sind ein möglicher Grund für dieses Ergebnis.

Es wurde gezeigt daß lange Reaktionszeiten notwendig sind für einen vollständigen Reaktionsumsatz. Die große sterische Hinderung der Hydroxy-Gruppe im Nortropin Gerüst ist möglicherweise der Grund für die recht langsame Reaktionsgeschwindigkeit mit allen Kopplungsreagenzien (s. Abb. 3.3.6).

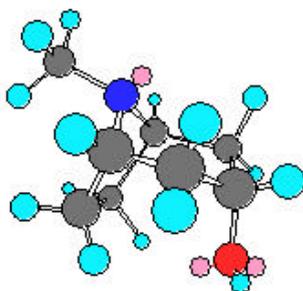


Abb. 3.3.6 Dreidimensionales Modell des Nortropingerüstes

Wegen dieser sterischen Hinderung wurde angenommen, daß die Kopplung von anderen, stärker sterisch gehinderten Carbonsäuren problematisch sein könnte. Diese Schwierigkeit wird in der Literatur mittels der Verwendung von kleinen Abgangsgruppen bei der Veresterung von sterisch gehinderten Alkoholen und Carbonsäuren (80) umgangen. Als optimale Reaktionsbedingung wurde daher eine Reaktionszeit von 48 Stunden und die „in situ“ Herstellung von Säurefluoriden (s.Position 8 in Tab. 3.3.3) gewählt.

Im Anschluss an die Reaktionsoptimierung sollte die Einsatzbreite dieser Reaktion bezüglich weiterer Carbonsäuren untersucht werden. Eine Abspaltung der Fmoc-Gruppe von Fmoc geschützten Aminosäuren setzt wiederum eine Amino-Gruppe frei, die die Möglichkeit zu weiterer Derivatisierung bietet. Die Einsatzbreite der Acylierung von Nortropin mit verschiedenen kommerziell erhältlichen Fmoc-Aminosäuren wurde geprüft. Alle Ansätze wurden parallel durchgeführt, was eine schnelle Aussage der Anwendbarkeit für viele Aminosäuren in dieser Reaktion erlaubte. Die Ergebnisse der chromatographischen Analyse dieser Reaktionen sind in Tabelle 3.3.4 zusammengefaßt.

Aminosäure	HPLC		HPLC		[M+H] ⁺	[M+H] ⁺
	Reinheit		Konversion		berechnet	gemessen
	270	220	270	220		
1. Fmoc-Gly-OH	82	85	100	100	755,9	757
2. Fmoc-Val-OH	52	50	60	65	798	798,7
3. Fmoc-Ile-OH	35	40	45	53	812	812,5
4. Fmoc-Pro-OH	90	81	100	100	753,9	752,2
5. Fmoc-Leu-OH	81	84	89	92	812	812,5
6. Fmoc-Phe-OH	85	81	100	100	846	846,2
7. Fmoc-Lys(Mtt)-OH	49	36	81	86	826,0	827,3
8. Fmoc-His(Mtt)-OH	96	65	100	100	834,9	836,2
9. Fmoc-Trp-OH	63	64	88	96	885,1	884,8
10. Fmoc-Cys(tBu)-OH	95	80	100	100	857,1(+tBU)	858,0
11. Fmoc-Met-OH	82	84	95	97	830,1	830,3
12. Fmoc-Cit-OH	10	9	11	14	856	856
13. Fmoc-Phg-OH	90	86	100	100	832	832,2
14. Fmoc-Tic-OH	62	51	96	76	858	858
15. Fmoc-L-a-tbutylglycin	14	17	18	23	812,1	812,5
16. Fmoc-Trp(boc)-OH	59	62	71	81	884,1	884,8
17. Fmoc-e-Ahx-OH	26	30	31	38	812	812,5
18. Fmoc-Hyp(tBu)-OH	29	32	35	40	810,98+tBu	812,5
19. Fmoc-Thi-OH	88	89	100	100	852	852
20. Fmoc-Cys-(Mmt)-OH	75	83	100	100	1074,3 (+Mmt)	1073,3
21. Fmoc-Orn-(Boc)-OH	23	26	26	31	811,97	813,5
22. Fmoc-β-Ala-OH	62	67	67	72	769,9	771,0
23. Fmoc-Cha-OH	76	77	88	90	852,1	852,2
24. Fmoc-Ser(tBu)-OH	45	45	67	73	784,88	786,7
25. Fmoc-(g)Abu-OH	80	23	92	94	784	786,7
26. Fmoc-D-Pen-(acm)-OH	11	14	13	15	901	900,5
27. Fmoc-Dpr(ivDde)-OH	66	65	100	100	991,1	990,5
28. Fmoc-Lys(boc)-OH	79	77	86	89	825,5	827,3

Tabelle 3.3.4 HPLC-MS Analyse der Kopplung verschiedener Aminosäuren an Festphasen-gebundenen Nortropin

Die Ergebnisse dieser Tabelle zeigten, dass optimierte Reaktionsbedingungen die Veresterung der Hydroxy-Gruppe am Nortropin mit einer großen Anzahl von Aminosäuren ermöglicht. Bemerkenswert verlief die Kopplung von sterisch gehinderten Aminosäuren wie Prolin oder Phenylglycin (Positionen 4 und 13 in Tab. 3.3.4). Die Umsetzung mit dem ausgewählten Kopplungsreagenz an einem Festphasen-gebundenem Nortropinderivat mit Fmoc-Glycin (s. Position 1 in Tabelle 3.3.4) zur Synthese von **11** (s. Abb. 3.3.5) wurde in 100mg Harz - (0.074 mMol) - Maßstab durchgeführt (45% Ausbeute; s.4).

Mit der Anwendung von chemischen Markern wird die Untersuchung der Parallelsynthese von Nortropinderivaten vereinfacht. Die Derivatisierung des chemischen Marker mit nicht sterisch gehinderten Bromalkylsäuren und Arylhalogeniden ergibt verschiedene Substrate, die für die Immobilisierung von Nortropin an der Festphase mittels nucleophiler Substitution verwendet werden können. Bemerkenswerterweise sind N-Aryl-Nortropinderivate nicht literaturbekannt. Damit ermöglicht diese Strategie die Herstellung von neuartigen Nortropinderivaten. Die Acylierung der Hydroxygruppe kann mittels der „in situ“ Herstellung von Säurefluoriden mit einer breiten Auswahl an Fmoc- Aminosäuren erreicht werden.

3.4 Herstellung von Substanzbibliotheken mit Nortropin als Gerüstbaustein

3.4.1 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die strukturellen Eigenschaften von Naturstoffen zur Herstellung von neuartigen Verbindungen genutzt werden. Um einen möglichst großen Einfluss des Grundgerüsts auf die dreidimensionale Struktur der synthetisierten Substanzen zu gewährleisten, sollte der Naturstoff in einer zentralen Position platziert werden. Die selektive Derivatisierung von mehreren Reaktivitätszentren kann hierbei die Anzahl der möglichen Substanzen erhöhen. Reaktionen, bei denen verschiedenen Regioisomere auftreten können, waren besonders interessant, da auf sich auf diese Weise die strukturelle Vielfalt erhöhen lässt. Um eine für die biologische Testung strukturelle Homogenität der Proben zu gewährleisten, sollte jedoch eine Kontrolle der Regioselektivität der Reaktion möglich sein.

Mit Berücksichtigung dieser Anforderungen und der bisher gewonnenen Ergebnisse über die Parallelsynthese an der Festphase von Nortropinderivaten wurden folgende Synthesewege konzipiert:

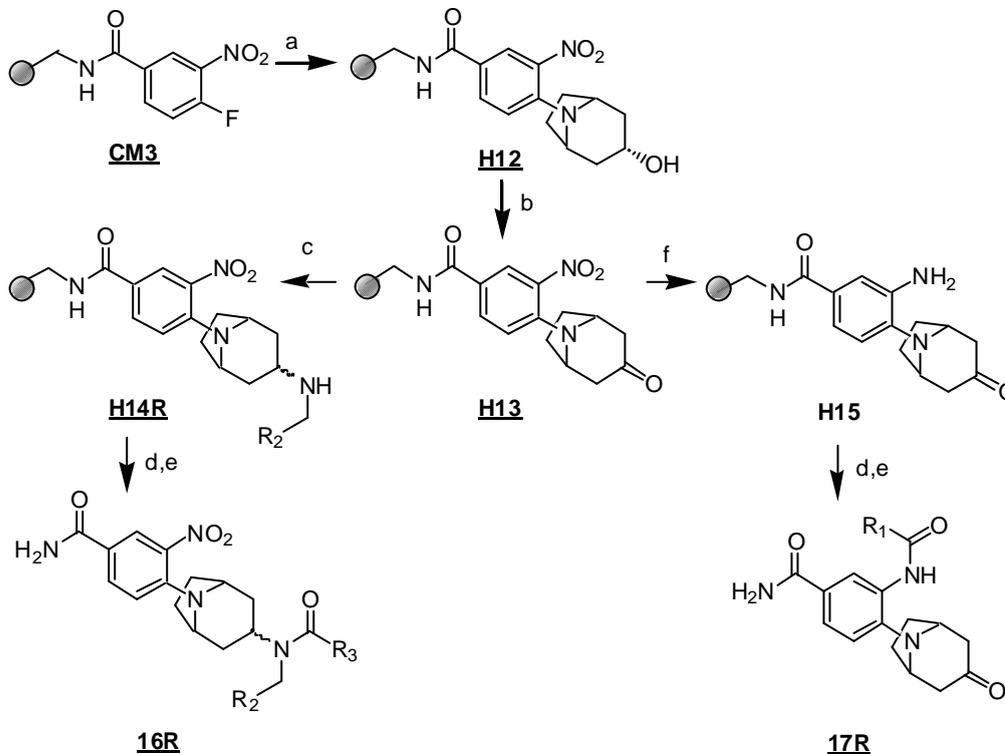


Bild 3.4.1 Syntheseweg zur Herstellung von Nortropinderivaten

a) Nortropin, DMF; b) PDC, DMF; c) Amine, DCM, Molsieb, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$; d) Säurechloride, Et_3N , DCM; e) DCM/ TFA 1:1

Die Derivatisierung des Rink-Linkers mit 4-Fluor-3-nitro-benzoesäure als chemischer Marker ermöglicht die Immobilisierung von Nortropin durch eine aromatische nucleophile Substitution an der Festphase (s. 3.3). Alle Nortropinderivate besitzen dann eine UV-absorbierende aromatische Gruppe und eine leicht ionisierbare Amid-Funktion nach Abspaltung des Harzes (s. 3.2). Auf diese Weise konnten die Eigenschaften des bisher angewendeten chemischen Markers substituiert werden (s. 3.3).

Nach dieser Immobilisierung von Nortropin am Polymer sollte die Oxidation der freien Hydroxy-Gruppe des Nortropins ein Substrat für eine reduktive Aminierung liefern. Die Kontrolle der Stereoselektivität und somit die Möglichkeit der selektiven Herstellung von endo- und exo-Isomeren ermöglicht den Zugriff auf eine größere strukturell Vielfalt. Die Umsetzung mit primären Aminen wurde gewählt, da in diesem Fall wiederum eine weitere Derivatisierung des resultierenden sekundären Amins möglich ist.

Eine weitere chemische Variabilität des Systems nach Oxidation der Hydroxy-Gruppe des Nortropins sollte durch die Reduktion der Nitro-Gruppe im aromatischen Ring gegeben sein. Nach Reduktion zu einer Amino-Funktion wurde die selektive Acylierung dieses neuen reaktiven Zentrums untersucht. Der vorgeschlagene Syntheseweg enthielt 7 verschiedene Syntheseschritte. Wie in den vorherigen Kapiteln wurden für die Untersuchung von Reaktionsbedingungen und zur Auswahl der geeigneten Bausteine Modellreaktionen verwendet.

3.4.2 Immobilisierung von Nortropin und Oxidation der Hydroxy-Gruppe

Es wurde im Kapitel 3.3 gezeigt, daß die Derivatisierung des chemischen Markers mit 4-Fluoro-3-nitro-benzoesäure ein geeignetes Substrat für die Immobilisierung von Nortropin ergibt. Hier wird die Derivatisierung des Rink-Linkers mit dieser Carbonsäure gleichzeitig für die Generierung eines Substrates für die nucleophile aromatische Substitution von Nortropin und für die Herstellung eines chemischen Markers genutzt.

Die Acylierung von 4-Fluoro-3-nitro-benzoesäure am Rink-Linker fand durch die „in situ“ Herstellung eines aktiven Esters analog zur Literatur statt (72). Das Abspaltungsprodukt des Amid-Rink- Linkers führt zu einer freien Amid-Gruppe (s. 3.2).

Die Vollständigkeit der Umsetzung von 4-Fluor-3-nitro-benzoesäure am Rink-Linker konnte mittels Chloranil-Test (Test auf die Anwesenheit von freien Aminen) verfolgt werden (s. 4) (86). Die Immobilisierung von Nortropin erfolgte dann durch eine nucleophile aromatische Substitution (s. 3.3). Die Oxidation der freien Hydroxy-Gruppe des resultierenden Edukts konnte war an der Festphase erfolgreich (s.3.2.4). Folgendes Bild stellt die Reaktionsgleichungen zur Immobilisierung und zur Festphasen-Oxidation von Nortropin dar.

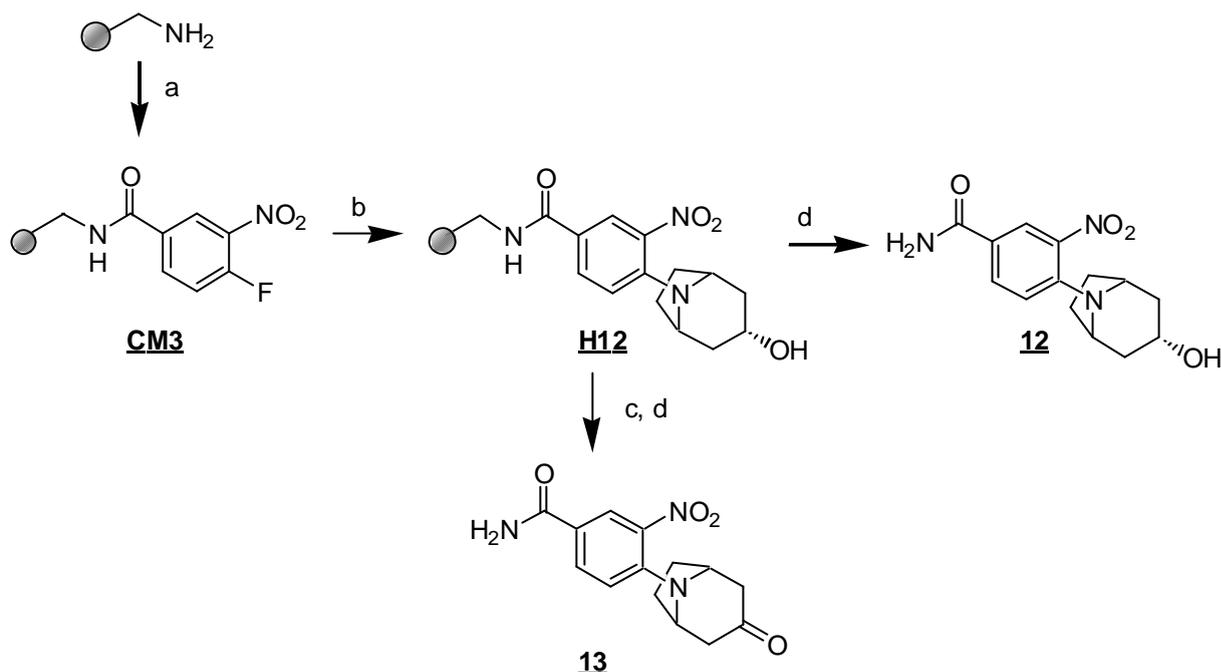


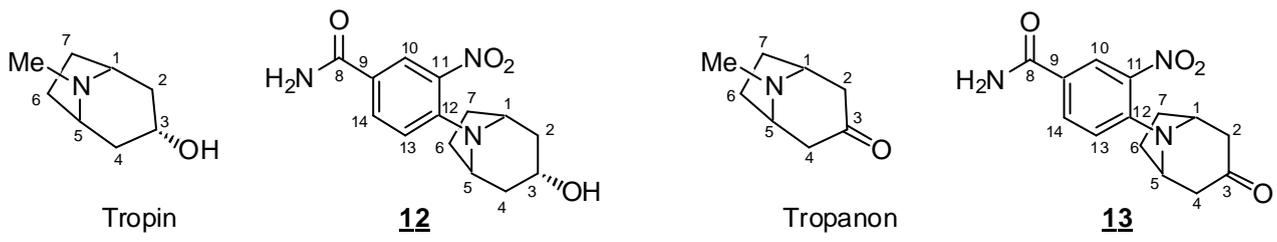
Bild 3.4.2 Immobilisierung von Nortropin und Oxidation der Hydroxy-Gruppe zum Keton

a) 4-Fluor-3-nitro-benzoesäure, HOBt, DIC, DMF 6 h. b) Nortropin, DMF, 6 h. c) PDC, DMF, 6 h. d) 1:1 TFA:DCM.

Nach einer vollständigen Acylierung des Rink-Linkers (s. oben) verlief die nucleophile Substitution durch Nortropin problemlos. Die chromatographische Analyse der Rohprodukte nach der Oxidation zeigte einen Hauptproduktpeak mit der erwarteten Molekülmasse in hoher Reinheit. Wegen des kleinen Massenunterschiedes zwischen Edukt und Produkt und den ähnlichen Retentionszeiten in der HPLC-Analyse war die Verfolgung der Reaktion mittels HPLC-MS Kopplung problematisch und es empfahl sich daher eine weitere Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie.

Dafür wurden die Synthesen in einem größeren Maßstab mit 300 mg Harz (0.15 mMol) durchgeführt. Die erhaltene Ausbeute betrug 20 mg (46%) **12** bzw. 28 mg (65%) für das Oxidationsprodukt **13**.

Eine Identifizierung von **12** und die Zuordnung seiner ^1H und ^{13}C Signale erfolgte mittels Spektrenvergleich mit literaturbekannten Substanzen (66). Die Identifizierung von **13** erwies hingegen als schwierig. Obwohl die HPLC-MS Analyse nach Aufreinigung ein sauberes Signal mit der erwarteten Masse als Hauptpeak zeigte, war eine Verdoppelung von mehreren Signalen in ^1H und ^{13}C NMR in deuteriertem Methanol zu beobachten. Es fanden sich jedoch genügend Hinweise für 100% Umsetzung des Alkohols zum Keton. Dies waren das Verschwinden der Signale von H-3 bei 4.7 ppm im ^1H -NMR Spektrum, die Abwesenheit von Signalen im C-OH Bereich (~60-75 ppm) sowie eine neues Signal im Carbonylbereich (209.7 ppm) im ^{13}C -NMR Spektrum. Zur endgültigen Zuordnung der ^{13}C -NMR Signale war ein Vergleich mit literaturbekannten Substanzen erforderlich. In Tabelle 3.4.1 werden die ^{13}C -Werte von **12** und **13** mit strukturell ähnliche Substanzen verglichen (66).



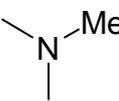
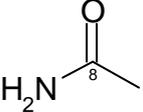
Kohlenstoff	<u>12</u>	Tropin	Tropanone	<u>13</u>	Δ ppm <u>13</u>
C-1, C-5	58,4	60,0	60,9	55,6; 56,5	0,9
C-2, C-4	35,1	39,6	47,6	35,8; 46,5	10,7
C-3	73,6	64,5	208,2	209,7	0
C-6	26,5	25,8	27,9	25,3; 27,0	1,7
C-7	26,5	25,8	27,9	25,3; 27,0	1,7
		40,4	38,4		
			208,2	209,7	
	169,8			170,0	
C-9	123,3			123,9	0
C-10	127,4			124,0; 125,1	0,1
C-11	137,8			140,1	0
C-12	143,4			144,5; 144,6	0,1
C-13	119,5			120,0; 119,3	0,4
C-14	133,3			133,7; 133,5	0,2
Lösungsmittel	D ₂ O	CDCl ₃	CDCl ₃	CD ₃ OD	

Tabelle 3.4.1 Vergleich der ¹³C NMR Verschiebungen von literaturbekannten Substanzen und 12 und 13

Die Zuordnung der Signale von 12 sind in Übereinstimmung mit den Daten von Tropin. Die Existenz von Gleichgewichten zwischen zwei Konformationen in ähnlichen Tropangerüsten wie in Substanz 13 sind literaturbekannt (87). Deswegen wurde zur Zuordnung der Signale von 13 angenommen, daß das Molekül in Methanol in zwei Konformationen vorliegt. Die Spalte Δ ppm in Tabelle 3.4.1 zeigt die verschiedenen Verschiebungen, die dieses Gleichgewicht für die ¹³C-NMR Signale der verschiedenen

Kohlenstoffe verursacht. Eine größere Verschiebung der Signale der C-2 und C-4 ist in Übereinstimmung mit dem im nächsten Bild vorgeschlagenen Gleichgewicht.

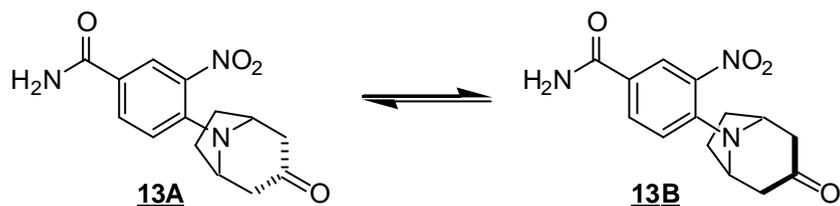


Bild 3.4.3 Vorgeschlagenes Gleichgewicht zwischen zwei Konformationen (hier A und B genannt) von Substanz **13** in Methanol

Die $^1\text{H-NMR}$ Analyse zeigte ein Konformerengemisch in einem Verhältnis von 1:0.6 (s. Bild 3.4.3). Eine Aussage zur Identität des Hauptkonformers war jedoch nicht möglich. Die Aufnahme von temperaturabhängigen $^1\text{H-NMR}$ Spektren sollte Klarheit bringen, doch in DMSO fand sich keine Duplizierung der Signale. Deswegen wurde auf weitere Untersuchungen zur Erklärung des Konformerengemisches von Substanz **13** in dieser Arbeit verzichtet.

3.4.3 Reduktive Aminierung des Tropanons

Da die reduktive Aminierung von Aldehyden und Ketonen in der Literatur gut beschrieben ist (88) und eine große Anzahl von Aminen kostengünstig zu beschaffen sind, sollte auf diese Weise die weitere Derivatisierung vorangetrieben werden.

Die Stereoselektivität der reduktiven Aminierung von Tropinon mit verschiedenen Aminen in Lösung wurde bereits in mehreren Arbeiten untersucht (91, 92, 93). Es wurde gezeigt, daß das Reduktionsmittel eine wesentliche Rolle bei der Stereoselektivität dieser Reaktionen spielt (94). Das „endo“ Isomer wurde als Hauptprodukt bei einer katalytischen Hydrierung (H_2 , PtO_2) (93) oder bei der Anwendung eines sterisch großen Hydrierungsreagenz wie $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (102, 103) erhalten. Eine Selektivität für das „exo“ Isomer wurde der Reduktion durch Natrium erzielt (93).

Die genannten Ergebnisse sollten zur Orientierung bei der Untersuchung von Methoden zur Kontrolle der Regioselektivität der reduktiven Aminierung von **13** dienen. Die zusätzliche Anwesenheit einer Aryl-Nitro-Gruppe, die mit starken Reduktionsmitteln reduziert werden kann, empfiehlt jedoch die Anwendung von milden Hydrierungsquellen wie

NaBH₃CN und NaBH(OAc)₃. Deswegen sollten mit Phenylethylamin als Modellamin Versuche mit beiden Hydridquellen durchgeführt werden. Bild 3.4.5 stellt das Reaktionsschema dar.

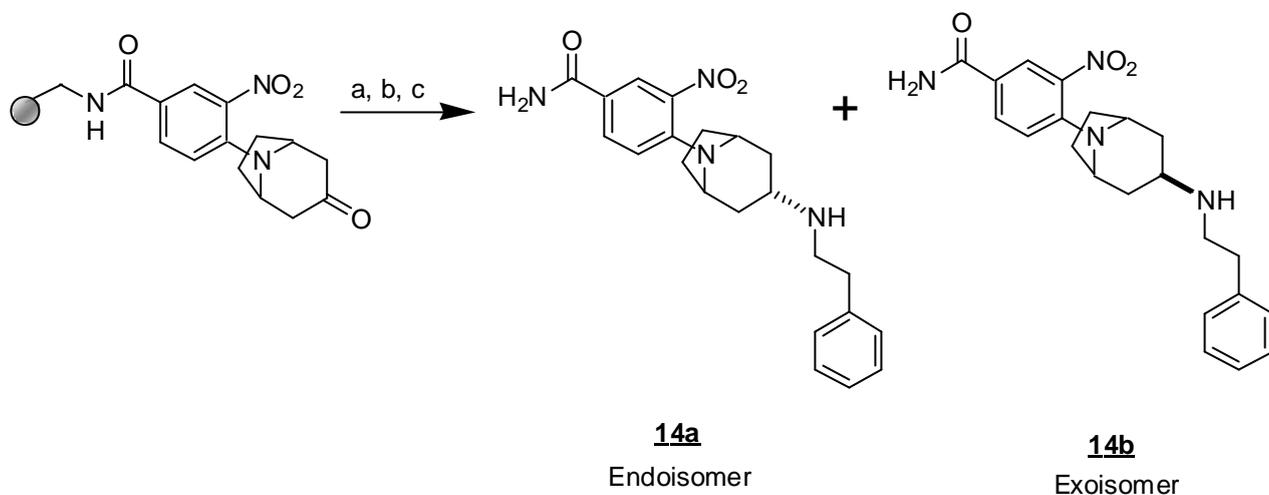


Bild 3.4.5 Darstellung verschiedener Stereoisomere von 14 mittels reduktiver Aminierung

a) Phenylethylamin, Molsieb, DCM, 6 h; b) Natriumcyanoborhydrid oder Natriumtriacetoxborhydrid, DCM, 16 h; c) 1:1 TFA:DCM, 30 min

Die HPLC-MS-Analyse der Rohprodukte beider Synthesen zeigt zwei Produktpeaks mit der erwarteten Masse, die den beiden Isomeren zugeordnet werden konnten (s. Bild 3.4.5). Zur Berechnung der Reinheit wurde die Peakfläche im UV Chromatogramm integriert. Diese Ergebnisse sind in nächster Tabelle 3.4.2 zusammengefaßt.

Hydrierungsreagenz	HPLC Reinheit der Isomerenpeaks		[M+H] ⁺ berechnet	[M+H] ⁺ gemessen	Isomerenverhältnis
	%				
	210 nm	270 nm			
Natriumcyanoborhydrid	64	79	395,5	395,2	~ 6:5
Natriumtriacetoxborhydrid	98	100	395,5	395,2	~ 9:1

Tabelle 3.4.2 HPLC Analyse der reduktiven Aminierungsreaktion mit zwei verschiedenen Hydrierungsreagenzien

In der Literatur wurde für NaBH(OAc)₃ im Vergleich zu NaBH₃CN eine höhere Selektivität zum endo-Produkt angegeben (91, 94). Daher wurde in dieser Arbeit angenommen, daß das erhaltene Hauptisomer bei der Synthese mit Natriumtriacetoxborhydrid das endo-Produkt sein sollte.

Bei der Synthese mit Natriumacetoxyborhydrid gelang die Isolierung des endo-Isomers mittels präparativer HPLC. Die Produkte der Synthese mit Natriumcyanoborhydrid wurden jedoch nicht in ihre Isomeren getrennt. Im folgenden sind die erhaltene $^1\text{H-NMR}$ Spektren dargestellt (Bild 3.4.6 und 3.4.7).

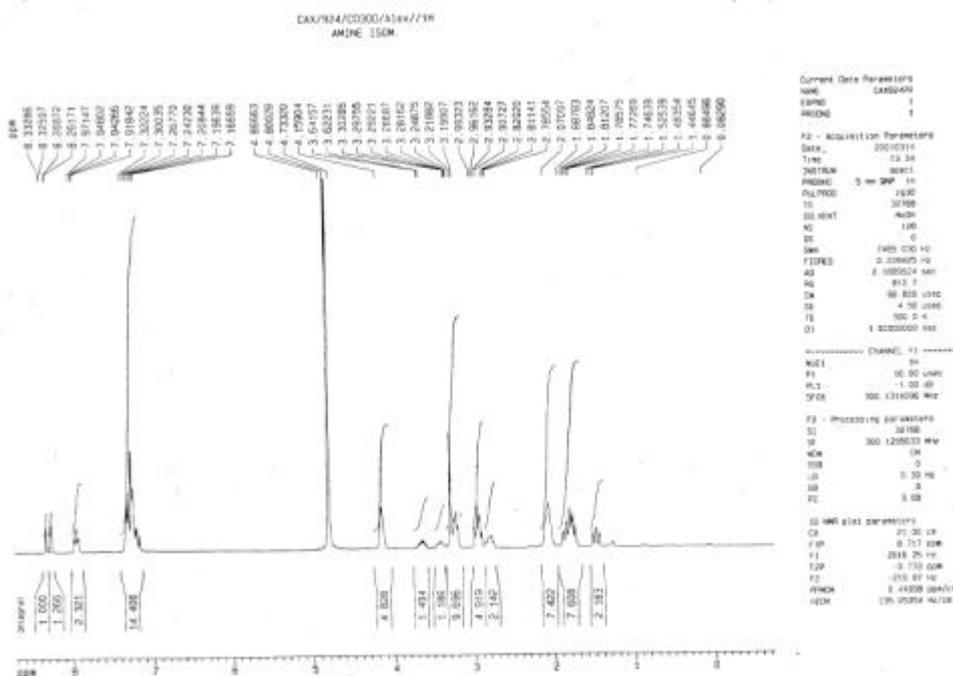


Bild 3.4.6 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des gewonnenen Isomeren Gemisch von **14** nach reduktiver Aminierung mit NaBH_3CN (s. Abb. 3.4.5)

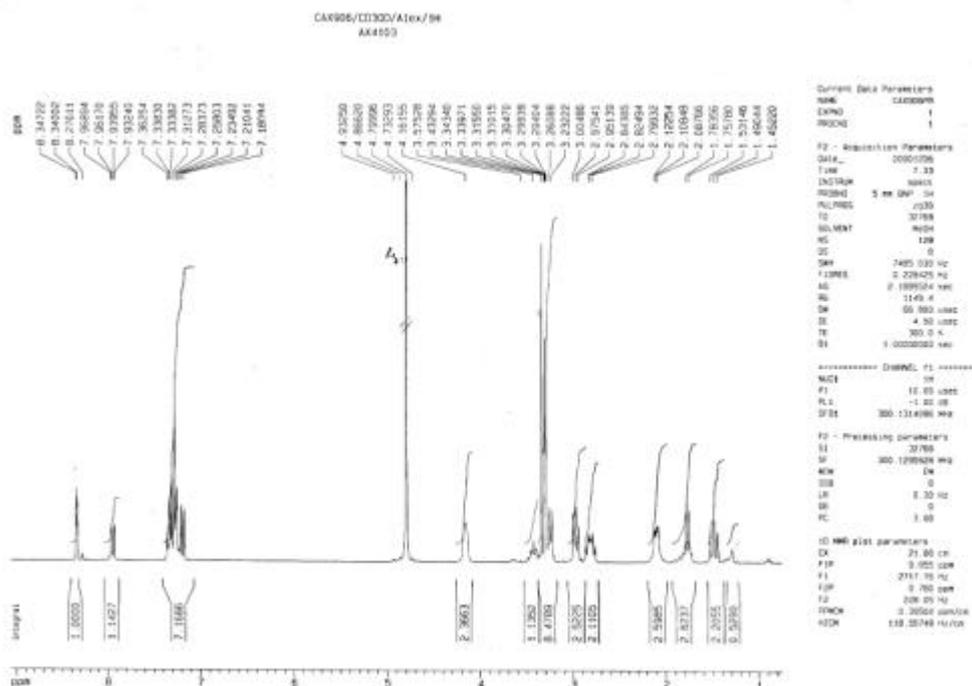


Bild 3.4.7 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des gewonnenen endo- Isomer **14a** nach reduktiver Aminierung mit $\text{NaBH}(\text{AcO})_3$ (s. Abb. 3.4.5)

Aus den Literaturdaten (91, 92) und den aufgenommenen 2D-NMR Spektren konnte das H-3 Proton des endo-Produktes eindeutig identifiziert werden ($\delta = 3.6$ ppm). Das Integrationsverhältnis ergab 1:0.9 = endo/ exo (s. Bild 3.4.6), was in Übereinstimmung mit dem Verhältniss der Peakfläche der UV-Absorption in der HPLC-Analyse war.

3.4.4 Variierung der Aminkomponente

Unter analogen Reaktionsbedingungen wurden 14 Amine parallel umgesetzt. Tabelle 3.4.3 stellt die Ergebnisse der HPLC-MS-Analyse nach Abspaltung der Syntheseprodukte dar.

<u>Amin</u>	HPLC		HPLC		[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	Isomeren	
	Reinheit		Konversion		berechnet	gemessen	Verhältnis	
	%		%		M/z	m/z	%	
	210	270	210	270			210	270
	nm	nm	nm	nm			nm	nm
1. Butylamin	82	74	88	87	347,4	347,2	100	100
2. Cyclopropylamin	94	85	100	100	331,4	331,1	86	85
3. Allylamin	83	72	90	89	331,4	331,1	92	91
4. Phenethylamin	86	80	93	94	395,5	395,2	89	85
5. Benzylamin	65	65	100	100	381,5	381,2	81	72
6. 4-Methylbenzylamin	84	76	91	92	395,5	395,2	89	83
7. 4-Fluorbenzylamin	94	82	100	100	399,5	399,2	90	86
8. 4-Methoxybenzylamin	92	82	100	100	411,5	411,2	89	85
4-Trifluormethylbenzylamin	90	67	97	97	449,5	449,2	85	80
5. (R)-(+)-1-(1-Naphthylamin	45	41	66	78	445,6	445,2	73	63
6. (S)-(-)-1-(1-Naphthylamin	46	46	58	70	445,6	445,2	83	72
7. Anilin	26	31	28	37	367,4	367,1	100	100
8. Piperidin	10	14	11	17	359,5	359,2	50	69
9. Morpholin	25	24	30	33	361,4	361,2	65	64

Tabelle 3.4.3 HPLC-MS-Analyse nach Variierung der Amine bei der reduktiven Aminierung von

Die Reaktionen mit primären Aminen verliefen in sehr guten Ausbeuten. Die Isomerenverhältnisse waren in Übereinstimmung mit dem gewonnenen Ergebnis aus der Reaktion mit Phenylethylamin und lagen zwischen 8:2 - 9:1. Im Fall von Butylamin und Anilin wurde jedoch nur ein Produktpeak detektiert.

Sterische Hinderung wurde als Grund für die geringere Ausbeute der verzweigten Amine ((R)-(+)-1-(1-Naphthylethylamin) und (S)-(-)-1-(1-Naphthylethylamin) angenommen. Die Anwendung von chiralen primären Aminen hatte wenig Einfluß auf das Isomerenverhältnis. Die schlechte Nucleophilie des Stickstoffs im Anilin verhindert möglicherweise die Bildung des Imin-Zwischenproduktes. Mit sekundären Aminen waren geringere Ausbeute und Stereoselektivität deutlich erkennbar. Eine sterische Hinderung bei der Bildung des Imin-Zwischenproduktes könnte dies erklären.

3.4.5 Acylierung von sekundären Aminen am Tropangerüst

Im Rahmen dieser Arbeit erschien es interessant, die Reaktivität der resultierenden neuen funktionellen Gruppe im Nortropinderivat für die Herstellung einer größeren Anzahl an Derivaten zu prüfen. Es sollten Reaktionen mit Säurechloriden und Isocyanaten an den bereits im vorherigen Abschnitt gewonnenen Substanzen durchgeführt werden. Als Modellsubstanz wurde das Produkt der reduktiven Aminierung mit Benzylamin verwendet (s. Abb. 3.4.5 u.Tab. 3.4.3 Position 5).

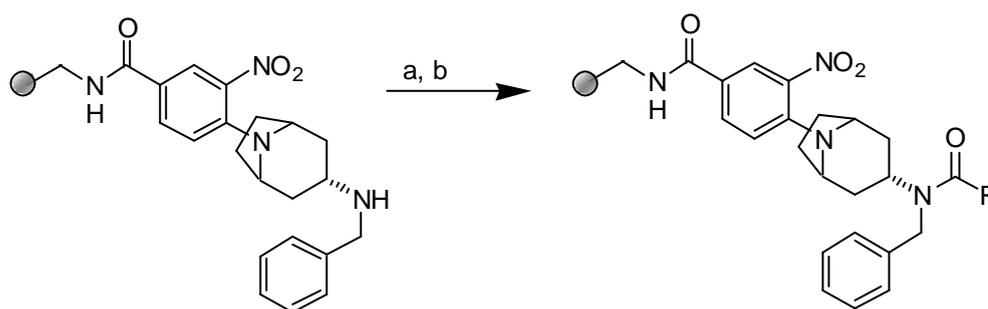


Bild 3.4.6 Acylierung mit verschiedener Acylierungsreagenzien

a) Säurechlorid oder Isocyanat, Diisopropylamin, DCM, 6 h. b) 1:1 TFA: DCM

Zur Durchführung der parallelen Acylierung wurde das Produkt der reduktiven Aminierung in parallelen Reaktionsansätzen mit 17 verschiedenen Reagenzien umgesetzt.

Acylierungsreagenz	HPLC		HPLC		Isomeren-		[M+H] ⁺	[M+H] ⁺
	Reinheit %		Konversion		verhältnis		berechnet	gemessen
			%	%	%	%	m/z	m/z
<u>R</u>	270	210	270	220	270	220	m/z	m/z
	nm	nm	nm	nm	nm	nm		
<u>Säurechloride</u>								
1. Acetylchlorid	100	92	100	100	83	84	424,8	425,1
2. 2,4, Difluorobenzoylchlorid	86	89	97	93	84	84	522,5	523,7
3. Phenyllessigsäurechlorid	58	52	92	90	-	-	500,6	501,6
4. Methoxyessigsäurechlorid	100	94	100	100	88	85	454,5	455,4
5. Phenoxyacetylchlorid	88	85	100	100	-	-	516,6	517,8
6. Diphenylacetylchlorid	3	14	3	16	-	-	576,6	578,2
7. Benzyloxyessigsäurechlorid	90	77	100	100	-	-	530,6	531,8
8. Acetoessigsäurechlorid	60	60	100	100	88	87	482,5	513,7
9. Menthoessigsäurechlorid	88	85	92	94	89	84	578,7	580,3
10. 2-Thiopheneacetylchlorid	88	90	93	96	89	85	506,6	507,6
11. Cyclobutancarbonsäurechlorid	100	64	100	100	-	-	464,5	465,4
12. trans-Zimtsäurechlorid	87	84	87	90	85	85	512,6	513,7
13. Nicotinsäurechlorid	94	92	100	100	88	86	523,0	
<u>Isocyanate</u>								
14. Phenylisocyanat	93	96	97	96	90	89	501,6	502,6
15. 3-(Trifluormethyl)- phenylisocyanat	92	92	97	98	89	85	569,6	571
16. 3-Cyanophenylisocyanat	74	75	94	98	90	82	526,6	527,7
17. Adamantylisocyanat	76	76	95	97	91	91	558,7	561

Tabelle 3.4.3 HPLC- Analyse nach Variierung der Acylierungsreagenzien bei der Acylierung von Festphasen-gebundenen 14

Bis auf Diphenylacetylchlorid (Position 6) verliefen alle Reaktionen glatt und mit hohen Ausbeuten. Die Reaktion änderte das Isomerenverhältnis nicht.

3.4.6 Reduktion der Nitro-Gruppe und Testung verschiedener Acylierungsreagenzien

Die Anwesenheit der Nitrogruppe im aromatischen Fluoro-substituierten Ring aktiviert das System für die nucleophile Substitution durch Nortropin. Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch die Möglichkeit der selektiven Derivatisierung des Moleküls an dieser funktionellen Gruppe untersucht werden.

Die Umwandlung der aromatischen Nitro-Gruppe unter milden Bedingungen durch Reduktion mit SnCl_2 ist für die Festphasensynthese von 1,4-Benzodiazepin-2,5-dionen und Naturstoff- beziehungsweise Wirkstoffanaloga wie Balanol oder Lavendustin A beschrieben (13, 73, 74, 80). Die Reaktion sollte die selektive Derivatisierung von **13** durch Reduktion der Nitro-Gruppe und anschließende Acylierung des resultierendenamins gewährleisten. Die Reaktionsgleichung ist in Bild 3.7.1 dargestellt.

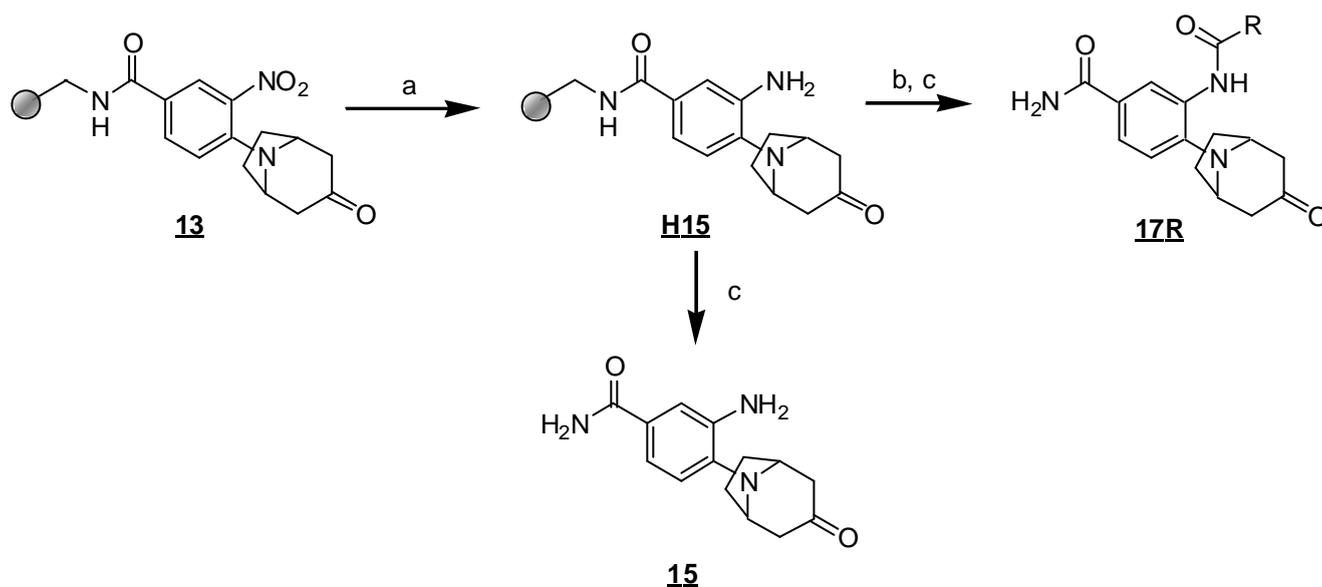


Bild 3.7.1 Reduktion der Nitrogruppe des festgebundenen **13** und Herstellung des Anilins **15**.

a) 0,2M SnCl_2 in DMF, 6 h; b) 0,4M Acylierungsreagenz in DCM, 6 h; c) 1:1 TFA: DCM, 30 min

Nach Reduktion der Nitrogruppe zeigte das HPLC Profil des Rohproduktes **15** ein Signal (85% Reinheit) mit $t_{\text{R}} = 7.8$ min und Masse 260.1 ($\text{M} + \text{H}^+$). Die ^1H - und ^{13}C -NMR Untersuchung zeigten, dass die Keto-Gruppe während dieser Reaktion erhalten blieb (s. 4). Die Ergebnisse der HPLC-MS-Analyse nach der Acylierung mit verschiedenen Säurechloriden und Isocyanaten sind in Tabelle 3.4.4 zusammengefasst.

Acylierungsreagenz	HPLC		HPLC		[M+H] ⁺ _{ber}	[M+H] ⁺ _{gem}
	Reinheit		Konversion			
<u>R</u>	270	210	270	220		
<u>Säurechloride</u>						
1. Acetylchlorid	61	61	83	88	303,6	303,2
2. 2,4, Difluorobenzoylchlorid	75	65	90	90	401,4	402,0
3. Phenylessigsäurechlorid	72	66	96	97	379,4	379,8
4. Methoxyessigsäurechlorid	90	83	90	91	333,3	333,5
5. Phenoxyacetylchlorid	86	79	94	95	395,4	395,9
6. Diphenylacetylchlorid	21	15	23	42	455,5	456,4
7. Benzyloxyessigsäurechlorid	90	75	97	97	409,4	410
8. Acetoessigsäurechlorid	42	41	87	90	361,3	361,6
9. Menthoessigsäurechlorid	89	93	92	93	457,6	458,5
10. 2-Thiopheneacetylchlorid	68	74	73	82	385,4	385,8
11. Isonicotinoyl chlorid hydrochlorid	87	87	97	100	366,3	366,6
12. Trans-Zimtsäurechlorid	24	18	46	36	391,4	391,9
13. Nicotinsäurechlorid	80	75	97	100	367,3	366,6
<u>Isocyanate</u>						
14. Phenylisocyanat	24	22	49	45	379,4	380,9
15. 3-(Trifluormethyl)- phenylisocyanat	70	50	77	70	447,4	449,2
16. 3-Cyanophenylisocyanat	9	14	15	24	404,4	406
17. Adamantylisocyanat	3	5	3	6	437,6	439,3

Tabelle 3.4.4 Chromatographische Analyse nach Variierung des Acylierungsreagenz bei der Acylierung von festgebundenem 15

Die Mehrheit der getesteten Acylierungs-reagenzien ergaben Produkte mit meist hohen Ausbeuten. Ausnahmen bildeten von 3-Cyanophenylisocyanat und Adamantylisocyanat.

In dieser Arbeit gewonnene Ergebnisse über die Festphasensynthese und Analyse an Nortropinderivaten vereinfachten die Herstellung und Untersuchung der in diesem Teil vorgestellten Synthesewege zu einer großen Anzahl an Nortropinderivaten. Die Herstellung

von neuartigen N-Aryl Nortropinderivaten ist mittels nucleophiler Substitution von Nortropin an Festphasen-gebundenen 4-Fluoro-3-Nitrobenzoesäure und nachfolgender Derivatisierung möglich. Die Untersuchungen führten zur Beobachtung von zwei Konformationen von 3-Amid-2-Nitro-Aryl-N- Nortropanon (**13**) in Methanol. Die reduktive Aminierung dieser Substanz mit primären Aminen führte zu endo- und exo- Isomeren. Eine selektive Herstellung der endo- Isomere im 9:1 Verhältnis zum endo-Isomer konnte durch die Auswahl eines sterisch anspruchsvollen Hydrierungsreagenzes erhalten werden. Das Produkt der Reduktion mit Benzylamin wurde erfolgreich mit mehreren Säurechloriden und Isocyanaten acyliert. Eine weitere chemische Variabilität der Struktur **13** wurde durch die Reduzierung der Nitro-Gruppe erzielt. Das resultierende Amin konnte wiederum mit mehreren Säurechloriden und Isocyanaten acyliert werden.

3.5 Synthese von Naturstoff-Hybriden und makrozyklische Derivaten

3.5.1 Einleitung

Die Beeinflussung der Wechselwirkung von Makromolekülen (z. B. Protein-Protein Wechselwirkungen) durch niedermolekulare Verbindungen (z. B. FBK, Rapamycin) ist in letzter Zeit in der Literatur von besonderem Interesse (97, 98). Derartige Substanzen enthalten in ihrer Struktur häufig mehrere Pharmakophore, die mit verschiedenen Erkennungsorten der verschiedenen Makromoleküle wechselwirken (97, 98). In manchen Fällen erlaubt eine zyklische Struktur der Substanz die optimale dreidimensionale Platzierung der verschiedenen Pharmakophore, was die Fähigkeit der Moleküle zur Hemmung der makromolekularen Interaktion verbessert (20). Die Synthese von Molekülen nach dem Vorbild dieser bekannten Strukturen kann zur Auffindung von Wirkstoffen mit ähnlichen Wirkmechanismen und zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Makromolekülen beitragen. Aus diesem Grund ist für die Wirkstoffsuche die Parallelsynthese von makrozyklischen Substanzen, die mehrere Pharmakophore enthalten, interessant (20, 99-101).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Kopplung verschiedener Naturstoffe zu einem Molekül und die Synthese von Makrozyklen mit einem Naturstoff als zentralen Element durchgeführt werden. Die Konzipierung eines allgemeinen Synthesewegs für die Synthese von Naturstoffhybriden und Makrozyklen sollte aus praktischen Gründen im Vordergrund stehen.

3.5.2 Einführung einer Verzweigungsstelle nach dem chemischen Marker

Zur Lösung sollte die Einführung einer Verzweigungsstelle hinter dem chemischen Marker dienen. Diese Verzweigungsstelle sollte in mindestens zwei verschiedenen Richtungen selektiv derivatisierbar sein, um die Synthese von Hybriden und Makrozyklen zu vereinfachen. Die Anwesenheit der chemischen Marker im Molekül sollte die Miniaturisierung der Ansätze und eine Automatisierung bei der Synthese und Optimierung der Reaktionsbedingungen ermöglichen. Die Strategie ist im folgenden Bild graphisch dargestellt.

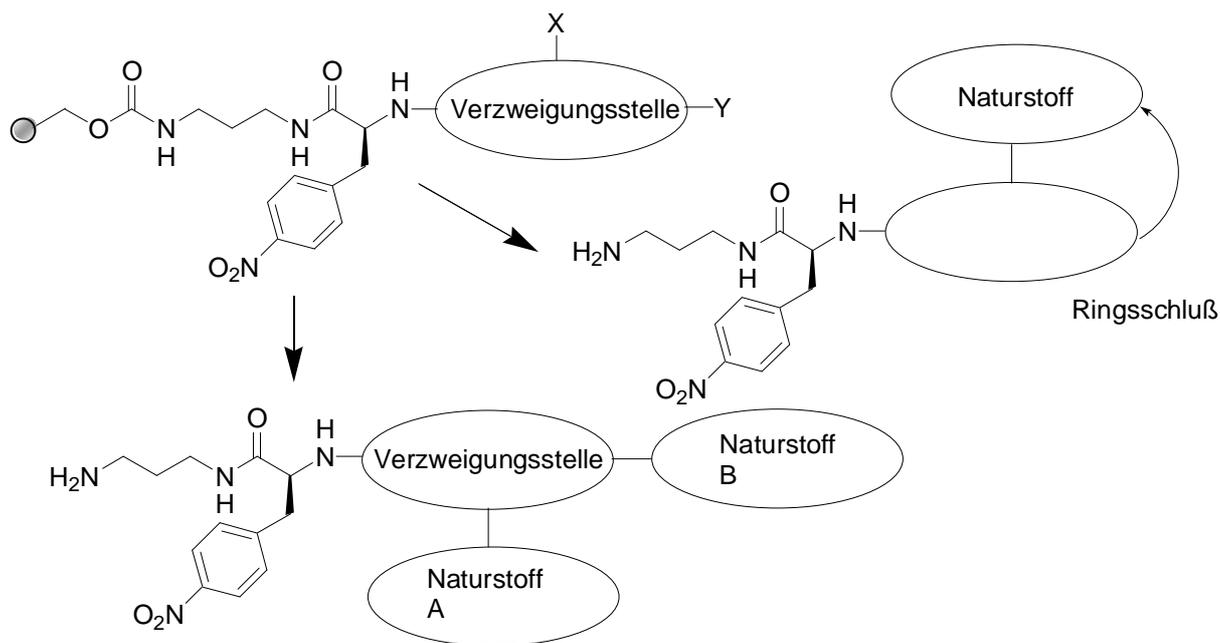


Bild 3.5.1 Allgemeine Synthese von Naturstoffhybriden und makrozyklischen Derivaten

Ähnliche Strategien werden in der Peptid-Chemie zur Darstellung von zyklischen und verzweigten Peptiden verwendet (20). Als Verzweigungsstelle kommen häufig Aminosäuren mit reaktiven Gruppen an der Seitenkette wie zum Beispiel Lysin, Serin, Cystein, Glutamat, Aspartat und Asparagin zum Einsatz (20). Eine Vielfalt an Schutzgruppen wurde entwickelt, die diese reaktiven Gruppen während der verschiedenen Syntheseschritte schützen (52).

Als Verzweigungsstelle wurde in dieser Arbeit geschütztes Lysin ausgewählt. Eine Abspaltung der Schutzgruppe an der Seitenkette setzt dann eine Amino-Gruppe frei, die wiederum eine Vielzahl an chemischen Umsetzungen eingehen kann (s. 3.2).

Als Schutzgruppe für den ϵ -Stickstoff wurde die säurelabile Methyltrityl Gruppe ausgewählt (53, 101). Die Mechanismen der Abspaltung vom Wang-Linker und von der Methyltrityl-Gruppe sind sehr ähnlich, da beide mittels Bildung eines stabilen Kations unter Säurebedingungen (50% bzw. 1% TFA) ablaufen. Die Reaktionsbedingungen im Syntheseweg konnten dann durch die Schutzgruppenauswahl eingegrenzt werden, was potentielle nicht erwünschte Umsetzungsmöglichkeiten in Entschützungsritten während des Moleküleinbau möglichst vermeiden sollte. Die Einführung der Aminosäure Fmoc-Lys(Mtt)-OH als Verzweigungsstelle sollte nach Synthese eines chemischen Markers stattfinden.

Im folgenden Schema wird die Struktur des in dieser Arbeit verwendeten Gerüsts für die Synthese von Naturstoffhybriden und Makrozyklen dargestellt.

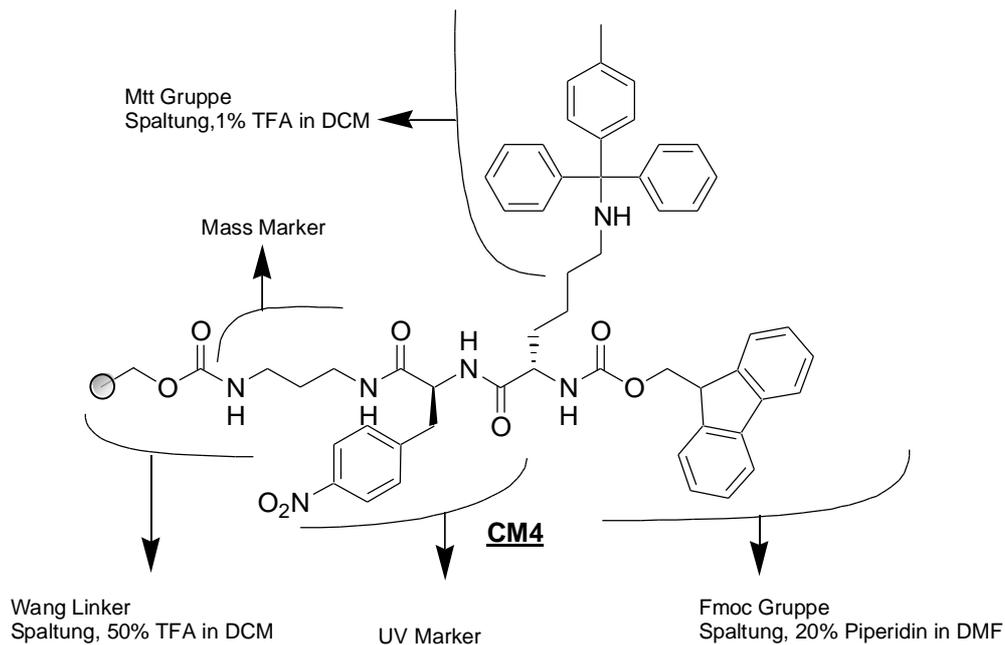


Bild 3.5.2 Gerüst zur allgemeinen Synthese von Naturstoffhybriden und makrozyklischen Derivaten

Bei der chromatographischen Analyse des Produktes nach Abspaltung vom Harz sollte beachtet werden, daß die Reaktionsbedingungen für die Abspaltung vom Wang- Linker auch die Entschützung des γ -Stickstoffs verursacht. Daher wurden zwei UV-absorbierende Produkte nach dieser Reaktion erwartet. Dies wird in folgender Reaktionsgleichung dargestellt.

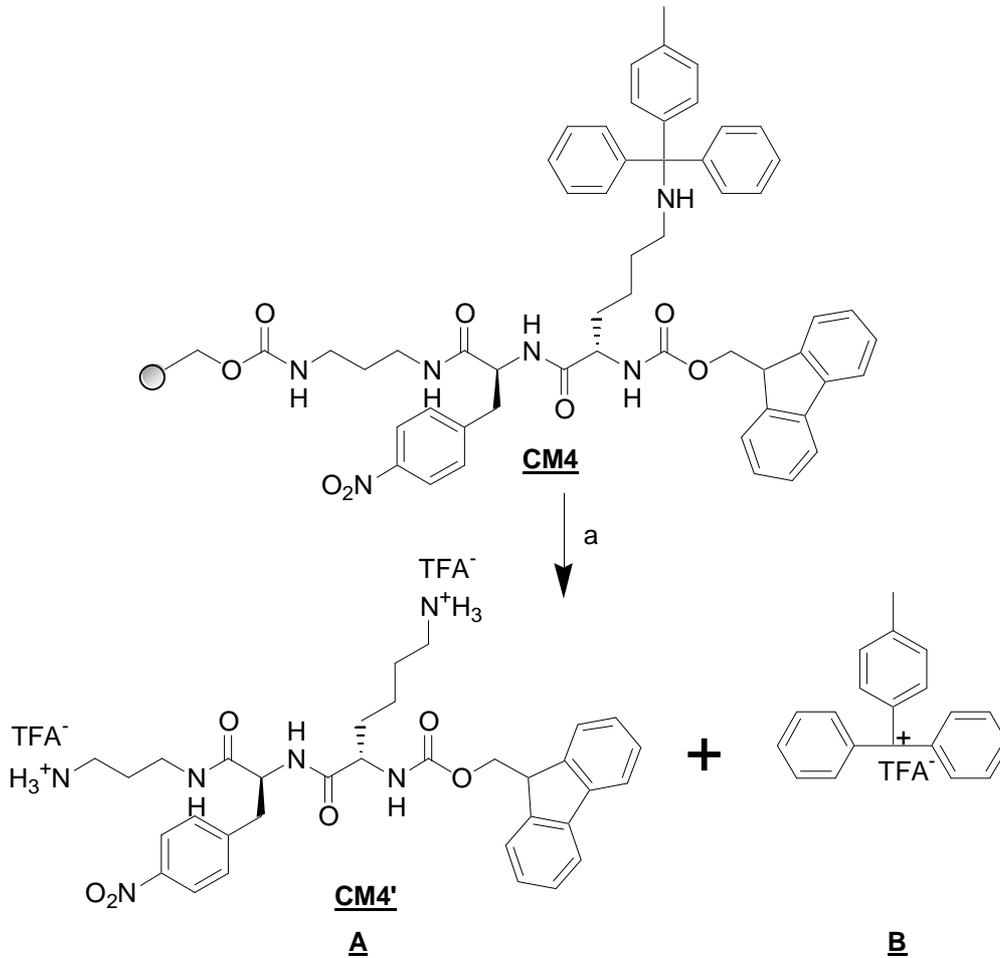


Bild 3.5.3 Abspaltungsprodukte des chemischen Markers- Fmoc-Lys(Mtt) Adukt

a) TFA/DCM 1:1 30 min

Die Ergebnisse der HPLC-MS-Analyse nach der Spaltreaktion sind in folgender Tabelle zusammengefasst. Die Untersuchung der Massenspektren erlaubte die Zuordnung von Peaks 1 und 2 als Fragment A beziehungsweise Fragment B (s. Bild 3.5.3).

Peak	t_R min	HPLC Reinheit %		$[M+H]^+$ _{APCI} gemessen
Fragment A	17,6	270 nm	210 nm	619,7
Fragment B	23,8	5	15	257,0

Tabelle 3.5.1 HPLC-MS- Analyse der Abspaltungsprodukte nach Kopplung von Fmoc-Lys(Mtt)-OH am chemischen Marker

Der colorimetrische Test auf Anwesenheit von Aminen und die chromatographische Analyse nach der Abspaltung waren genügend Hinweise für die Bildung des erwünschten Produktes am Harz. Für die Anwendung dieses Gerüsts zur Synthese von Naturstoff-hybriden und Makrozyklen sollte die selektive Beseitigung beider Schutzgruppen ohne Abspaltung des ganzen Moleküls vom Linker durchgeführt werden.

Die selektive Abspaltung der Fmoc- und Mtt-Gruppe ist in verschiedenen Arbeiten beschrieben (102, 103). Die Stabilität der Carbamat-Bindung am Wang-Linker unter den Abspaltungsbedingungen der Fmoc-Gruppe (20% Piperidine in DMF) ist seinerseits auch aus der Literatur bekannt (26, 48).

Die Abspaltung der Mtt- Gruppe vom Harz sollte durch das Verschwinden seiner charakteristischen Peaks bei der chromatographischen Analyse der Abspaltungsprodukte verfolgt werden (s. Bild 3.5.3 und Tabelle 3.5.1). Ein möglicher Verlust an Substanz durch der verfrühte Abspaltung vom Wang-Linker während der Beseitigung der Mtt-Gruppe konnte durch die quantitative Bestimmung der Fmoc-Gruppen am Harz detektiert werden.

Die Abspaltung der Mtt-Gruppe wurde nach in der Literatur beschriebenen Prozeduren durchgeführt (101, 103). Danach zeigte die Quantifizierung der Fmoc-Gruppen am Harz dass kein wesentlicher Verlust an Substanz am Harz stattfand. Das Verschwinden des Mtt-Peaks (Fragment **B**, Bild 3.5.3) nach HPLC-MS Analyse der Abspaltungsprodukte zeigte die vollständige Beseitigung der Mtt-Gruppe vom Harz.

3.5.3 Synthese von einem Naturstoff Hybrid¹

Die Abspaltung der Fmoc- oder Mtt-Gruppe vom vorgestellten Gerüst setzt selektiv eine Amino- Gruppe im Molekül frei. Die bisher gewonnenen Ergebnisse über die Immobilisierung von verschiedenen Naturstoffen an der Amino-Gruppe des chemischen Markers konnten deswegen für die Synthese von Naturstoffhybriden auf dieses Gerüst übertragen werden (s.3.2).

¹ Das Wort Naturstoff-Hybrid wird im Sinne von einer künstlichen niedermolekularen Verbindung, wo zwei oder mehrerer Sekundärmetaboliten kovalent gebunden sind.

Um diese Übertragbarkeit zu illustrieren, sollte die Synthese eines Naturstoff- Hybrids durchgeführt werden. Die Synthese eines solchen Hybrid, in dem die Kopplung der verschiedenen Naturstoffe unter verschiedenen Reaktionsbedingungen verläuft, ist besonders interessant, da in diesem Fall die chemische Variabilität des Gerüsts breiter untersucht werden kann. Die Synthese eines Nortropin-Progesteron-Derivates wurde in diesem Rahmen nach dem folgenden Synthese-Schema durchgeführt.

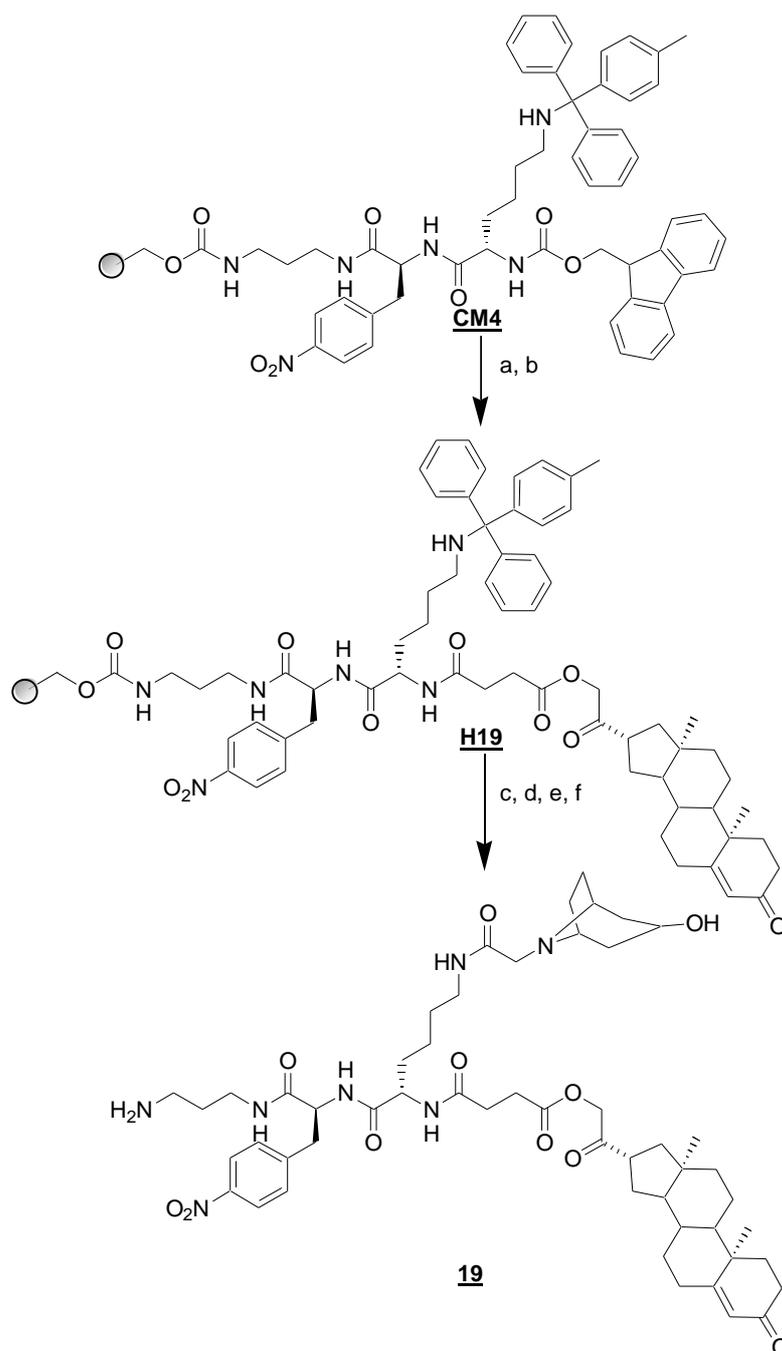


Bild 3.5.4 Synthese eines Naturstoffhybrids aus Nortropin und einem Progesteronderivat

a) 20% Piperidin in DMF, 1 h; b) 21-Hydroxyprogesteronhemisuccinat, HOBT, DIC, 4-DMAP, DMF, 6 h; c) 1% TFA 5% TIS in DCM, 5 mal 5 min; d) Bromessigsäure, DIC, DMF, 6h; e) Nortropin, DMF, 16 h; f) 1:1 TFA: DCM 30 min

Für die Immobilisierung beider Naturstoffe an diesem Gerüst wurden die gleichen Reaktionsbedingungen wie oben verwendet (s.3.2). Die Synthese wurde in einem kleinen Maßstab durchgeführt (s. 4). Die Ergebnisse der HPLC-MS Analyse des Rohproduktes sind in folgender Tabelle vorgestellt.

Substanz	HPLC		$[M+H]^+$	$[M+H]^+$ APCI
	Reinheit		berechnet	gemessen
	%			
	270	210		
19 Nortropin-Progesteron Hybrid	62	85	975,2	974,5

Tabelle 3.5.2 HPLC-MS Analyse des Nortropins-Androsteron Hybrid

Die HPLC-MS Analyse lieferte ausreichend Hinweise für die Bildung des erwarteten Produktes. Ein weiter Strukturbeweis der Struktur von **19** waren die in dieser Arbeit gewonnene Ergebnisse über die Festphasen Immobilisierung beider Naturstoffe (s. 3.2.2 und 3.2.4).

3.5.4 Synthese eines makrozyklischen Nortropin Derivats

In diesem Abschnitt sollte die Einführung und Derivatisierung eines Naturstoffes nach der Verzweigungsstelle ein geeignetes Substrat für eine intramolekulare Makrozyklisierung (s.3.5 und Ref: 20, 21) auf der festen Phase liefern. Die Anwesenheit des chemischen Markers im Molekül wurde auch in diesem Abschnitt für analytische Zwecke genutzt. Die bisher in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse über die Immobilisierung und Festphasen-Derivatisierung von Naturstoffen sollte die Herstellung dieses Substrates vereinfachen.

Die Immobilisierung des Naturstoffes Nortropin sollte deswegen in diesem Gerüst analog zu der Immobilisierung am chemischen Marker im Kapitel 3.2 stattfinden. Dafür sollte die Derivatisierung des Gerüsts ein geeignetes Substrat für eine nucleophile Substitution am Stickstoff des Nortropins liefern. Nach der Immobilisierung des Nortropins fehlt für die Makrozyklisierung noch eine freie Carboxy-Gruppe. Aus der im Laufe dieser Arbeit gewonnenen Erfahrung bot sich zur Generierung dieser Funktionalität die Umsetzung der freien Hydroxy-Gruppe des Nortropins mit einem zyklischen Anhydrid als beste Methode an.

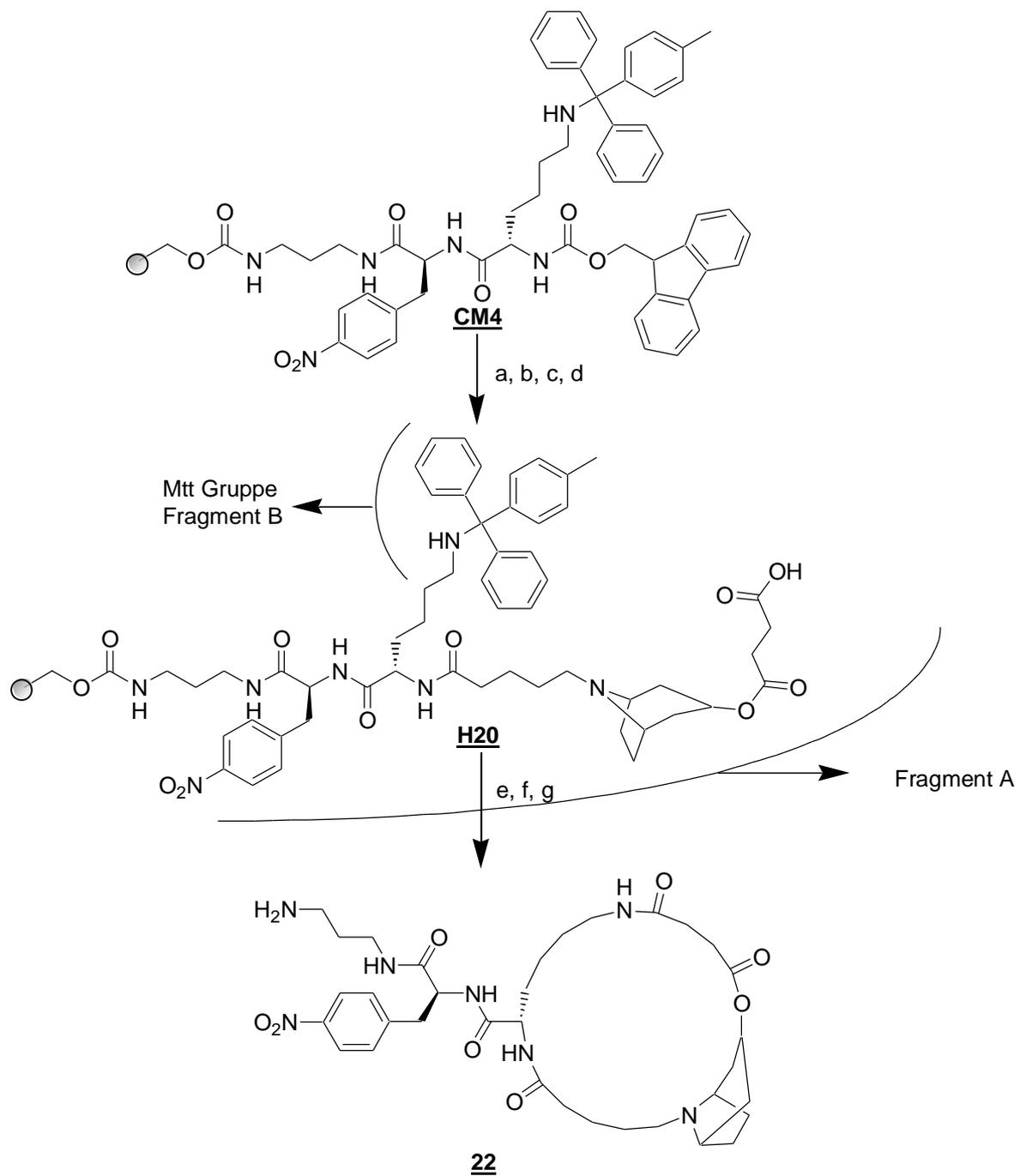


Bild 3.5.5 Synthese des Substrates und Makrozyklisierungsreaktion eines Nortropinderivat

a) 20% Piperidin in DMF, 1 h. b) 5-Bromvaleriansäure. HOBt, DIC, 6 h. c) Nortropin, DMF, 6 h. d) Bernsteinsäureanhydrid, 4-DMAP, Pyridin, 6 h. e) 1% TFA 5% TES in DCM 5* 5min (Mtt-Abspaltung) f) BOP, HOBt, DIPEA 6 h. g) 1:1 TFA:DCM 30 min

Damit die vorgestellte Synthesesequenz zu einem optimalen Substrat für eine Zyklisierungsreaktion führt, sollte in diesem Fall auch das Polymer optimiert werden. Es ist literaturbekannt, daß die Natur und Beladung des angewendeten Harzes einen sehr großen Einfluß auf die Ausbeuten der Zyklisierungsreaktionen von Peptiden am Harz hat (17, 104).

Es wurde daher ein niedriger beladenes Tentagel-Harz als polymerer Träger ausgewählt (s.1 und ref: 17, 20, 21, 24).

Die ausgewählten Reaktionsbedingungen folgten den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen. Nach Abspaltung der Fmoc Gruppe wurde der chemischer Maker mit Bromvaleriansäure mittels Amid-Bindung derivatisiert. Nortropin wurde nachdem am Gerüst durch nucleophile Substitution immobilisiert (s 3.2.4). Die Synthesen zunächst wurden in kleinem Maßstab durchgeführt (s. 4). Die nächste Tabelle stellt die Ergebnisse der HPLC-MS-Analyse nach Synthese des Substrates für die Makrozyklisierungsreaktion dar. Die Abspaltung des Harzes produzierte zwei Produkte. Das linear Nortropinderivat (Fragment A) und die Mtt- Gruppe (Fragment B) (s. Bild 3.5.5).

Peak	HPLC		t_R min	$[M+H]^+$ berechnet	$[M+H]^+$ _{APCI} gemessen
	Reinheit				
	%				
	270n	210n			
	m	m			
Fragment A	80	46	18,8	704,9	704,3
Fragment B	7	45	38,4	257,4	257,0

Tabelle 3.5.3 HPLC-MS Analyse der Reaktion vor dem Makrozyklisierungsschritt

Es wurden keine Nebenprodukte detektiert, was für eine erfolgreiche Synthese von 1 sprach. Die Entschützung der γ -Aminogruppe des Lysins durch Abspaltung der Mtt-Gruppe sollte als nächster Schritt zu einer anschließende intramolekulare Peptidbindung unter Bildung eines Makrozyklus herangezogen werden.

Die Abspaltung der Mtt-Gruppe wurde wie im vorherigen Abschnitt durchgeführt (s.3.5.3). Als Aktivierungsreagenz für die Amidbildung im letzten Schritt wurde Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphat (BOP) ausgewählt (19).

Nach Abspaltung der Mtt- Gruppe und Durchführung der Makrozyklisierungsreaktion ist der Chloranil-Test negativ. Das war ein Hinweis für eine vollständig Reaktion aller Amino-Gruppen (87).

Die HPLC-MS-Analyse der Produkte nach Synthese von **H20** und Abspaltung vom Harz zeigte die vollständige Abspaltung der Mtt-Gruppe (s. Tabelle 3.5;3: Fragment B um

$t_R=38.4$ min) und Umsetzung der Makrozyklisierungssubstrate (s. Tabelle 3.5.3: Fragment C um $t_R= 18.8$) durch das Verschwinden beider Peaks. Das Vorhandensein eines Peaks ($t_R= 19,2$ und $[M+H]^+= 686,8$) war typisch für diese Makrozyklisierung und spiegelt die Bildung von 22 wieder. Das Vorhandensein einer Gruppe kleiner Peaks mit ähnlichen Reaktionszeiten nach dem Produkt Peak war typisch für eine Makrozyklisierung, da auch bedeutsame Polymerisierung stattfindet. Deswegen wurden von dieser Synthese mäßige Ausbeuten erwartet (20).

Trotzdem wurde die Synthese in größerem Maßstab durchgeführt. Leider waren die Ausbeuten der Reaktion sehr gering (etwa 1%) und somit war nur die Gewinnung von 1 mg Substanz möglich. Hochauflösende Massenspektroskopie sprach für die Bildung des erwarteten Produktes (Mass: 686.39099 u ($? = -3.2$ mmu) $C_{34}H_{52}N_7O_8$) (Bild 3.5.6).

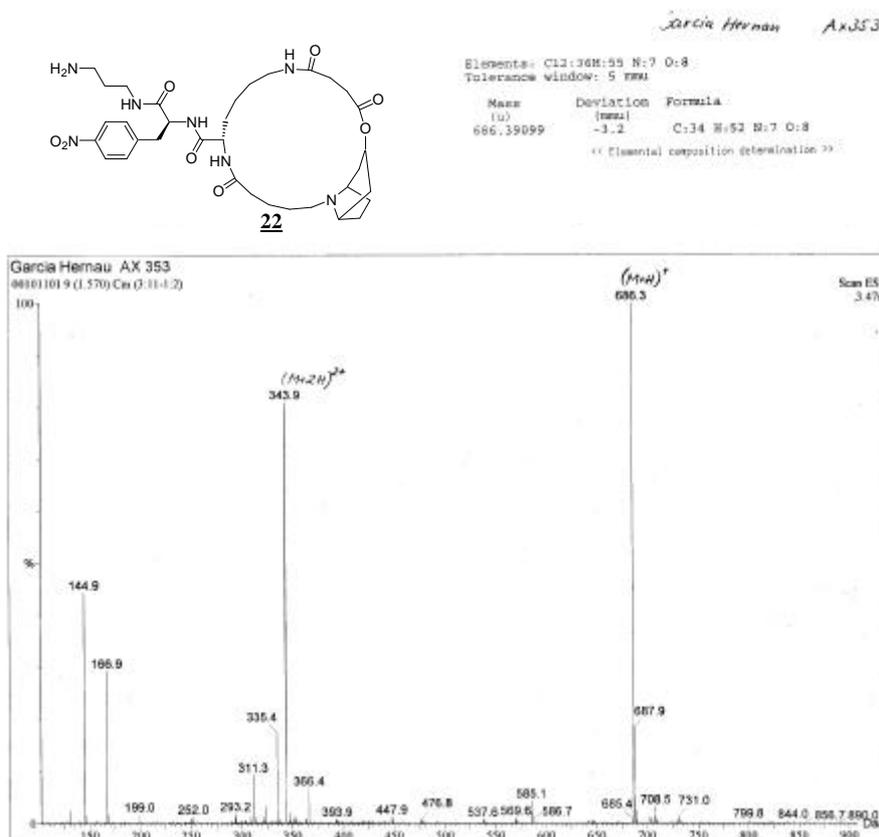


Bild 3.5.6 Hochauflöste Massenspektrum de Makrozyklus 22

Trotz niedriger Ausbeute dieser Reaktion wurde dadurch die Anwendbarkeit dieser Synthesestrategie für die Synthese für Makrozyklen bewiesen. Auf eine Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Ringbildung sowie die Synthese weiterer Makrozyklen-Analoga, die vielleicht ein günstigeres Substrat für die Makrozyklisierung darstellen sollten, wurde in dieser Arbeit verzichtet.

Die Kopplung des orthogonal geschützten Lysins am chemischen Marker lieferte ein günstiges Gerüst für die Synthese von Naturstoffhybriden und makrozyklischen Naturstoffderivaten. Die selektive Entschützung der Mtt- und Fmoc-Gruppe des Gerüsts im vorherigen Abschnitt ermöglichte die sequentielle Kopplung von zwei verschiedenen Naturstoffe sowie die Herstellung eines Substrates für eine intramolekulare Makrozyklisierung an der Festphase. Die Anwesenheit des chemischen Markers vereinfachte die Detektierung aller Zwischen- und Endprodukte.

4 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die Entwicklung von Methoden zur Festphasensynthese einer großen Anzahl von Naturstoffderivaten durch chemische Derivatisierungen von Sekundärmetaboliten. Eine allgemeine Übertragung der Syntheseprinzipien auf verschiedene Naturstoffe stand im Vordergrund. Wegen seiner häufig kostenaufwändigen Isolierung wurde der Verbrauch an Naturstoff bei der Parallelsynthese und Optimierung der Reaktionsbedingungen minimiert. Dazu wurden für die Detektion der synthetisierten Substanzen Analysemethoden angewandt, die nur geringe Substanzmengen benötigen und einen großen Probendurchsatz gewährleisten. In dieser Arbeit wurde die HPLC-MS-Analyse eingesetzt, die eine Aussage zur Ausbeutebestimmung und Hinweise zur Identifizierung aller Syntheseprodukte mit einem geringen Probeaufwand gewährleisten und mittels eines Auto-Samplers automatisiert werden kann. Substanzen, die den oben genannten analytischen Methoden genügen benötigen Strukturelemente, deren physikalisch-chemische Eigenschaften eine Detektion erlauben. Diese Strukturelemente wurden in Form eines chemischen Markers als Hilfsmittel zur Detektion aller an der Festphase synthetisierten Substanzen eingeführt.

Einbau eines chemischen Markers

Zur analytischen Verfolgung von Reaktionsritten nach Abspaltung vom Harz mittels HPLC-gekoppelter UV-Spektroskopie und Massenspektrometrie (API-ES-MS und MALDI-TOF-MS) wurde die Festphase vor Kopplung des Naturstoffes derivatisiert. Diese Methode wird chemischer Marker genannt. Der Wang-Linker am Synthesharz wurde mit 1,3-Diaminopropan unter Bildung einer Carbamat-Gruppe derivatisiert. Nach Spaltung dieser Bindung von Harz kann so eine freie Amino-Gruppe generiert werden, die nach experimentellem Vergleich seiner massenspektrometrischen Eigenschaften besser zur analytischen Verfolgung von Festphasen Reaktionen geeignet war als andere Gruppen wie Amide oder Carbonsäuren. Um eine Detektion mittels UV-Absorption zu verbessern, wurde die N-Fmoc geschützte Aminosäure p-(NO₂)-Phenylalanin über die Carboxy-Gruppe an der freien Aminogruppe des 1,3-Diaminopropan nachträglich eingeführt. So wurde ein gut geeigneter chemischer Marker hergestellt, der eine Analytik sowohl über UV-Spektroskopie, als auch der Massenspektrometrie (Ionisierungseigenschaften) ermöglicht. Alle Naturstoffderivate wurden mit dem chemischen Marker vom Harz abgespalten und so vorteilhaft der nachfolgenden Analytik zugeführt.

Immobilisierung von Naturstoffe an chemischen Markern

Zur Anwendung des chemischen Markers sollte danach der Naturstoff an die Festphase gekoppelt werden und die Bildung harzgebundener Naturstoffderivate mittels HPLC-MS verfolgt werden. Abspaltung der N-Fmoc-Gruppe des p-(NO₂)-Phenylalanins vom chemischen Marker ließ eine reaktive Amino-Gruppe für die Immobilisierung der Naturstoffe entstehen. Die Kopplung von Naturstoffen mit einer Carbonsäurefunktion, wie 21-Hydroxyprogesteronhemisuccinat und Estradiol-17 β -hemisuccinat, konnte direkt durch eine Amidbindung realisiert werden. Die Derivatisierung des chemischen Markers mit Bernsteinsäureanhydrid lieferte eine Carbonsäure-Funktion zur Immobilisierung der Naturstoffe Lobelin und Yohimbin. Die Amid-Kopplung einer Alkylhalogen-carbonsäure an den chemischen Marker erlaubte die selektive Immobilisierung von Nortropin. Dies verlief mittels nukleophiler Substitution des Halogenatoms durch die Amino-Funktion des Naturstoffe. Zum Beweis der Selektivität dieser Reaktion wurde die Festphasenoxidation der Hydroxy-Gruppe von Nortropin durchgeführt. Nach Isolierung und NMR-spektroskopischer Identifizierung der Endprodukte wurde bewiesen, dass HPLC-MS der chemisch markierten Moleküle gute Hinweise zur Reinheit und Identität der Reaktionsendprodukte lieferte.

Parallele Synthese von Naturstoffderivaten

Nach Untersuchung der Immobilisierung von Naturstoffen sollten Methoden zur parallelen Erzeugung von Naturstoffderivaten an der Festphase erarbeitet werden. Dafür sollte die Variation des festphasengebundenen Substrates vor der Immobilisierung des Naturstoffes und die Festphasen-Derivatisierung eines gebundenen Naturstoffderivates als zwei verschiedene Strategien untersucht werden. Nortropin wurde wegen seiner einfachen Struktur und wegen der Reaktivität der nach seiner Immobilisierung freien Hydroxy-Gruppe ausgewählt. Die Variation der Halogenalkyl-carbonsäure als festphasengebundenen Substrat zur Erzeugung verschiedener Nortropinderivate war mit einer Vielzahl kommerziell erhältlichen Bromalkyl-carbonsäuren erfolgreich. Interessanterweise fand auch die aromatische nucleophile Substitution von Nortropin an 4-Fluoro-3-nitrobenzoesäure statt, was die Herstellung neuartiger N-Aryl-substituierter Nortropinderivate ermöglichte. Die Acylierung der freien Hydroxy-Gruppe des polymergebundenen Nortropins wurde optimiert. Die Anwendung von „in situ“ hergestellten Säurefluoriden als Acylierungsreagenzien erwies sich als optimal. Mit dieser Methode erfolgte die Acylierung mit den meisten kommerziell erhältlichen Fmoc-Aminosäuren problemlos. Die Anwendung des chemischen Markers zu einer schnellen Entwicklung von Synthesestrategien und Optimierung von

Reaktionsbedingungen für die parallele Synthese von Nortropinderivaten wurde so erfolgreich erarbeitet.

Synthesewege zur Herstellung von Substanzbibliotheken mit Nortropin als Gerüst

Die gewonnenen Ergebnisse sollten zu Synthesewegen zur Herstellung einer großen Anzahl an neuartigen Substanzen genutzt werden, die die strukturellen Eigenschaften des Naturstoffes ausnutzen. Um eine möglichst große Anzahl an Substanzen mit diesem Syntheseweg herzustellen, sollte der Naturstoff in einem Gerüst platziert werden, das in mehreren Positionen derivatisiert werden konnte. Die strukturellen Eigenschaften des Naturstoffes sollten die Steuerung von regioselektiven Reaktionen ermöglichen. Die Immobilisierung von Nortropin an einer Festphasen-gebundenen 4-Fluoro-3-nitrobenzoesäure eröffnete den Weg zu neuartigen N-Arylsubstituierten Nortropinderivaten. Nach Festphasen-Oxidation der Nortropin-Hydroxy-Gruppe konnte zum Beispiel eine selektive (9:1) *endo*-reduktive Aminierung am resultierenden Keton durch Anwendung von $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ durchgeführt werden. Die Acylierung des resultierenden Amins mit nicht sterisch gehinderten Säurechloriden verlief problemlos. Eine weitere chemische Variabilität des Systems wurde durch Reduzierung der Nitro-Gruppe und nachfolgende Acylierung mit Säurechloriden erzielt. Auf der Basis von Nortropin wurde somit ein Syntheseweg zu größeren und neuartigen Substanzbibliotheken mit mindestens drei Angriffspunkten zur Diversifizierung vorgeschlagen.

Naturstoffhybride und Makrozyklen

Letztendlich sollten alle gewonnenen Erkenntnisse zur parallelen Festphasensynthese von Naturstoffderivaten auf die Generierung von Naturstoffhybriden und Makrozyklen übertragen werden. Dazu wurde als chemischer Marker das System 1,3-Diaminopropan verknüpft mit *p*-Nitro-phenylalanin eingesetzt. Als Verzweigungsstelle wurde orthogonal geschütztes Na-Fmoc-N^ε-Mtt-Lysin durch Amid-Bindung an den chemischen Marker eingeführt. Beide Schutzgruppen konnten selektiv abgespalten werden. Es wurde keine vorzeitige Abspaltung vom Linker beobachtet. Die Kopplung von 21-Hydroxyprogesteronhemisuccinat und Nortropin am gleichen Gerüst wurde durch HPLC-MS Analyse verfolgt. Die Immobilisierung von Nortropin und nachfolgende Derivatisierung der freien Hydroxy-Gruppe des Naturstoffes mit Bernsteinsäureanhydrid lieferte ein Substrat für eine Makrozyklisierungsreaktion. Die Ausbeute der Reaktion wurde allerdings wegen intermolekularer Polymerisierung vermindert. Ein Hinweis für die Bildung des gewünschten

Makrozyklus wurde durch hochauflösende Massenspektroskopie erhalten. So wurden erfolgreich ein Naturstoffhybrid und ein makrozyklisches Derivat an der Festphase synthetisiert.

5 Experimenteller Teil

5.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel wurden von den Firmen Fluka (Deisenhofen), Merck (Darmstadt) in p.a. Qualität bezogen. Die wasserfreien Lösungsmittel DCM, DMF und THF wurden von Fluka (Deisenhofen), Riedel de Haen (Deisenhofen) bezogen. Für die HPLC-Analytik wurden Acetonitril und Methanol der Firma Rathburn eingesetzt. Entionisiertes Wasser wurde über eine Filtrationsanlage von Millipore (Eschborn) gewonnen.

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden von Aldrich (Deisenhofen), Fluka (Deisenhofen), Lancaster (Mühlheim am Main), Merck (Darmstadt) und Novabiochem (Heidelberg) bezogen und ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt. Rink-Amid-AM-PS-Harz und Wang-PS-Harz wurden von der Firma Rapp Polymere (Tübingen) bezogen.

5.2 Analytik

5.2.1 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS)

Für analytische HPLC-Trennungen wurde eine HP-1100 Series Anlage der Firma Hewlett-Packard (jetzt Agilent (Bad Homburg)) mit einem 1100 MSD Massenspektrometer ausgerüstet, eingesetzt. Die Anlage war mit einer analytischen Trennsäule „YMC Basic“ (5µm Korngröße, 250 x 2mm,) der Firma YMC Europe GmbH (Schermbach/Weselerwald) ausgestattet. Für die Trennung wurde ein Gradient von Wasser/ 0,1% TFA (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B) bei einer Flussrate von 1 mL/min verwendet (10% B für 10 min, von 10 zum 36% B in 20 min, 100% B für 10 min, 10% B für 10 min).

Die UV-Detektion erfolgte bei $\lambda = 210$ nm und $\lambda = 280$ nm, und eine qualitative Bestimmung der Reinheit der Produkte wurde anhand der Peakflächen bei beiden Wellenlänge errechnet.

Die Messparameter für den Massendetektor waren:

- Ionenquelle: API-ES im positiven Modus.
- Trockener Gasstrom (N₂): 10 l/min
- Druck der Ionisationskammer: 24 psig
- Trockengastemperatur 350 °C
- Kapillarspannung: 3500 V

5.2.2 Präparative Hochleistungsflüssigchromatographie

Präparative HPLC-Trennungen wurden an einer Anlage der Firma Gilson-Abimed (Langenfeld), bestehend aus einer Pumpeneinheit 305, Pumpeneinheit 306, UV-Detektor 119, Dynamischer Mixer 806, Probensammler und Fraktionsammler „Liquid Handler 215“ durchgeführt. Als Trennsäule wurde eine RP-Select B (10µm Korngröße, 250 x 10 mm, E. Merck, Darmstadt) bei einer Flussrate von 4 mL/min. Die UV-Detektion erfolgte bei $\lambda = 210$ nm. Die für die Trennung geeigneten Gradienten wurden jeweils mittels analytischer Läufe bestimmt.

5.2.3 FT-ATR-IR Spektroskopie

FT-ATR-IR-Spektren der Harze bzw. polymergebundener Verbindungen wurden mit einem Bruker IFS 55 aufgenommen. Das Gerät war mit einer Vector 22 ATR-Einheit der Firma Graseby-SPECAC (Kent, G.B) versehen. Die Harze wurden direkt durch Aufpressen auf einen Si-Kristall vermessen. Die Spektren wurden mit 16-32 Scans aufgenommen, und es wurde jeweils eine automatische ATR-Korrektur durchgeführt.

5.2.4 UV-VIS Spektroskopie

Absorptionsmessungen für die Fmoc-Bestimmung wurden in einem Cary 1 Bio der Firma Varian aufgenommen. Es wurden 1 cm Küvetten verwendet.

5.2.5 NMR Spektroskopie

^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden an einem Bruker DPX-300 Spektrometer aufgenommen. Als Lösungsmittel wurde DMSO- d_6 , MeOD- d_4 , D_2O oder CDCl_3 je nach Substanzlöslichkeit verwendet.

Die Zuordnung der NMR-Spektren erfolgte auf der Grundlage von Signalmultiplizitäten, DEPT-Spektren sowie auf Parallelschlüssen unter Berücksichtigung gesicherter Zuordnungen innerhalb der Substanzreihen und literaturbekannte spektroskopischer Daten ähnlicher Substanzen. Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben.

Für die Durchführung von Wasserstoff/ Deuterium-Austauschversuchen (H/D Austausch) wurden einige Tropfen deuteriertes Wasser zugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurden die Proben nochmal mittels ^1H -NMR untersucht. Das Verschwinden von Signalen bei einem H/D Experiment ergab eine Aussage über die Azidität der Protonen. Normalerweise sind nur Protonen an Heteroatomen durch dieses Verfahren austauschbar.

5.2.6 Chloranil-Test. Qualitativer Nachweis von Aminogruppen (Ref: 87)

Die Überprüfung der Vollständigkeit der Kopplung an harzgebundenen Aminen wurde mittels Chloranil-Test durchgeführt. Es wurden folgende Reagenzlösungen verwendet:

- 20 mg/mL Chloranil in DMF
- 2% Acetaldehyd in DMF

Zur Durchführung wurden wenige Harzkugeln in einem Eppendorf-Cup mit je einem Tropfen der beiden Reagenzlösungen versetzt und die Suspension 5 min geschüttelt. Die Abwesenheit einer Grün bis Blaufärbung auf den Kugeln zeigte die Abwesenheit freier Amino-Gruppen an (Ref: 87).

5.2.7 Quantitative Colorimetrische Bestimmung von Fmoc-Gruppen (Ref: 105)

Die Belegung des Harzes mit Fmoc-Gruppen konnte durch die photometrische Bestimmung eines Piperidin-Dibenzofulven-Eduktes berechnet werden. Dieses Produkt bildet sich während der Abspaltung der Fmoc-Gruppe nach folgender Reaktionsgleichung.

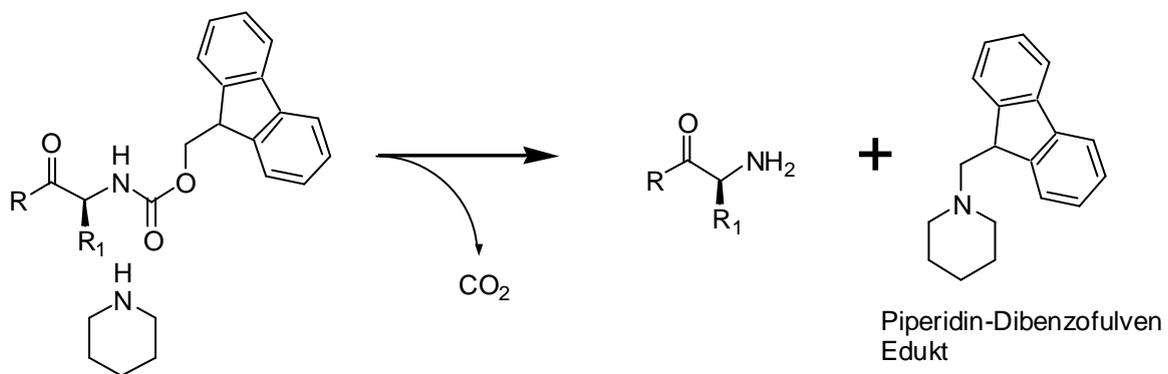


Bild 5.1 Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin

Für die Durchführung dieser Bestimmung wurden etwa 10 mg Harz in einem 2 mL Eppendorf-Cup eingewogen. Dazu wurde 1 mL einer Lösung von 20% Piperidin in DMF gegeben. Die Suspension wurde für eine Stunde bei RT geschüttelt. Danach wurde die Suspension für 2 Minuten zum Sieden gebracht. Ein 30 μL -Aliquot wurde auf 3 mL verdünnt (Verdünnungsfaktor (D): 0,01, siehe unten). Die UV-Absorption von dieser Lösung wurde gegen eine Vergleichslösung bei 301 nm vermessen. Es wurden immer 1 cm dicke transparente Küvetten im Spektrophotometer verwendet. Bei hohen Absorptionswerten ($A > 0.8$) musste die Messlösung verdünnt und noch mal mit einem anderen Verdünnungsfaktor (D) gemessen werden. Die Fmoc-Beladung (mMol/g) wurde nach folgender mathematischer Gleichung berechnet:

$$\text{Beladung (mMol / g)} = \frac{1000 * A}{M * \epsilon * d * D}$$

A: Absorption

M = Harzgewicht (mg)

$\epsilon = 7800 \text{ L} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$. (Extinktionskoeffizient des Piperidin-Dibenzofulven-Eduktes bei 301 nm.)

D = Verdünnungsfaktor: 0.01

d = Dicke der Küvette: 1 cm

5.2.8 Derivatisierung mit einem chemischen Marker: 1,3-Diaminopropan mit p-Nitrophenylalanin verknüpft mit dem Wang-Linker. Synthese des Festphasengebundenen {3-[2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(4-nitro-phenyl)-propionylamino]-propyl}-carbamsäurebenzylesters. Harz CM.

Für die Synthese eines chemischen Markers CM wurde Fmoc-p-Nitrophenylalanin statt Fmoc-Glycin am 1,3-Diaminopropan derivatisierten Wang-Linker analog zur Synthese von 2 eingefügt (s. 4.3.2). Das HPLC-UV Chromatogramm der Rohprodukte nach Abspaltung des Linkers mit TFA (s. 4.3.2) zeigte einen einzigen Peak ($\lambda = 210$ nm) bei $t_R = 25.6$ min (>95% Reinheit). Das API-ES-MS Spektrum ergab einen einzigen Peak bei m/z 354.0 (100%, $[M]^+$).

Die Beladung des Harzes wurde nach der Bestimmung der Fmoc-Gruppe berechnet (s. 4.2.6). Nach der Synthese würde man einen Wert von 0.74 mMol/g erhalten. Dieser Wert war in guter Übereinstimmung mit der theoretischen maximalen Beladung nach dieser Synthese ausgehend von den vom Hersteller angegebenen Daten. Die maximale theoretische Beladung des Harzes nach der Synthese konnte mit folgender mathematischen Formel berechnet werden und ergab einen Wert von 0.72 mMol/g:

$$S_{(th)} = \frac{S_{(s)}}{1 + \frac{(S_{(s)} * Wt_{add})}{1000}}$$

$S_{(th)}$ = theoretische Beladung

$S_{(s)}$ = Ausgangsbeladung = 1.2 mMol/g

$Wt_{(add)}$ = g/mol an Harz zugegeben = 380 mg/mMol

5.3 Herstellung von Amino-, Amido- und Carboxy-Gruppen nach Immobilisierung und Abspaltung vom Harz aus Fmoc-geschütztem Glycin

5.3.1 Immobilisierung und Abspaltung von PS-Wang Harz von Fmoc-Glycin 1.

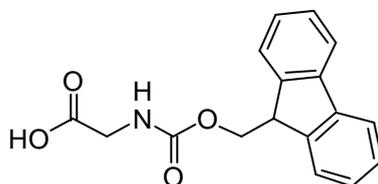
Immobilisierung von Fmoc-Gly-OH an den Wang-Linker

Wang-PS-Harz 0.59 mMol (500 mg, Beladung 1.17 mMol/g), DMAP (7 mg, 0.1 Äq., 0.055 mMol), Fmoc-Gly-OH (405 mg, 2.5 Äq., 1.36 mMol) und HOBt (209 mg, 2.5 Äq., 1.36 mMol) wurden in DMF (5 mL) suspendiert und geschüttelt. Nach 5 min wird DIC (213 µL, 2.5 Äq., 1.36 mMol) dazugegeben und noch 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt.

Abspaltung vom Wang-Linker

Die Abspaltung vom polymeren Träger erfolgte bei Raumtemperatur mit 50% TFA/DCM (5 mL). Nach 30 min wurde die Lösung abfiltriert, das Harz mit DCM (5 mL) versetzt, abfiltriert, mit Diethylether (5mL) versetzt und erneut abfiltriert. Die vereinigten organischen Filtrate wurden am Vakuum zur Trockne eingengt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde aus tert-Butylalkohol/Wasser (4:1) (2 mL) gefriergetrocknet, und anschließend mittels HPLC-API-ES-MS analysiert und mit präparativer HPLC aufgereinigt. Man erhält 64 mg Produkt als weißes Pulver (0.22 mMol, Ausbeute 38%).

Identifizierung des Produktes 1



1

Die HPLC-UV-Analyse zeigte einen Peak ($\lambda = 210 \text{ nm}$) bei $t_R = 31.1 \text{ min}$ (85% Reinheit). Das API-ES-MS Spektrum gab folgende Signale: m/z 319.8 (100%, $[M+Na]^+$), 297.9 (5%, $[M+H]^+$). Die ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren der gewonnenen Substanz nach Abspaltung vom Harz waren identisch zur kommerziell erhältlichen Substanz.

^1H -NMR (300.13 MHz, DMSO-d_6): d = 3.68 (d, 2H, 5.8), 4.22 (t, 1H, 6.6), 4.30 (d, 2H, 6.6), 7.32 (dd, 2H, 7.3), 7.4 (dd, 2H, 7.4), 7.64 (t, 1H, 5.8, Amid), 7.70 (d, 2H, 7.3), 7.87 (t, 2H, 7.4).

^{13}C -NMR (75.47 MHz, DMSO-d_6): d = 42.1 (CH), 46.6 (CH_2), 65.7 (CH_2), 120.1 (CH), 125.3 (CH), 127.1 (CH), 127.7 (CH), 140.8 (C), 143.9 (C), 156.6 (C), 171.6 (C).

5.3.2 Immobilisierung und Abspaltung vom PS-Wang Harz von Fmoc-Glycin unter Bildung einer Carbamat-1,3-Diaminopropan Bindung. Substanz 2 (3-Aminopropylcarbamoyl)-methyl]-carbamsäure 9H-fluoren-9-ylmethyl ester).

Derivatisierung des Wang-Linkers mit 1,3-Diaminopropan

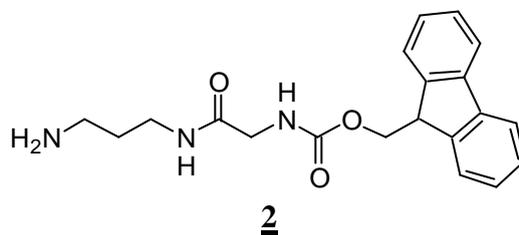
Wang-PS-Harz 0.585 mMol (500 mg, Beladung 1.17 mMol/g) wurde in abs. THF (6 mL) mit Carbonyldiimidazol (441 mg, 5 Äq., 2.93 mMol) versetzt und 6 h geschüttelt. Danach wurde das Harz mehrmals mit THF (je 10mL) gewaschen. Anschließend wurde das Harz in einer Lösung von 1,3-Diaminopropan (440 μl , 10 Äq., 5.85 mMol) in abs. THF (6 mL) suspendiert. Nach sechsständigem Schütteln wurde das Harz abfiltriert und mehrmals mit abs. THF (je 10mL) gewaschen.

Immobilisierung von Carbonsäuren an das Wang-1,3 Diaminopropan Harz und Abspaltung des Wang-Linkers

Nach Derivatisierung des Linkers wurde die Immobilisierung von Fmoc-Glycin (405 mg, 2,5 Äq., 1,36 mMol) an der freien Amino-Gruppe mit 1,3-Diaminopropan durchgeführt. Für die Kopplung dieser Aminosäure und Abspaltung des Syntheseproduktes von Linker wurden die gleiche

Protokolle wie bei 4.3.1 genutzt. Man erhielt 174 mg TFA Salz) Produkt als weißes Pulver (0.37 mMol, Ausbeute 64%).

Identifizierung des Produktes 2



Das HPLC-UV Chromatogramm zeigte ein Peak ($\lambda = 210$ nm) bei $t_R = 25.6$ min (>95% Reinheit). Das API-ES-MS Spektrum dieses Peaks zeigte ein einziges Signal bei m/z 354.0 (100%, $[M]^+$).

Die Zuordnung der Signale ist in Übereinstimmung mit den Werten für Fmoc-Gly (s. 4.3.1). Ein H/D Versuch zeigte das Verschwinden der Signale der freien Amin und ermöglichte die Zuordnung der Signale in Aromatenbereich.

$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, DMSO-d_6): d = 1.71 (t, 2H, 7), 2.79 (b, 2H), 3.62 (b, 2H), 3.88 (d, 2H, 5.8), 4.19 (t, 1H, 6.6), 4.30 (d, 2H, 6.7), 7.29 (t, 2H, 7.3), 7.35 (t, 2H, 7.4), 7.47 (b, 1H, Amid), 7.67 (t, 1H, 5.8, Amid), 7.70 (d, 2H, 7.3), 7.82 (t, 2H, 7.4), 7.99 (b, 1H, Amid).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,47 MHz, DMSO-d_6): d = 27,8 (CH_2), 36,0 (CH_2), 37,1 (CH_2), 44,1 (CH), 47,2 (CH_2), 66.2 (CH_2), 121,7 (CH), 125,6 (CH), 127.50 (CH), 128,0 (CH), 141,2 (C), 143,3 (C), 156.4 (C), 170,4 (C).

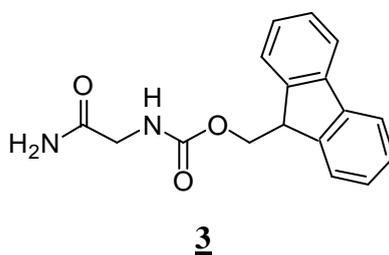
5.3.3 Immobilisierung und Abspaltung von Fmoc-Glycin vom PS-Rink Harz. Substanz 3 (Carbamoylmethyl-carbamsäure-9H-fluoren-9-ylmethylester).

Abspaltung der Fmoc Gruppe

Der mit Rink-Linker derivatisierte käuflich erworbene polymere Träger (Novabiochem) lag mit der eine Fmoc-geschützten Amino-Funktion des Linkers vor. Rink-PS-Harz 0.26 mMol (500 mg, Beladung 0.51 mMol/g), wurde in 20% Piperidin in DMF (5 mL) suspendiert und geschüttelt. Nach 1 min wurde das Harz abfiltriert und in frische 20% Piperidin-Lösung suspendiert. Nach einer Stunde wurde das Harz abfiltriert und anschließend mit DMF, DCM und Diethylether (je 5mL) gewaschen und unter einem Luftstrom getrocknet.

Für die Immobilisierung und Abspaltung von Carbonsäuren an diesem Linker wurden die gleiche Protokolle wie unter 4.3.1 verfolgt. 51 mg Produkt wurden als weißes Pulver erhalten (0.172 mMol, Ausbeute 67%).

Identifizierung des Produktes 3



Das HPLC-UV Chromatogramm zeigte einen einzigen Peak ($\lambda = 210$ nm) bei $t_R = 29$ min (70% Reinheit). Das API-ES-MS Spektrum dieses Peaks zeigte Signale bei m/z 318.5 (100%, $[M+Na]^+$), 296.3 (40%, $[M+H]^+$), 466.9 (90% $[3M+2Na]^{++}$). Die NMR Signale waren in guter Übereinstimmung mit den Werten für Fmoc-Gly (s. 4.3.1). Die Zuordnung der Signale der amidischen Protonen wurde mittels eines H/D Austauschversuches (s. 4.2.4) bewiesen.

1H -NMR (300.13 MHz, DMSO- d_6): d = 3.56 (d, 2H, 4.3), 4.21 (t, 1H, 6.3), 4.28 (d, 2H, 6.3), 7.02 (br, 2H, Amid), 7.31 (t, 2H, 7.3), 7.39 (t, 2H, 7.3), 7.64 (bt, 1H, Amid), 7.70 (d, 2H, 7.3), 7.87 (t, 2H, 7.3).

^{13}C -NMR (75,47 MHz, DMSO- d_6): d = 43.3 (CH), 46.7 (CH₂), 65.7 (CH₂), 120.1 (CH), 125.3 (CH), 127.1 (CH), 127.7 (CH), 140.8 (C), 143.9 (C), 156.6 (C), 171.6 (C).

5.4 Immobilisierung von Naturstoffen an chemischen Markern: Festphasen-Immobilisierung am mit dem chemischen Marker (1,3-Diaminopropan mit p-Nitrophenylalanin verknüpft) derivatisierten Wang-Linker

5.4.1 Direkte Immobilisierung von 21-Hydroxyprogesteronhemisuccinat und 17 β -Estradiolhemisuccinat. Substanz 4 (3-[2-{3-[2-(10,13-Dimethyl-3-oxo-2,3,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-16-yl)-2-oxo-ethoxycarbonyl]-propionylamino}-3-(4-nitro-phenyl)-propionylamino]-propyl-ammonium und 5 -[2-[3-(3-Hydroxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yloxycarbonyl)-propionylamino]-3-(4-nitro-phenyl)-propionylamino]-propyl-ammonium.

Die Synthesen wurden am Wang-Linker (0.74 mMol/g), der 1,3-Diaminopropan verknüpft mit p-Nitrophenylalanin derivatisiert war, durchgeführt (s. 4.3.4). Die Synthese mit 21-Hydroxyprogesteronhemisuccinat wurde mit 100 mg Harz (0.074 mMol) durchgeführt. Für die Synthese von 17- β -Estradiolhemisuccinat Derivat wurden 20 mg Harz (0.015 mMol) verwendet.

Abspaltung der Fmoc-Gruppe

Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe des p-Nitrophenylalanin wurde analog zur Synthese von Substanz 3 durchgeführt (s. 4.3.3).

Immobilisierung von 21-Hydroxyprogesteronhemisuccinat und 17 β -Estradiolhemisuccinat

Die Immobilisierung der beiden Substanzen an der Amino-Funktion des p-Nitrophenylalanin Restes wurde analog zur Immobilisierung von Fmoc-Glycin am Rink Linker bei der Synthese vom Substanz 3 (s. 4.3.3) durchgeführt.

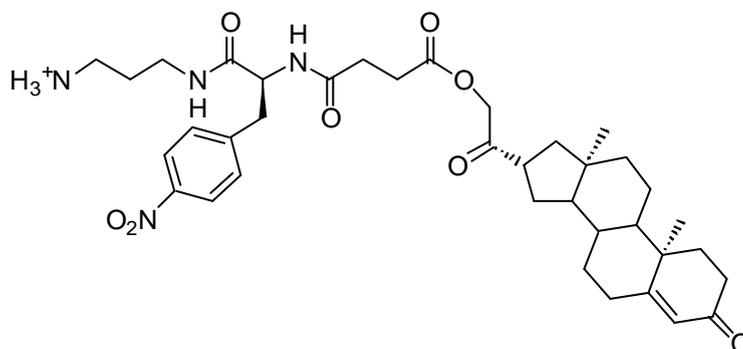
Abspaltung vom polymeren Träger und Aufarbeitung

Die Abspaltung von Substanzen vom Wang-Linker und deren Analyse und Aufarbeitung verlief analog zur oben beschriebenen Synthese (s. 4.3.1).

Das 21-Hydroxyprogesteronhemisuccinat Derivat (TFA Salz) wurde in 36 mg Ausbeute als weißen Pulvers (0.045 mMol, Ausbeute = 62%) erhalten. Das 17 β -Estradiolhemisuccinat (TFA Salz) wurde als 2 mg eines weißen Pulver erhalten ($2 \cdot 10^{-3}$ mMol, Ausbeute = 14%).

Identifizierung der Produkte 4 und 5

- 21-Hydroxyprogesteronhemisuccinat-Derivat, Substanz 4.



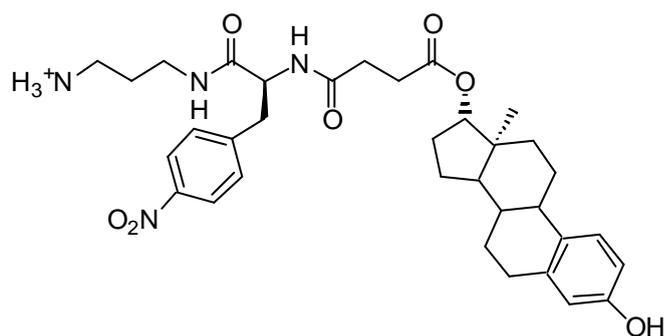
4

Das HPLC-UV Chromatogramm zeigte einen Peak ($\lambda = 210 \text{ nm}$) bei $t_R = 31.34 \text{ min}$ (>95% Reinheit). Das API-ES-MS Spektrum dieses Peaks zeigte ein einziges Signal bei $m/z 678.0$ (100%, $[M]^+$). Ein Vergleich mit den ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren von 21-Hydroxyprogesteronhemisuccinat erlaubte die Zuordnung von charakteristischen Signale bei beiden Verbindungen. Das Verschwinden der Signale ermöglichte die Zuordnung von Signale der Amin- (7.75 ppm) und Amid- (8.29 ppm) Protonen. Das Duplett-Signal bei $\delta = 8.29 \text{ ppm}$ bewies die Amid-Bindung zwischen der Amino-Funktion des Phenylalanins des chemischen Markers und 21-Hydroxyprogesteronhemisuccinat. In Folgenden, sind nur ausgewählte charakteristische Signale der ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren von **4**, die zur Identifizierung dienten, aufgelistet.

^1H -NMR (300.13 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 0.59$ (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 4.48 (br, 1H), 4.63 (d, 1H), 5.64 (s, 1H), 7.5 (d, 8.6, 2H), 7.75 (b, 3H, Amin), 8.29 (d, 8.1, 1H).

^{13}C -NMR (75,47 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 171.7, 170.9, 170.7, 203.8, 197.9$.

- 17 β -Estradiolhemisuccinat Derivat, Substanz **5**.



5

Die HPLC-UV-API-ES-MS Analyse vom Rohprodukt zeigte einen Peak ($\lambda = 210 \text{ nm}$) bei $t_R = 30.7 \text{ min}$ (56% Reinheit). Das API-ES-MS Spektrum zeigte ein einziges Signal $m/z 619.0$ (100%, $[M]^+$).

Eine Identifizierung des Produktes erfolgte nach Vergleich des ¹H-NMR Spektrums des 17β-Estradiolhemisuccinat und charakteristischer Signale bei δ = 10-6 ppm des Produktes. Wie beim Substanz **4** unterstützte das Verschwinden von Signale während eines H/D Versuches die Zuordnung der amidischen Protonen. In Folgenden, sind nur ausgewählte charakteristische Signale der ¹H- und ¹³C-NMR Spektren von **5**, die zur Identifizierung dienten, aufgelistet.

¹H-NMR (300.13 MHz, DMSO-d₆): δ = 6.43 (br, 1H), 6.48 (bd, 1H, 9.1), 6.99 (d, 1H, 8.7), 7.44 (d, 2H, 8.5), 8.07 (d, 2H, 8.7), 8.14 (br, 1H, Amid), 8.21 (bd, 1H, 7.9, Amid).

5.4.2 Immobilisierung von Yohimbin und Lobelin mit Bernsteinsäureanhydrid als zweiten Linker: Substanzen **6 3-[2-[3-(1-Methoxycarbonyl-1,2,3,4,4a,5,7,8,13,13b,14,14a-dodecahydro-indolo[2',3':3,4]pyrido[1,2-b]isoquinolin-2-yloxy-carbonyl)-propionylamino]-3-(4-nitro-phenyl)-propionylamino]-propyl-ammonium und **7** 3-[2-(3-{2-[1-Methyl-6-(2-oxo-2-phenyl-ethyl)-piperidin-2-yl]-1-phenyl-ethoxycarbonyl}-propionylamino)-3-(4-nitro-phenyl)-propionylamino]-propyl-ammonium.**

Die Synthesen wurden am derivatisierten Wang-Linker (0.74 mMol/g), der 1,3-Diaminopropan verknüpft mit p-Nitrophenylalanin derivatisiert war (**CM**), durchgeführt (s. 4.2.8). Bei beiden Synthesen wurden 100 mg Harz (Beladung 0,74 mMol/g, 0,074 mMol) verwendet.

Abspaltung der Fmoc-Gruppe von p-Nitrophenylalanin

Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe des p-Nitrophenylalanins wurde wie unter 4.3.2 beschrieben durchgeführt.

Acylierung mit Bernsteinsäureanhydrid

Die Harze wurden in einer Lösung von Bernsteinsäureanhydrid (35 mg, 0.37 mMol, 5 Äq.), Dimethylaminopyridin (9 mg, 0,074 mMol, 1 Äq.) und 1.5 mL Pyridin suspendiert. Nach 6 h wurde

das Harz abfiltriert und mit Pyridin mehrmals gewaschen. Anschließend wurde das Harz mit Dichloromethan und Ether (je 5mL) mehrmals gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Ein negativer Test für die Anwesenheit von Aminen (Chloranil-Test, 4.2.5) bewies eine vollständige Acylierung.

Veresterung der resultierenden Carbonsäure-Funktion, Immobilisierung von Lobelin und Yohimbin.

Die Harze wurden in einer Lösung von 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) (9 mg, 1 Äq., 0.074 mMol), Yohimbin (67 mg, 3 Äq., 0.22 mMol) bzw. Lobelin (50 mg, 3 Äq., 0.22 mMol), und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) (35 mg, 2,5 Äq., 0.22 mMol) in DMF (2mL) suspendiert und geschüttelt. Nach 5 min wurde Diisopropylcarbodiimid (DIC) (27µl, 3 Äq., 0,22 mMol) dazugegeben und 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde das Harz mehrmals mit DMF, DCM und Diethylether (je 5mL) gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

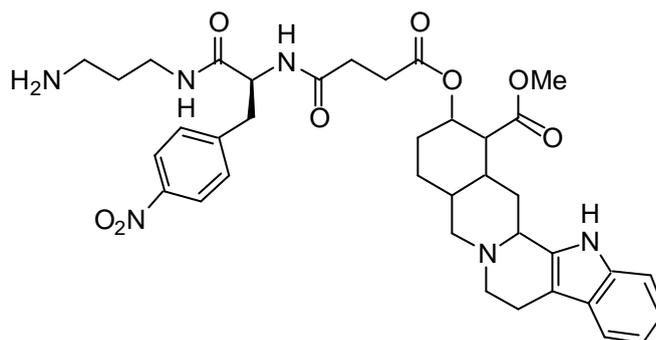
Abspaltung vom polymeren Träger und Aufarbeitung

Die Abspaltung der Produkte vom Wang-Linker, sowie deren Analyse und Aufarbeitung erfolgte analog zu anderen Synthesen (s. 4.3.1).

Bei der Synthese des Yohimbin-Derivates wurden 25 mg (TFA Salz) eines orange-roten Pulvers (0.022 mMol, Ausbeute = 30 %) erhalten. Das Lobelin-Derivat wurde mit einem Ausbeute von 26 mg (TFA Salz) in der Form eines weißes Pulvers (0.030 mMol, 41 %) erhalten.

Identifizierung der Produkte 6 und 7

- Yohimbin-Derivat, Substanz 6.

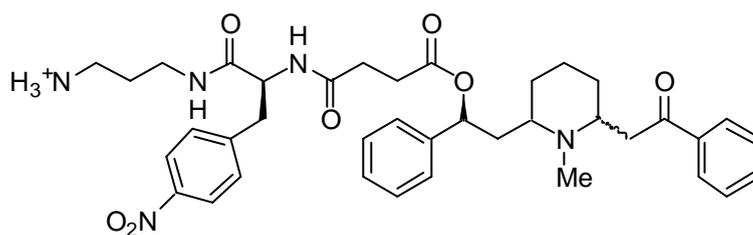


6

Das HPLC-UV Chromatogramm des Rohproduktes zeigte einen Peak ($\lambda = 210 \text{ nm}$) bei $t_R = 25.03 \text{ min}$ (42% Reinheit). Das API-ES-MS Spektrum dieses Peaks zeigte Signale bei m/z 702.8 (100%, $[M-H]^+$) und 352.0 (65%, $[M^{2+}]$). Das Verschwinden von Signalen während eines H/D Versuches unterstützte die Zuordnung der Signale. Die Zuordnung aller Signale stimmte mit den in der Literatur angegebenen spektroskopischen Daten von Yohimbin überein (Ref: 61). Das NMR Spektrum vom Produkt zeigte, dass die reaktiven funktionellen Gruppen im Yohimbin Gerüst N-9, N-11, und C-23 unberührt blieben. Im Folgenden sind nur die Signale des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums von Substanz **6** aufgelistet, die zu dessen Identifizierung dienen.

$^1\text{H-NMR}$ (300.13 MHz, DMSO-d_6): d = 3.63 (s, 3H), 7.03 (dd, 1H, 7.23), 7.13 (dd, 1H, 7.2), 7.35 (d, 1H, 7.9), 8.26 (d, 1H, 8.3, Amid), 10.15 (br, 1H, Amid), 11.2 (s, 1H, Amid).

- Lobelin Derivat. Substanz **7**



7

Das HPLC-UV Chromatogramm vom Rohprodukt zeigte zwei Peaks ($\lambda = 210 \text{ nm}$) bei $t_R = 26.7$ und 27.2 min in Verhältnis 1:1. Das API-ES-MS Spektrum beider Peaks zeigte Signale bei m/z 686.0 (100%, $[M-H]^+$) und 343.6 (80%, $[M^{2+}]$). Die Summe der Fläche beider Peaks nach Integration des Chromatogramms repräsentierte $>95\%$ der gesamten Peakfläche im Chromatogramm. Eine Identifizierung des Produktes erfolgte nach Vergleich des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums von Lobelin in DMSO-d_6 und der NMR Analyse von charakteristischen Signalen des

Produktes. Das Verschwinden von Signalen während eines H/D Versuchs unterstützte ihre Zuordnung zu Stickstoffatomen. Die Zuordnung alle Signale war in Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen spektroskopischen Daten von Lobelin in DMSO-d₆ (Ref: 62).

¹H-NMR (300.13 MHz, DMSO-d₆): d = 4.45 (br, 1H), 5.61 (br, 1H), 7.30-7.4 (br, 5H), 7.48 (m, 2H), 7.56 (m, 2H), 7.65 (m, 1H), 8.30 (d, 8.4, 1H, Amid), 9.83 (br, 1H, Amid).

Das Signal um $\delta = 8.29$ bewies die Amid-Bindung zwischen chemischem Marker und Bernsteinsäure an der Amino Funktion des Phenylalanins. Die Masse und die Anwesenheit von charakteristischen ¹H-NMR Signalen des Lobelingerüsts bewies die Identität des Kopplungsproduktes.

5.4.3 Immobilisierung von Nortropin mit Bromessigsäureanhydrid als zweiten Linker und Oxidation des Festphasen-gebundenen Nortropinderivats. Substanzen **8: 3-[2-[2-(3-Hydroxy-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-8-yl)-acetylamino]-3-(4-nitro-phenyl)-propionylamino]-propyl-ammonium und **9**: 3-{3-(4-Nitro-phenyl)-2-[2-(3-oxo-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-8-yl)-acetylamino]-propionylamino}-propyl-ammonium**

Für die Immobilisierung von Nortropin wurden 200 mg des mit dem chemischen Marker derivatisierten Wang-Harzes verwendet (0.148 mMol, s. 4.3.2). Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe ist im Teil 4.3.2 beschrieben.

Acylierung des chemischen Markers mit Bromessigsäure

Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe wurde das Harz in einer Lösung von Bromessigsäure (51 mg, 2.5 Äq., 0.37 mMol) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) (57 mg, 2.5 Äq., 0.37 mMol) in DMF (5mL) suspendiert und geschüttelt. Nach 5 min wurde Diisopropylcarbodiimid (DIC) (116µl, 5 Äq., 0.74 mMol) dazugegeben und noch 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde das Harz abfiltriert und mit DMF mehrmals (je 5 mL) gewaschen. Ein kleiner Teil des Harzes (etwa 5 mg) wurde mit Dichlormethan und Diethylether mehrmals gewaschen und getrocknet und darauf

der Chloranil-Test durchgeführt (siehe 4.2.5). Ein negativer Test auf die Anwesenheit von Aminen (Chloranil-Test) bewies die vollständige Acylierung des Festphasen-gebundenen Markers.

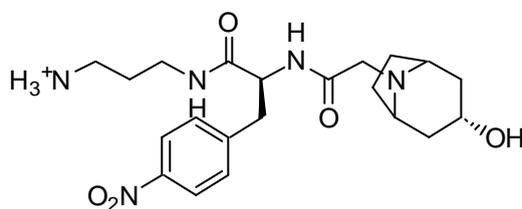
Nucleophile Substitution

Nach der Acylierung wurde das Harz in einer Lösung von Nortropin (50 mg, 2.5 Äq., 0.37 mMol) in DMF (5mL) suspendiert und für 16 h geschüttelt. Danach wurde das Harz mit DMF (10 mL) gewaschen. Anschließend wurde das Harz mehrmals mit DCM und Diethylether gewaschen und getrocknet.

Abspaltung vom polymeren Träger und Aufarbeitung

Die Abspaltung von Substanzen vom Wang-Linker und deren Analyse und Aufarbeitung erfolgte analog zur oben beschriebenen Synthese (s. 4.3.1). Nach präparativer HPLC wurde das Produkt (TFA Salz) in 27 mg Ausbeute eines weißes Pulver erhalten (0.041 mMol, Ausbeute = 25 %).

*Identifizierung des Produktes **8***



8

Die Zuordnung der Signale in ^1H - und ^{13}C - NMR Spektrum erwies sich als schwierig. Im ^1H -NMR Spektrum erschienen die Signale des Tropangerüsts zusammen mit denen vom

chemischen Markern. Die Anwesenheit von einem chiralen Zentrum im Molekül verursachte den Verlust an Symmetrie im Tropangerüst. Deswegen waren die chemische Verschiebungen der Kohlenstoffatomenpaare 2-4, 1-5 und 6-7 (s. Tabelle 3.4.1) unterschiedlich. Es waren 19 Signale im ^{13}C -NMR Spektrum erkennbar.

^1H -NMR (300.13 MHz, DMSO- d_6): 1.6-3.9 (aliphatische CH und CH_2), 4.67 (m, 1H), 7.51 (d, 8.6, 2H), 7.9 (br, 3H, Amin), 8.15 (d, 8.6, 2H), 8.4 (t, 5.5, 1H, Amid), 8.9 (d, 8.6, 1H, Amid), 9.6 (br, 1H).

^{13}C -NMR (75,47 MHz, DMSO- d_6): 23.7 (CH_2), 23.9 (CH_2), 27.2 (CH_2), 35.8 (CH_2), 36.5 (CH_2), 36.6 (CH_2), 36.7 (CH_2), 37.9 (CH_2), 51.7 (CH_2), 53.4 (CH), 60.4 (CH), 60.9 (CH), 61.5 (CH), 123.1 (CH), 130.6 (CH), 145.6 (C), 146.3 (C), 163.9 (C), 169.9 (C).

Um die Selektivität der nucleophilen Substitution am Stickstoff in der vorherigen Reaktion zu prüfen, wurde die Hydroxy-Gruppe oxidiert.

*Festphasenoxidation der Hydroxy-Gruppe vom Harz **H8**: Substanz **9***

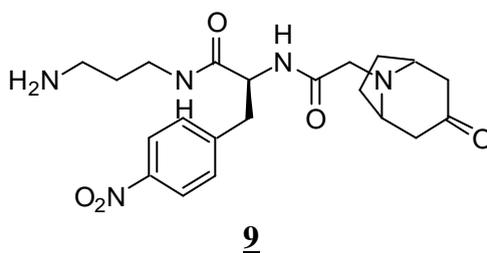
Die oben beschriebene Synthese des Festphasen-gebundenen Nortropinderivats **H8** wurde mit 100 mg des chemisch derivatisierten Wang-Harzes durchgeführt (0.074 mMol, s. 4.3.2). Vor der Abspaltung des Derivates wurde folgender Oxidationsschritt eingefügt.

Oxidation mit Pyridiniumdichromat

Nach der Immobilisierung von Nortropin am chemischen Marker (s. oben) wurde das Harz mehrmals mit DMF (je 5 mL) gewaschen. Danach wurde das Harz in 2 mL einer Lösung 0.5 M PDC in DMF suspendiert und 2 Stunden geschüttelt (Ref: 30, 67, 68). Nach Abfiltrierung dieser Lösung wurde das Harz mehrmals mit DMF und danach mit DCM und Diethylether (je 5 mL) gewaschen und anschließend getrocknet. Die Abspaltung vom Harz und Aufarbeitung des Produktes

wurde wie üblich durchgeführt (s 4.3.1). Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 33 mg (TFA Salz) in der Form eines weißen Pulvers (0.06 mMol, 80%) erhalten.

Identifizierung des Produktes 9



Wie im 8 war die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -NMR Signale nicht eindeutig möglich. Das Auftreten eines Signals im ^{13}C -NMR Spektrums bei 204 ppm bewies die Anwesenheit eines Carbonyl Kohlenstoffs derer chemische Verschiebung in guter Übereinstimmung mit der in der Literatur angegebenen spektroskopischen Daten für Tropanone (Ref: 66).

Bemerkenswerterweise sind im ^{13}C -NMR Spektrum dieser Moleküle nur 16 Signale erkennbar. Es wurde angenommen daß im Gegensatz zur Substanz 8 die chemische Verschiebungen der Kohlenstoffatome vom Nortropangerüst übereinander lagen. Im Folgenden sind die von dieser Substanz erhaltenen Signale im ^1H - und ^{13}C -NMR Spektrum aufgelistet.

^1H -NMR (300.13 MHz, DMSO- d_6): 1.6-4.1 (Integration unklar, aliphatische CH und CH₂), 4.66 (m, 1H), 7.51 (d, 8.5), 7.87 (br, 3H, Amin), 8.14 (d, 8.5, 2H), 8.39 (t, 5.4, 1H, Amid), 8.87 (d, 8.2, 1H, Amid).

^{13}C -NMR (75,47 MHz, DMSO- d_6): d = 25.4 (CH₂), 27.2 (CH₂), 35.8 (CH₂), 36.7 (CH₂), 37.7 (CH₂), 45.3 (CH₂), 51.3 (CH₂), 53.5 (CH), 60.7 (CH), 123.2 (CH), 130.5 (CH), 145.6 (C), 146.3 (C), 164.6 (C), 169.9 (C), 204.4 (C).

5.5 Parallele Synthese von Nortropinderivaten. Parallele Herstellung von Nortropinderivaten am chemischen Marker 1,3-Diaminopropan verknüpft mit *p*-Nitro-phenylalanin

5.5.1 Variation des chemischen Markers. Synthese von **10a** und **10b**: **R** und **S** 3-[2-[2-(3-Hydroxy-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-8-yl)-butyrylamino]-3-(4-nitro-phenyl)-propionylamino]-propyl-ammonium

Die Synthesen wurden am derivatisierte Wang-Linker **CM** (0.74 mMol/g), der 1,3-Diaminopropan verknüpft mit p-Nitrophenylalanin derivatisiert war, durchgeführt (s. 4.2.8). Bei beiden Synthesen wurden 10 mg Harz (Beladung 0,74 mMol/g, 0,0074 mMol) verwendet.

Abspaltung der Fmoc-Gruppe von p-Nitrophenylalanin

Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe des p-Nitrophenylalanins wurde wie in vorherigen Synthesen durchgeführt (s. 4.3.2).

Acylierung des chemischen Markers. Variation des zweitens Linkers

Die Harze wurden in einer Lösung von Acylierungsreagenz (2.5 Äq., 0.0185 mMol) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) (3 mg, 2.5 Äq., 0.0185 mMol) in DMF (0.5 mL) suspendiert und geschüttelt. Nach 5 min wurde Diisopropylcarbodiimid (DIC) (5µl, 5 Äq., 0.037 mMol) dazugegeben und noch 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurden die Harze abfiltriert und mit DMF (je 5mL) mehrmals gewaschen.

Nucleophile Substitution

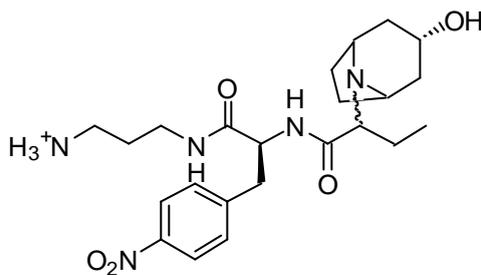
Die Harze wurden in einer Lösung von Nortropin (2.3 mg, 2.5 Äq., 0.0185 mMol) in DMF (0.5 mL) suspendiert und geschüttelt. Die Harze wurden abfiltriert und mit DMF mehrmals gewaschen. Danach wurden die Harze mit DCM und Diethylether mehrmals gewaschen und getrocknet.

Abspaltung und Probevorbereitung zur HPLC-API-ES-MS Analyse

Die Harze wurden in 0.5 mL einer Lösung TFA in DCM 1:1 für 30 min suspendiert. Danach wurden die Harze abfiltriert und die Lösungen in 1mL HPLC Vialen gesammelt. Die

Abspaltungslösungen wurden mit einem Strom Luft verdampft. Der Rückstand wurde dann mit 0.5 mL einer Lösung aus Wasser/ Acetonitril 1:1 aufgenommen und nach Abfiltrieren mittels HPLC-UV-API-ES-MS analysiert.

Synthese von 10a und 10b



10a-10b

Die Synthese mit 2-Brompropionsäure wurde auf 100 mg Harz (Beladung 0,74 mMol/g, 0,074 mMol) vergrößert. Für die Abspaltung und Aufarbeitung der Syntheseprodukte wurden die oben beschriebene Prozedur verwendet (s. 4.3.1). Nach präparativer HPLC wurden zwei Diastereomere (s. 3.6.1) aufgetrennt. Es wurden in jeder Fraktion 12 mg Produkt (0.021 mMol 10a + 0.021 mMol 10b, Ausbeute 60%) erhalten.

Identifizierung der Produkte 10a und 10b

- Diastereomerenmischung 10a und 10b

Die HPLC-UV-API-ES-MS Analyse vom Rohprodukt zeigte zwei Peaks ($\lambda = 210$ nm) um $t_R = 11.3$ (31.7% Reinheit) und 17 min (31.6%) in Verhältnis 1:1, die den Produkten 10a bzw. 10b zugeordnet wurden. Das API-ES-MS Spektrum beider Peaks zeigten ein einziges Signal bei m/z

461.5 (100%, $[M]^+$) bei $t_R = 11.3$ min und m/z 461.4 (100%, $[M]^+$) bei $t_R = 17$ min. Im folgenden sind die Signale im 1H - und ^{13}C -NMR Spektrum der verschiedenen Diastereomere aufgelistet.

- Diastereomer **10a**

1H -NMR (300.13 MHz, CD_3OD): d = 0.94 (t, 7.3, 3H), 1.6-4.15 (Integration unklar, aliphatische CH und CH_2), 4.93 (dd, 10.4, 5.2, 1H), 7.56 (d, 8.5, 2H), 8.18 (d, 8.5, 2H).

^{13}C -NMR (75,47 MHz, CD_3OD): 10.0 (CH_3), 22.8 (CH_2), 25.3 (CH_2), 25.4 (CH_2), 28.6 (CH_2), 37.1 (CH_2), 38.0 (CH_2), 38.2 (CH_2), 38.3 (CH_2), 39.1 (CH_2), 55.1 (CH), 60.8 (CH), 62.5 (CH), 63.5 (CH), 65.4 (CH), 124.5 (CH), 131.7 (CH), 146.2 (C), 148.5 (C), 168.2 (C), 172.8 (C)

Bemerkenswerterweise waren für dieses Diastereomer 21 Signale im ^{13}C -NMR Spektrum erkennbar. Die Anwesenheit des chiralen Zentrum im Molekül verursacht möglicherweise den Verlust an Symmetrie des Tropan-Rings.

-Diastereomer **10b**

1H -NMR (300.13 MHz, CD_3OD): d = 0.55 (t, 7.3, 3H), 1.75-4.15 (Integration unklar, aliphatische CH und CH_2), 4.72 (dd, 10.3, 5.2, 1H), 7.53 (d, 8.6, 2H), 8.17 (d, 8.6, 2H).

^{13}C -NMR (75,47 MHz, CD_3OD): 9.5 (CH_3), 22.5 (CH_2), 25.1 (CH_2), 25.6 (CH_2), 28.6 (CH_2), 37.3 (CH_2), 38.2 (CH_2), 38.4 (CH_2), 38.5 (CH_2), 55.9 (CH), 61.0 (CH), 62.8 (CH), 64.0 (CH), 65.4 (CH), 124.6 (CH), 131.4 (CH), 145.9 (C), 148.5 (C), 168.7 (C), 173.0 (C).

5.5.2 **Veresterung der Hydroxy-Gruppe von Nortropin. Substanz 11: 3-[2-(5-{3-[2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-acetoxy]-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-8-yl]-pentanoylamino)-3-(4-nitro-phenyl)-propionylamino]-propyl-ammonium**

Untersuchung der Veresterungsbedingungen

Als Ausgangsmaterial für diese Untersuchung wurde ein Modellsubstrat verwendet. Dafür wurde ein mit dem chemischen Markern verknüpftes Nortropinderivat mit 4-Bromvaleriansäure als

zweiten Linker (s. 3.2 und 4.4.3 und 4.5.1) hergestellt. Die Synthese wurde in 500 mg Maßstab mit dem Wang-Linker verknüpft mit dem chemischer Marker **CM**, (Beladung 0.74 mMol/g, 0.37 mMol) (s. 4.3.3) durchgeführt. Es wurden jeweils 10 mg Harz in jedem nachfolgender Ansatz verwendet. Die verschiedenen Teile wurden jeweils in DMF in verschiedenen Reaktionsgefäßen vorgequollen. Nach 5min wurde das Lösungsmittel abfiltriert. Danach wurde jeder Teilansatz je nach Kopplungssystem in 1 mL DMF, THF oder DCM Lösung 0.6M in Fmoc-Gly und je nach Ansatz 0.6M bis zum 0.8M in den verschiedenen Kopplungsreagenzien suspendiert. Es wurden zwei Ansätze pro Kopplungssystem durchgeführt, um den Verlauf der Reaktion nach zwei verschiedenen Reaktionszeiten (4 und 20 H) zu verfolgen. Die Zusammensetzung aller Reaktionen sind in folgender Tabelle vorgestellt.

Kopplungs- system	Reagenz/ Lösungsmittel	Konzentration (M)	mg or µl	Zeit (H)
1	DIC	0.8	125 µl	4
	HOBt*H ₂ O DMF	0.6	92 mg	20
2	DIC	0.8	125 µl	4
	HOBt DMF	0.6	81 mg	20
3	DIC	0.8	125 µl	4
	DMAP	0.6	73 mg	20

	DMF			
4	PyBOP	0.6	265 mg	4
	DIPEA	0.8	139µl	20
	DMF			
5	HBTU	0.6	228 mg	4
	DIPEA	0.8	139µl	20
	DMF			
6	HBTU	0.6	228 mg	4
	DMAP	0.6	73 mg	20
	DIPEA	0.8	139µl	
	DMF			
7	PH3P	0.6	158 mg	4
	DEAD	0.6	63 µl	20
	THF			
8	MNSMT	0.6	178 mg	4
	NMI	1	80 µl	20
	DCM			
9	TFFHH	0.6	158 mg	4
	Pyr	1	81 µl	20
	DCM			

Tabelle 5.1 Optimierung der Veresterungsbedingungen eines Festphasen-gebundenen Nortropinderivates

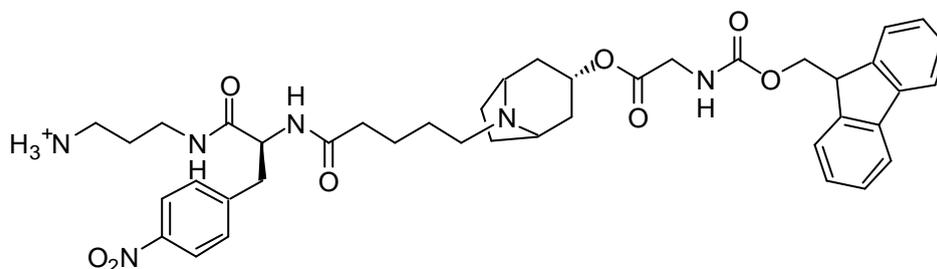
Nach der Reaktion wurden die Harze abfiltriert und mit DMF, DCM und Diethylether (1mL) mehrfach (je nach 1 mL) gewaschen. Die Abspaltung erfolgte mit 1 mL einer Lösung aus TFA in DCM (1:1). Nach 30 min wurden die Abspaltungslösungen abfiltriert und mit einem Luftstrom zur Trockene gebracht. Die Rückstände wurden in 1mL einer Mischung Wasser/ AcCN (1:1) aufgenommen und mittels HPLC-UV-API-ES-MS untersucht.

*Synthese mit TFFHH (s. Tabelle) als Kopplungsreagenz. Substanz **11***

Als Ausgangsmaterial wurden 100 mg des mit dem chemischen Marker derivatisierten Wang-Harzes verwendet (0.074 mMol, s. 4.3.3). Die chromatographische Analyse des Rohprodukt nach Abspaltung wurde identisch zum vorherigen Ansatz im 10 mg Maßstab (s.oben) durchgeführt.

Nach Aufarbeitung des Rohprodukts mittels präparativer HPLC wurde 45 mg Produkt (TFA Salz) als weißes Pulver (0.052 mMol, 70% Ausbeute) erhalten.

Identifizierung des Produktes **11**



11

Im Folgenden sind die charakteristischen Signale im ¹H- und ¹³C-NMR Spektrum des Produktes aufgelistet. Nach Vergleich mit dem Spektrum von Glycin und von Substanz **8** konnte das zugehörige Signal zum Proton in C-3 identifiziert werden. Seine chemische Verschiebung beträgt 5.07 ppm und ist in guter Übereinstimmung mit der chemischen Verschiebung (5.02 ppm) des Protons am C-3 von Atropin, eine strukturell ähnliche Verbindung (s. Tabelle 3.4.1 und Ref. 66).

¹H-NMR (300.13 MHz, DMSO-d₆): d = 1.56-2.35 (17H, aliphatische CH und CH₂), 2.85-3.34 (Integration unklar, aliphatische CH und CH₂), 3.75-3.96 (br, 4H, aliphatische CH und CH₂), 4.21 (t, 6.7 , 1H, C-29), 4.36 (d, 6.7, 2H, C-28), 4.60 (dd, 9.2, 6.1 , 1H, C-12), 5.06 (m, 1H, C-3), 7.28-8.6 (12H, aromatische Wasserstoffatomen).

¹³C-NMR (75,47 MHz, DMSO-d₆): d = 23.3 (CH₂), 24.8 (CH₂), 25.1 (CH₂), 28.5 (CH₂), 29.5 (CH₂), 35.4 (CH₂), 35.8 (CH₂), 37.0 (CH₂), 38.1 (CH₂), 38.6 (CH₂), 43.9 (CH₂), 48.3 (CH), 52.5 (CH₂), 55.7 (CH), 62.1 (CH), 66.8 (CH), 68.1 (CH₂), 120.8 (CH), 124.4 (CH), 126.1 (CH), 128.1 (CH), 128.8 (CH), 131.5 (CH), 142.6 (C), 145.1 (C), 146.6 (C), 148.4 (C), 159.1 (C), 170.7 (C), 173.8 (C), 175.3 (C).

Variierung der Aminosäure

Zur Untersuchung der Anwendbarkeit der gefundenen Reaktionsbedingungen für anderen Fmoc-Aminosäuren wurde das oben beschriebene Festphasen-gebundenen Nortropin-Derivate als Modells substrat verwendet (s. oben: *Untersuchung der Veresterungsbedingungen*). Es wurden jeweils 10 mg Harz in jedem Ansatz verwendet. Die verschiedene Teile wurden in DMF in verschiedenen Reaktionsgefäße vorgequollen und nach 5 min abfiltriert. Danach wurden verschiedene Teile Harz in 1 mL 0.6 M Lösung DCM in TFFHH und je nach Ansatz 0.6 M Lösung verschiedener Fmoc-Aminosäuren suspendiert und für 16h geschüttelt.

Nach der Reaktion wurden die Harze abfiltriert und mit DMF, DCM und Diethylether mehrmals gewaschen. Die Abspaltung und Analyse der Rohprodukte wurde wie üblich durchgeführt (s. oben *Untersuchung der Veresterungsbedingungen*).

5.6 Synthesewege zur Herstellung von Substanzbibliotheken mit Nortropin als Gerüst. Einsatz eines selektiv derivatisierbaren chemischen Markers für die Festphasensynthese von Nortropinderivaten.

5.6.1 Einsatz von 4-Fluor-3-nitrobenzoesäure als chemischer Marker und Immobilisierung von Nortropin. Synthese von 12: 4-(3-Hydroxy-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-8-yl)-3-nitro-benzamide.

Kopplung von 4-Fluor-3-nitrobenzoesäure

Für die Durchführung dieser Synthese wurde käufliches erwerbbares PS-Rink-Harz (0.51 mMol/g) verwendet. Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe und Kopplung vom 4-Fluor-3-nitrobenzoesäure an die Amino-Gruppe des Linkers wurde nach den oben beschriebenen Prozeduren durchgeführt (s. 4.3.2). Ein negativer Chloranil-Test eines kleinen Teils des Harzes bewies die Vollständigkeit der Kopplung.

Die theoretische Beladung der Harze nach der Synthese konnte mit folgender mathematische Formel berechnet werden:

$$S_{(th)} = \frac{S_{(s)}}{1 + \frac{(S_{(s)} * Wt_{add})}{1000}}$$

$S_{(th)}$ = theoretische Beladung (mMol/g)

$S_{(s)}$ = Ausgangsbeladung (mMol/g)

$Wt_{(add)}$ = g/mol an Harz zugegeben

$$S_{(th)} = 0.54 / (1 + (0.54 * (168 - 223) / 1000)) = 0.56 \text{ mMol/g}$$

Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe und Kopplung von 4-Fluor-3-nitrobenzoesäure resultiert in einem Gewichtsverlust und damit in der Erhöhung der Beladung (mMol/g) des Harzes.

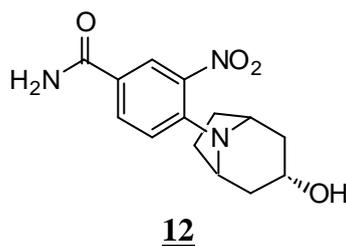
Nucleophile aromatische Substitution. Substanz 12

Als Ausgangsmaterial wurden 300 mg Rink-Harz nach Derivatisierung mit 4-Fluor-3-nitrobenzoesäure verwendet (0.168 mMol, s. oben *Kopplung von 4-Fluor-3-nitrobenzoesäure*). Für die Immobilisierung des Nortropins durch eine nucleophile Substitution an diesem chemischen Marker wurden die in dieser Arbeit beschriebenen Protokolle verwendet (s. 4.4.3, *Nucleophile Substitution*).

Abspaltung vom Polymeren Träger und Aufarbeitung

Die Abspaltung der Substanz vom Rink-Linker, der Analyse und Aufarbeitung erfolgte analog zu oben beschriebenen Synthesen (s. 4.3.3). Es wurden 20 mg Produkt, ein oranges Pulver (0.069 mMol, Ausbeute: 41%), erhalten.

Identifizierung des Produktes **12**



Die HPLC-UV-API-ES-MS Analyse vom Rohprodukt zeigte einen einzigen Peak ($\lambda = 210$ nm) bei $t_R = 21.4$ min. Das API-ES-MS Spektrum dieses Peaks zeigte eine einzige Signale um bei $m/z 292.1$ (100%, $[M+H]^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O): d = 2.01 (m, 2H), 2.25 (br, 6H), 4.09 (br, 2H), 4.67 (br, 1H), 7.3 (d, 1H, 8.94), 7.91 (dd, 1H, 8.91, 2.27), 8.31 (d, 1H, 2.23)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,47 MHz, D_2O): d = 26.4 (CH_2), 35.1 (CH_2), 58.3 (CH), 73.6 (CH), 119.4 (CH), 123.3 (C), 127,2 (CH), 133.2 (CH), 137,8 (C), 143,3 (C), 169,8 (C)

Oxidation der Festphasen-gebundenen Nortropinderivates **H12**. Substanz **13**

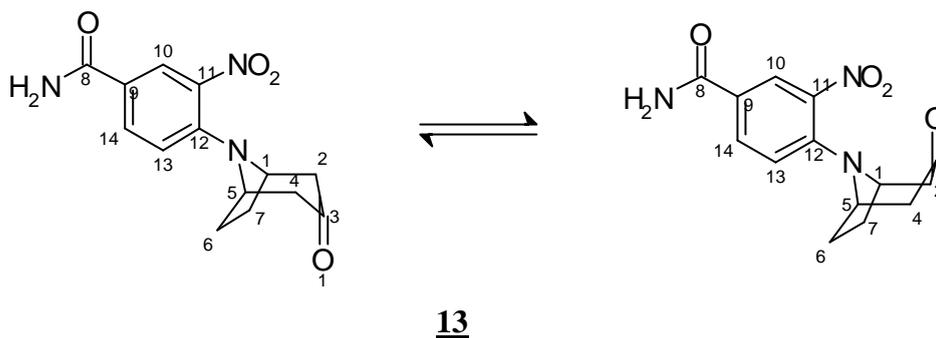
Zum endgültigen Beweis der Struktur des Produktes **12** wurde eine Oxidation der Hydroxy-Gruppe vor der Abspaltung des Nortropinderivates durchgeführt. Diese sollte die selektive nucleophile Addition von Nortropin am festgebundene Fluoro-Aromat durch seine Amino-Gruppe beweisen. Als Ausgangsmaterial wurden 300 mg von mit 4-Fluoro-3-Nitrobenzoesäure derivatisierten Rink-Linker (s. oben *4-Fluor-3-nitrobenzoesäure*) (0.56 mMol/g, 0.168 mMol) verwendet. Nach der Immobilisierung von Nortropin mittels einer nucleophilen aromatischen Substitution (s. oben) wurde anschließend die Oxidation mit Pyridiniumdichromat nach den in dieser Arbeit beschriebenen Protokollen (s. 4.4.3) durchgeführt.

Die Abspaltung der Substanz vom Rink-Linker, dessen Analyse und Aufarbeitung erfolgte analog zu den beschriebenen Synthesen (s. 4.3.3). Es wurden 40 mg Produkt, als orangenes Pulver (0.14 mMol, 83% Ausbeute) erhalten.

Identifizierung des Produktes **13**

Eine Auswertung der erhaltenen ^1H und ^{13}C -NMR Spektren von diesem Molekül ist im Teil 3.4 dargestellt. Hier sind die charakteristische Signale der beiden Analyse in deuteriertem Methanol und in DMSO aufgelistet.

Substanz **13** in Methanol (Konformationsgleichgewicht) (s. Ref: 98 und 3.4)



^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD): d = 1.77-2.18 (m, 8H, Konf. A + 4H Konf B), 2.36 (d, 15.8, 2H, Konf. B H-4,H-2), 2.78 (dd, 16.1, 4, 2H, Konf. B H-4,H-2), 4.04 (br, 2H, Konf. A H-1,H-5), 4.33 (br, 2H, Konf. B H-1,H-5), 7.22 (d, 8.9, 1H, Konf. A H-13), 7.34 (d, 8.8, 1H, Konf. B H-13), 7.94 (dd, 8.9, 2.11, 1H, Konf. A H-14), 8.01 (dd, 8.8, 2.1, 1H, Konf. B H-14), 8.23 (d, 2.1, 1H, Konf. A H-10), 8.31 (d, 2.1, 1H, Konf. B H-10).

^{13}C -NMR (75,47 MHz, CD_3OD): d = 25.2 (Konf. A., C-6,C-7), 27,0 (Konf. B, C-6,C-7), 35.7 (Konf. A, C-2,C-4), 46.5 (Konf. B, C-2,C-4), 55.6 (Konf. A, C-1,C-5), 56.4 (Konf. B, C-1,C-5), 116.7 (Konf.A, C-13), 117,4 (Konf. B, C-13), 123.9 (C-9), 124.9 (Konf. B, C-11), 125.0 (Konf. B, C-11), 130.9 (Konf. A, C-14), 131.2 (Konf. B, C-14), 140.1 (C-11), 170 (C-8), 209.7 (C-3).

Substanz **13** in $\text{DMSO}-d_6$

^1H -NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): d = 1.68 (m, 2H), 2.05 (m, 2H), 2.27 (d, 16, 2H), 2.66 (dd, 16, 4, 2H), 4.26 (br, 2H), 7.37 (d, 9, 1H, H-13), 8.00 (dd, 9, 2, 1H, H-14), 8.3 (d, 2, 1H, H-10).

¹³C-NMR (75,47 MHz, DMSO-d₆): δ = 28.1 (CH₂), 47.4 (CH₂), 56.8 (CH, C-5,C-1), 181.9 (CH), 124.3 (C), 125.8 (CH), 132.6 (CH), 138.5 (C), 142.1 (C), 165.5 (C), 206.9 (C).

5.6.2 Reduktive Aminierung am Tropan Ring und Variierung der Aminekomponent .

Substanzen 14 *endo* und 14 *exo*: 3-Nitro-4-(3-phenethylamino-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-8-yl)-benzamide

Als Ausgangsmaterial wurden 300 mg von dem mit 4-Fluoro-3-Nitrobenzoesäure derivatisierten Rink-Linker (s. oben *4-Fluor-3-nitrobenzoesäure*) (0.56 mMol/g, 0.168 mMol) verwendet. Hiermit wurde das Harz H13 (der Verläufer von 13) synthetisiert (s. 4.6.1).

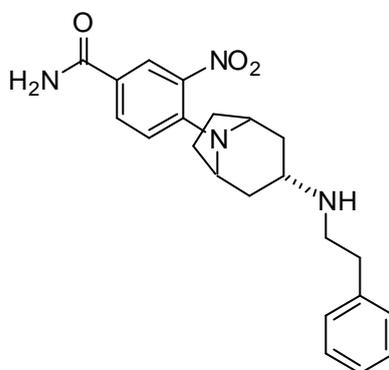
Regioselektive reduktive Aminierung am H13. Synthese von 14endo

H13 wurde in 3 mL einer 0.4 M Lösung aus Benzylamine in DCM suspendiert und für 6 h geschüttelt. Danach wurden 380 mg NaBH(OAc)₃ (1.8 mMol) dazugegeben und die resultierende Suspension für 16 h geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung abfiltriert und das Harz mehrmals mit Methanol, DCM und Ether (je 10 mL) mehrmals gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

Abspaltung vom polymeren Träger und Aufarbeitung

Das Harz wurde in 3 mL einer Lösung aus TFA in DCM (1:1) für 30 min suspendiert. Die Lösung wurde abfiltriert. Danach wurden 100 µl dieser Lösung zur Trockne mit einem Luftstrom eingedampft und der Rückstand für die HPLC Analyse in einer Lösung aus Wasser/ Acetonitril (1:1) gelöst. Das Harz wurde mehrmals mit 3 mL Portionen Methanol und anschließend mit DCM und Ether (je 3 mL) gewaschen. Das Abspaltungsprodukt und das Filtrat wurden vereinigt und unter Vakuum zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 10 mL in einer Mischung aus t-Butylalkohol/ Wasser (1:1) gelöst und lyophilisiert. Das Hauptprodukt wurde dann mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Es wurden 100 mg Produkt, ein oranges Pulver (0.269 mMol, Ausbeute: 48%), erhalten.

Identifizierung des Produktes **14**



14

Die HPLC-UV-MS Analyse des Rohproduktes nach Abspaltung zeigte einen Hauptpeak ($\lambda = 210 \text{ nm}$) bei $t_R = 18 \text{ min}$ (86.8% Reinheit) und ein Nebenprodukt bei 18.2 min. Das API-ES-MS Spektrum beider Peaks zeigte ein einziges Signal $m/z 396$ (100%, $[M+H]^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): d = 1.5 (dd, 12.0, 2H), 1.76 (m, 2H), 2.1 (m, 2H), 2.81 (m, 2H), 2.96 (m, 2H), 3.26 (m, 2H), 3.43 (m, 1H), 4.16 (br, 2H), 7.2 (d, 8.8, 1H), 7.25-7.36 (viele Signale, 5H), 7.94 (dd, 8.8, 2.2, 1H), 8.34 (d, 2.2, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75,47 MHz, CD_3OD): d = 31.6 (CH_2), 33.4 (CH_2), 34.9 (CH_2), 47.7 (CH_2), 50.7 (CH), 56.8 (CH_2), 119.3 (CH, C), 125.6 (C), 127.6 (CH), 128.3 (CH), 129.7 (CH), 130 (CH), 134 (CH), 137.6 (C), 140.5 (C), 146.4 (C), 169.8 (C)

*Nicht selektive reduktive Aminierung am **H13**. Synthese einer Isomeren Mischung von **14endo** und **14exo***

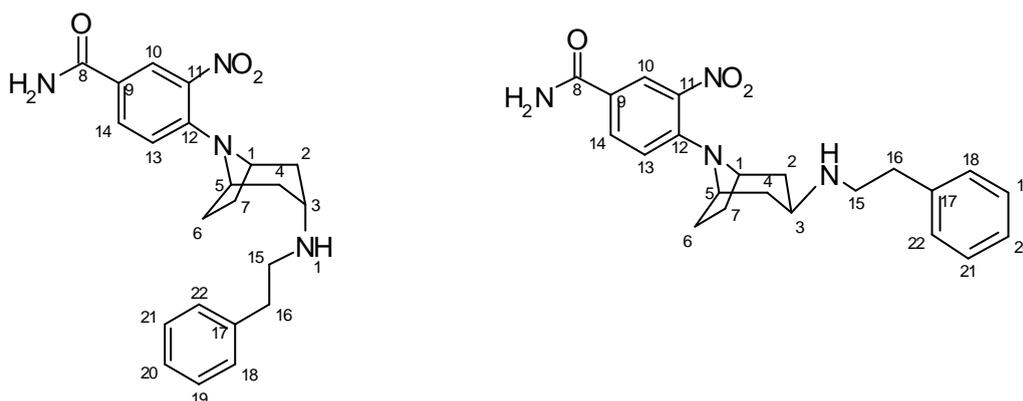
H13 wurde in 3 mL einer 0.4M Lösung Benzylamine in eine Mischung aus DCM und Methanol (9:1) suspendiert und für 6 h geschüttelt. Danach wurden 115 mg Natriumcyanoborhydrid NaBH_3CN (1.8 mMol) dazugegeben und die resultierende Suspension für 16 h geschüttelt. Die

Lösung wurde abfiltriert und anschließend das Harz mit DCM und Ether mehrmals gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

Abspaltung von Polymeren Träger und Aufarbeitung

Für die Abspaltung und Aufarbeitung der verschiedenen Isomeren wurde das gleiche Protokoll wie bei der Synthese von **14endo** (s. oben) verfolgt. Beide Isomeren wurden wegen ihrer ähnlichen Retentionszeit bei der präparativen HPLC in der gleichen Fraktion gesammelt. (s. 4.3.3). Es wurden 80 mg Isomerengemisch, ein oranges Pulver (0.203 mMol, Ausbeute: 38%), erhalten.

*Identifizierung der Isomeren **14-endo** und **14-exo***



14-endo und **14-exo**

Der Vergleich mit dem $^1\text{H-NMR}$ des **14-endo** Isomers erlaubte die Identifizierung der Signale der H-3 und H-10 Atome im Isomerengemischspektrum. Nach Integration dieser charakteristischen $^1\text{H-NMR}$ Signale erhielt man ein endo zu exo Verhältnis von 0.4 : 0.6 der Isomeren im Isomerengemisch erfolgen. Tabelle 5.2 stellt den Vergleich beider Spektren und deren Berechnung dar.

Wasserstoff-atom	<u>14-Endo</u>	<u>14-endo+14-exo</u>	Integration	Verhältniss im Gemisch
H-3	3.43 (m)	3.41 (m)	3.65 (m)	0.4 : 0.6
H-10	8.34 (d, 2.2)	8.33 (br)	8.26 (br)	0.4 : 0.6

Tabelle 5.2 Identifizierung von charakteristischen Signalen im ^1H Spektrum einer Mischung von 14-endo und 14-exo Isomeren zur Berechnung des Verhältnis beider Isomeren

Bei der Analyse des ^{13}C -NMR Spektrums konnten durch Vergleich diejenigen Signale, die sich auf das **14-endo** Isomer beziehen, identifiziert und zugeordnet werden. Die erhaltenen Daten sind in guter Übereinstimmung mit anderen strukturell ähnlichen Substanzen. In Tabelle 5.3 ist der Vergleich der ^{13}C -NMR Spektrum der Isomerenmischung und die Identifizierung und Zuordnung der Signale vom **14-exo** dargestellt.

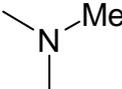
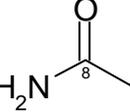
Kohlenstoff	<u>12</u>	Tropin (45)	<u>14-endo</u>	<u>14endo+14exo</u>	<u>14-exo</u>
C-1	58,4	60,0	56.8	58.22, 56.78	58.22
C-2	35,1	39,6	34.99	34.96, 34.36	34.36
C-3	73,6	64,5	50.76	51.75, 50.74	51.75
C-4	35,1	39,6	34.99	34.96, 34.36	34.36
C-5	58,4	60,0	56.8	58.22, 56.78	58.22
C-6	26,5	25,8	31.69	31.68, 28.00	28.00
C-7	26,5	25,8	31.69	31.68, 28.00	28.00
		40,4			
	169,8		170.0	169.7	169.7
C-9	123,3		125.67	125.7, 126	126
C-10	127,4		127.63	127.64, 127.48	127.48
C-11	137,8		140.45	140.40	140.40
C-12	143,4		146.38	146.38, 144.48	144.48
C-13	119,5		119.39	119.7, 119.38	119.7
C-14	133,26		134.01	134.01, 133.70	133.70
C-15			47.78	48.15, 47.18	48.15
C-16			33.46	33.60, 33.44	33.60
C-17			137.57	137.70, 137.60	137.70
C-18, C-22			129.73	129.71	129.71
C-19, C-21			130.03	130.02	130.02
C-20			128.37	128.35	128.35
Lösungsmittel	D ₂ O	CDCl ₃	CD ₃ OD	CD ₃ OD	CD ₃ OD

Tabelle 5.3 Vergleich der ^{13}C -NMR Spektrum von strukturell ähnliche Substanzen und vom **14-endo zur Identifizierung und Zuordnung der Signale im ^{13}C -NMR Spektrum des Gemisch **14-endo** und **14-exo****

Variierung der Aminekomponent

10 mg **H13** wurden nach der Reaktion je in 1 mL einer 0.4M Lösung verschiedener Aminkomponenten in DCM suspendiert und für 6 Stunden geschüttelt. Danach wurden 38 mg NaBH(OAc)₃ (0.2 mMol) dazugegeben und die resultierende Suspension für 16 h geschüttelt. Die Harze wurden mehrmals mit Methanol, DCM und Diethylether (je 5 mL) gewaschen und getrocknet.

Die Harze wurden anschließend in 1mL Lösung aus TFA in DCM (1:1) suspendiert und für 30 min geschüttelt. Die Abspaltungslösungen wurden in HPLC Fläschen gesammelt und im Luftstrom getrocknet. Der Rückstand wurde dann in 400µl einer Mischung 1:1 Wasser/ Acetonitril aufgenommen und mittels HPLC analysiert.

5.6.3 Reduktion der Nitrogruppe des chemisches Markers und Acylierung des resultierenden Anilins. Substanz 15: 3-Amino-4-(3-oxo-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-8-yl)-benzamide

Als Ausgangsmaterial wurden 300 mg von dem mit 4-Fluoro-3-Nitrobenzoesäure derivatisierten Rink-Linker (s. oben *4-Fluor-3-nitrobenzoesäure*) (0.56 mMol/g, 0.168 mMol) verwendet. Nach der Immobilisierung von Nortropin mittels einer nucleophilen aromatischen Substitution (s. 4.4.3, *Nucleophile Substitution*) wurde die Oxidation mit Pyridiniumdichromat nach den in dieser Arbeit beschriebenen Protokollen (s. 4.4.3) durchgeführt. Anschließend wurde das Harz mehrmals mit DMF (je 10 mL) gewaschen.

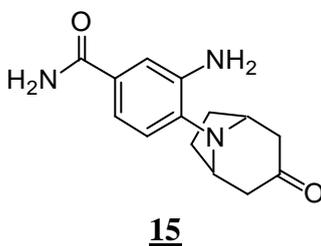
Reduktion der Nitro-Gruppe

Das Harz wurde in 3 mL einer 0.4M Lösung SnCl_2 in DMF suspendiert. Die Suspension wurde für 16 h geschüttelt und anschließend mehrmals mit DMF und Ether gewaschen und getrocknet.

Abspaltung vom polymeren Träger und Aufarbeitung

Die Abspaltung von der Substanz am Rink-Linker, sowie deren Analyse und Aufarbeitung erfolgte analog zu den oben beschriebenen Synthesen (s. 4.3.3). Es wurden 3 mg Produkt, ein oranges Pulver (0.012 mMol, Ausbeute: 2%), erhalten.

Identifizierung des Produktes 15



Das HPLC-UV-MS Chromatogramm zeigte einen sauberen Peak ($\lambda = 210$ nm) bei $t_R = 7$ min (Reinheit: 85%). Das API-ES-MS Spektrum dieses Peaks zeigte ein einziges Signal bei m/z 260.0 (100%, $[\text{M}+\text{H}]^+$). Eine Zuordnung aller $^1\text{H-NMR}$ Signale war schwierig. Es wurde angenommen, daß wie bei 15 die Anwesenheit von zwei Konformeren in Lösung möglich ist. Die Integration und die Kopplungskonstanten der Signale in Aromaten-Bereich erlauben die Berechnung eines Verhältnis von 0.75 : 0.25 der Isomere (A:B).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): d = 1.72-1.85 (br, 2H), 2.11-2.23 (br, 2H), 2.30-2.42 (br, 2H), 2.85-2.95 (br, 2H), 4.01-4.11 (br, 2H), 6.96 (d, 8.9, Konf. A), 7.18 (d, 8.4, Konf. A), 7.66 (m, Konf. A), 7.72 (d, 1.7, Konf. A), 7.81 (dd, 8.9, 2, Konf. B), 8.62 (d, 2, Konf. B).

Die Auswertung aller Signale in ^{13}C -NMR Spektrum war wegen der kleinen Menge an Substanz schwierig. Das ^{13}C -NMR Spektrum zeigte jedoch ein deutliches Signal bei 210 ppm des Ketons am Tropanring und bei 175 ppm des Amids. Der Vergleich mit den Spektren von Tropin, Nortropanon (s. ref. 66), **12** und **13** und ein DEPT-Versuch erlaubte eine Zuordnung der Signale des anteilig größeren Konformers. Die strukturelle Ähnlichkeit dieser Verbindungen ist in folgendem Bild illustriert. Der Vergleich der ^{13}C -NMR Spektren aller dieser Substanzen ist in Tabelle 5.4 veranschaulicht.

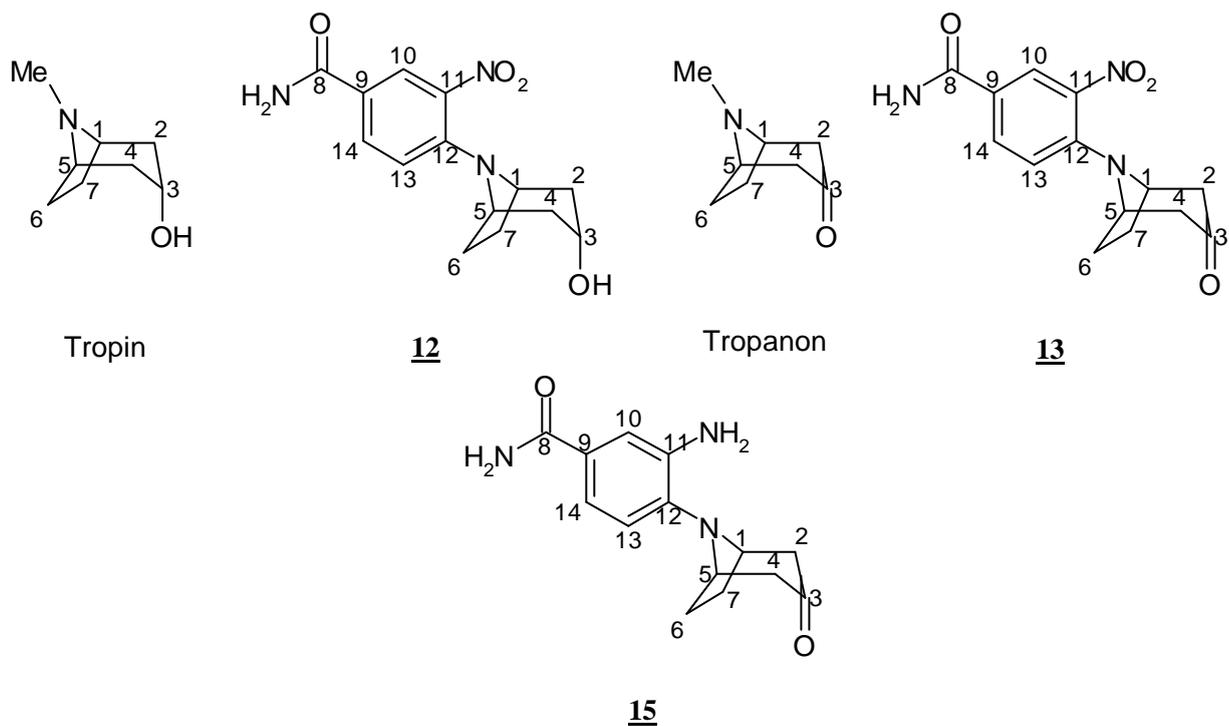


Bild 5.3 Struktur von verschiedenen strukturell ähnlichen Verbindungen von **15**

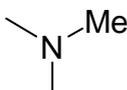
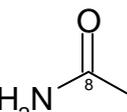
Kohlenstoff	<u>12</u>	Tropin (45)	Tropanone (45)	<u>13</u>	<u>15</u>
C-1	58,4	60,0	60,9	55,6: 56,5	58.41 (CH)
C-2	35,1	39,6	47,6	35,8: 46,5	47.09 (CH ₂)
C-3	73,6	64,5	208,2	209,7	210
C-4	35,1	39,6	47,6	35,7: 46,5	47.09 (CH ₂)
C-5	58,4	60,0	60,9	55,6: 56,5	58.41 (CH)
C-6	26,5	25,8	27,9	25,3: 27,0	27.54 (CH ₂)
C-7	26,5	25,8	27,9	25,3: 27,0	27.54 (CH ₂)
		40,4	38,4		
					
			208,2	209,7	210
	169,8			170,0	175
C-9	123,3			123,9	Unklar
C-10	127,4			124,0: 125,1	125.41 (CH)
C-11	137,8			140,1	146
C-12	143,4			144,5: 144,6	150
C-13	119,5			120,0: 119,3	117.44 (CH)
C-14	133,26			133,7: 133,5	132.83 (CH)
Lösungs-mittel	D ₂ O	CDCl ₃	CDCl ₃	CD ₃ OD	CD ₃ OD

Tabelle 5.4 Zuordnung der Signale im ¹³C Spektrum der Substanz 15 durch Vergleich mit den Spektren von strukturell ähnlichen Verbindungen

Untersuchung verschiedener Acylierungsreagenzien bei der Acylierung des Festphasen-gebundenen Substanz H15. Substanzen 17R

Für die Acylierung des Festphasen-gebundenen **H15** wurden jeweils 10 mg in jedem Ansatz verwendet. Die gleiche Reaktionssequenz wie bei der Synthese von **15** wurde wiederholt und vor dem letzten Abspaltungsschritt je nach Ansatz in einer 0.4 M Lösung verschiedener Acylierungsreagenzien und 0.6 M in DIPEA in DCM suspendiert.

Nach der Reaktion wurden die Harze abfiltriert und mit DMF, DCM und Diethylether gewaschen. Die Abspaltung erfolgte mit 1 mL einer Lösung aus TFA in DCM (1:1). Nach 30 min wurde die Abspaltungslösung abfiltriert und mit einem Luftstrom zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in 1mL einer Mischung 1:1 Wasser/ AcCN aufgenommen und mittels HPLC-MS untersucht.

5.7 Synthese von Naturstoffhybriden und makrozyklischen Derivaten

5.7.1 Einführung einer selektiv derivatisierbaren Verzweigungsstelle nach dem chemischen Markern. CM4

Kopplung der N_α -Fmoc- N_γ -Mtt-Lysin am chemischen Markern

Zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe des mit dem chemischen Marker derivatisierbares Harzes, (s. 4.3.4) wurde das Harz in einer Lösung 20% (v/v) von Piperidine in DMF (1mL Lösung per 100mg Harz) suspendiert und für 1 Stunde geschüttelt. Das Harz wurde danach mehrmals mit DMF gewaschen. Die Fmoc-Quantifizierung ein kleines Teil dieses Harzes (10 mg) bewies die vollständige Beseitigung der Fmoc-Gruppe.

Die Kopplung des Aminosäures erfolgte durch die Reaktion dieses Harzes in einer 0.4 M Lösung Aminosäure und 0.6 M Lösung DIC in DMF für 16 h Anschließend wurde das Harz mehrmals mit DMF gewaschen und mit DCM und Diethylether gewaschen und getrocknet. Die vollständige Acylierung der festgebundenen Amino-Gruppe des chemischen Markers wurde mittels dem Chloranil Test (s. 4.2.5) überprüft. Ein kleiner Teil des Harzes (10mg) wurde in einer Lösung 1:1 TFA in DCM für 30 min suspendiert. Die Lösung wurde filtriert und in einer HPLC Flasche das

Lösungsmittel und TFA mit einem Luftstrom verdampft. Der Rückstand wurde in einer Mischung 1:1 AcCN/ Wasser aufgenommen und mittels HPLC-UV-MS untersucht. Das Chromatogramm zeigte zwei Peaks die dem Edukt chemischen Marker-Fmoc-Lys bzw. der Mtt-Schutzgruppe zugeordnet sind (s.Kap. 3.5, Tabelle 3.5,1).

Selektive Abspaltung der Harz gebundenen N^ε-Mtt Gruppen

Das Harz (50 mg) wurde in 1 mL einer Lösung 5% TFA und 1% TES in DCM für 5 min suspendiert. Danach wurde das Harz von der Abspaltungslösung abfiltriert. Dieses Prozeß wurde fünf mal wiederholt. Anschließend wurde das Harz mehrmals mit DCM und Diethylether gewaschen und getrocknet. Die Quantifizierung der Fmoc-Gruppen (s. 4.2.6) auf 10 mg des Harzes zeigt daß kein wesentlicher Verlust am festgebundenen chemischen Marker-Fmoc-Lys stattfand. Ein kleiner Teil des Harzes (10mg) wurde in einer Eppendorf Kuvette in einer Lösung 1:1 TFA in DCM suspendiert und für 30 min geschüttelt. Anschließend wurde die Abspaltungslösung abfiltriert und mit HPLC-UV-API-ES-MS analysiert. Das Chromatogramm zeigte die vollständige Abwesenheit des Mtt-Gruppe zugehörigen Peaks (s. Kap. 3.5, Tabelle 3.5.1).

5.7.2 Synthese eines Naturstoffhybrides

Kopplung von 18-Hydroxyprogesteron Hemisuccinat

An 100 mg des mit dem chemischen Marker derivatisierten Harzes (s. 4.3.4) wurde N_α-Fmoc-N_ε-Mtt-Lysin als Verzweigungsstelle gekoppelt (s. oben). Danach wurde die Fmoc-Gruppe am Na des festgebundenen chemischen Marker Eduktes mit 3 mL einer Lösung 20% (v/v) von Piperidin in DMF wie üblich abgespalten (s.4.3.3, *Abspaltung der Fmoc Gruppe*). Das Harz wurde anschließend in 3mL einer 0.4M Lösung 21-Hydroxyprogesteronhemisuccinat, 0.4M HOBT, 0.6 M DIC und 0.01M DMAP in DMF suspendiert und für 16 Stunden geschüttelt. Dann wurde das Harz abfiltriert und mehrmals mit DMF gewaschen. Ein kleiner Teil des Harzes (10mg) wurde mit DCM und Ether gewaschen und getrocknet. Der Chloranil Test auf diesem Teil zeigte die vollständige Acylierung am Lysins-Na des festgebundenen chemischen Marker-Lys Eduktes.

Kopplung von Nortropin

Die Mtt-Gruppe wurde wie beschrieben abgespalten (s oben, *selektive Abspaltung der Harz gebundenen N²-Mtt Gruppe*). Das Harz wurde mit DCM und Diethylether gewaschen und getrocknet. Ein kleiner Teil des Harzes (10mg) in DCM wurde in 1mL einer Mischung 1:1 TFA in DCM für 30min suspendiert und die Abspaltungslösung zur Verfolgung der Synthese mit HPLC-UV-API-ES-MS analysiert. Das Chromatogramm zeigte ein Hauptpeak ($\lambda = 210$ nm) um $t_R = 30.0$ min (Reinheit 90%). Die API-ES-MS Spektrum dieses Peaks zeigte zwei Peaks (m/z 805.7 (100%, $[M+H]^+$) und m/z 402.2 (60%, $[M+2H]^{++}$). Dies was in guter Übereinstimmung mit der Formation des folgenden festgebundenen Zwischenproduktes.

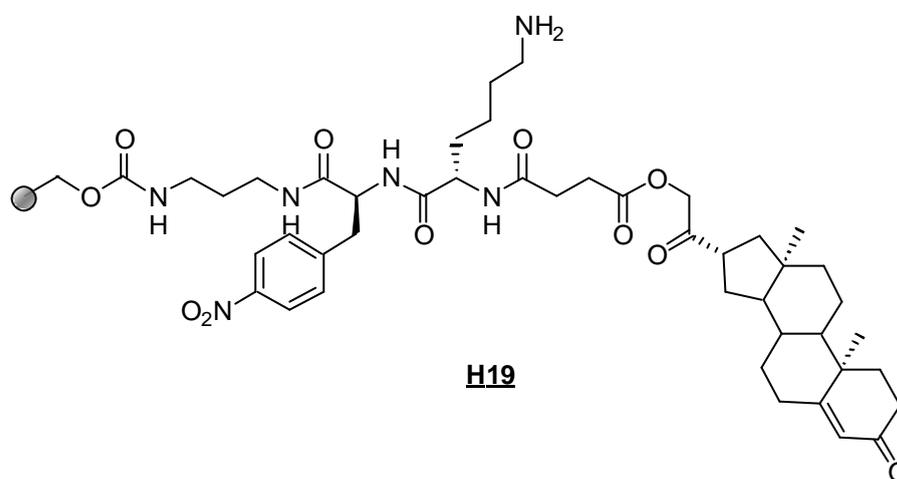


Bild 5.4 Festgebundenes Zwischenprodukt bei der Synthese eines 18-β-Hydroxiprogesteron-Nortropin Hybrides

Zur Acylierung der freien Amino-Gruppe am N² dieses Derivates wurde das Harz in einer 0.4 M Lösung Bromessigsäure und 0.6 M DIC in DMF suspendiert und für 16 h geschüttelt. Ein kleiner Teil des Harzes wurde mit DCM und Diethylether gewaschen und getrocknet. Ein negativer Chloranil Test dieses Harzes bewies die vollständige Reaktion aller festgebundenen Amino-Gruppen. Das Harz wurde in einer 0.4 M Lösung Nortropin in DMF suspendiert und für 16 h geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mehrmals mit DMF und DCM und Diethylether gewaschen und getrocknet. Nach der Reaktion eines kleines Teil des Harzes mit einer Lösung 1:1 TFA in DCM wurden die Abspaltungslösungen mittels HPLC-UV-API-ES-MS analysiert. Das Chromatogramm zeigte ein Hauptpeak ($\lambda = 210$ nm) um $t_R = 28.06$ min (Reinheit = 85%). Das API-ES-MS Spektrum dieses Peaks zeigte zwei Peaks (m/z 974.5 (100%, $[M+H]^+$) und m/z 487.7 (90%,

[M+2H]⁺⁺). Dies war in guter Übereinstimmung mit der Formation des folgenden festgebundenen Naturstoffhybrides.

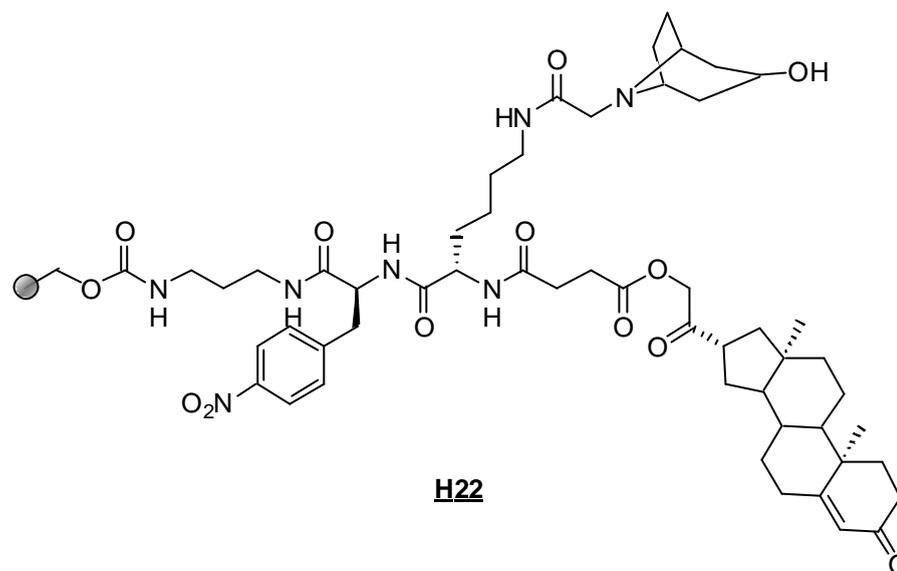


Bild 5.5 Festgebundenes 18- β -Hydroxyprogesteron-Nortropin Hybrids

5.7.3 Synthese von einem makrozyklischen Nortropin Derivat

An 100 mg des mit dem chemischen Marker derivatisierten Harzes (s. 4.3.4) wurde N_a-Fmoc-N₇-Mtt-Lysin als Verzweigungsstelle gekoppelt (s. oben). Danach wurde die Fmoc Gruppe am N_a mit 3 mL einer Lösung 20% Piperidin in DMF wie üblich abgespalten (s.4.3.3, *Abspaltung der Fmoc Gruppe*). Das Harz wurde danach in 3mL einer 0.4 M Lösung 4-Bromvaleriansäure, 0.4M HOBt, 0.6 M DIC und 0.01M DMAP in DMF suspendiert und für 16 h geschüttelt. Das Harz wurde mehrmals mit DMF gewaschen und anschließend in 3 mL einer 0.4 M Lösung Nortropin in DMF suspendiert und für 16 h geschüttelt. Ein kleiner Teil des Harzes wurde in einer Mischung 1:1 TFA in DCM suspendiert. Nach 30min wurde die Abspaltungslösung mittels HPLC-UV-API-ES-MS analysiert. Das erhaltene Chromatogramm zeigte zwei Peaks, einer von diesen auf die Mtt-Gruppe bezogen (s. Kap. 3.5, Tabelle 3.5.1). Ein Peak um t_R = 13.9 min sprach für die Formation eines festgebundenen Nortropinderivat. Das API-ES-MS Spektrum dieses Peaks zeigt

zwei Peaks um m/z 604 (100%, $[M+H]^+$) und m/z 302.6 (60%, $[M+2]^{++}$). Das ist in guter Übereinstimmung mit folgendem Zwischenprodukt.

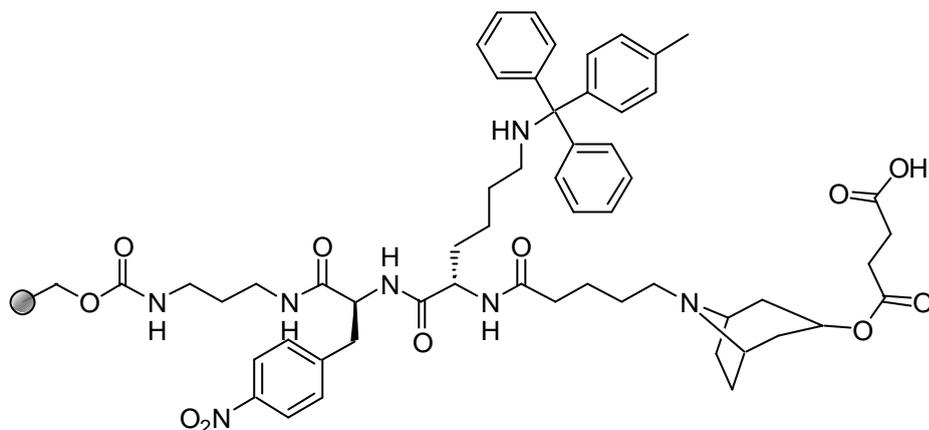


Bild 5.6 Festgebundenes Zwischenprodukt bei der Synthese eines makrozyklischen Nortropin Derivates

Zur Acylierung der Hydroxylgruppe von Nortropin wurde das Harz in 3mL einer 0.4 M Lösung in Bernsteinsäureanhydrid und 0.1 M DMAP in Pyridin suspendiert. Das Harz wurde für 40 Stunden geschüttelt und anschließend mit Pyridin, DMF, DCM und Diethylether gewaschen und getrocknet. Zur Verfolgung der Reaktion wurden 10 mg Harz entnommen und in einer Mischung 1:1 TFA in DCM für 30 min suspendiert. Die HPLC-UV-MS Analyse der Abspaltungslösung zeigte zwei Hauptpeaks. Einer von denen, bei $t_R = 39.4$ min, bezog sich auf die Mtt-Gruppe (s. Kap 3.5; Tabelle 3.5.3). Das Peak um $t_R = 18.8$ sprach für die Formation folgendes festgebundenes Zwischenprodukt.

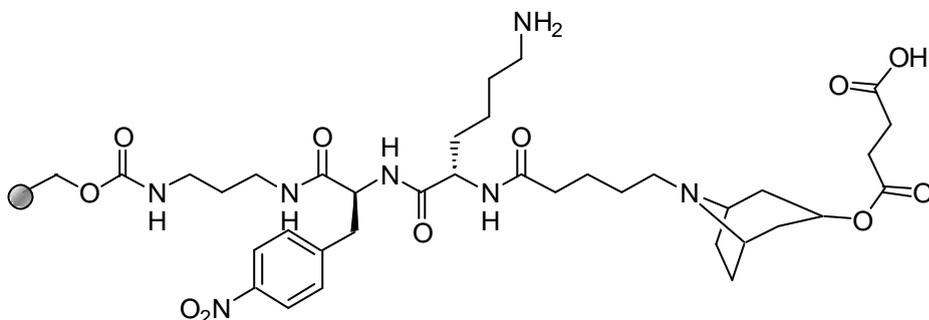


Bild 5.7 Festgebundenes Zwischenprodukt bei der Synthese eines makrozyklischen Nortropin Derivates

Zur anschließender Makrozyklisierung des festgebundenen Nortropin Derivat wurde die Mtt-Gruppe am N_7 wie beschrieben beseitigt (s. 4.7.1, *Selektive Abspaltung der Harz gebundenen*

N-Mtt Gruppen). Danach wurde das Harz in 3mL einer 0.4 M Lösung HOBt und 0.6 M DIC in DMF suspendiert und für 40 Stunden geschüttelt. Der Chloranil Test eines kleinen Teil des Harzes wurde negativ. Das Harz wurde mehrmals mit DMF und DCM gewaschen und in 3mL einer Lösung 1:1 TFA in DCM suspendiert. Die Lösung wurde abfiltriert und das Harz mehrmals mit DCM gewaschen. Das Filtrat wurde unter Vakuum getrocknet und der Rückstand in einer Mischung 1:1 Wasser/ AcCN aufgenommen. Die Lösung wurde mittels HPLC-UV-API-ES-MS analysiert. Das Chromatogramm zeigte mehrere Peaks mit ähnliche t_R . Die Bearbeitung des API-ES-MS Chromatogramm (Massfilter zwischen m/z 680 und m/z 694) erlaubte die Identifizierung des Produktes um $t_R = 19.2$ min Die Isolierung des Profuktes mittels präparativer HPLC ergab eine kleine Menge an Substanz (etwa 1mg). Die Untersuchung des Produktes mit Hochauflösender Massenspektroskopie zeigte die Anwesenheit der Masse m/z 686.39099 ($\Delta m = -3.2$ mmu), die der erwarteten molekularen Zussammensetzung entspricht (C: 34, H: 52, N:7, O: 8).

6 Literatur

1. BOHM, H. -J.; KLENBE, G. & KUBINY, H. 1996. *Wirkstoffdesign*. Spektrum Akademischer Verlag.
2. DREWS, J. 2001. Drug Discovery: A Historical Perspective. *Science*, 287. 1960-1964.
3. JUNG, G. (Ed.) 1996. *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*. Wiley- VCH, Weinheim.
4. MERRIFIELD, R. B. 1963. Solid Phase Peptide Synthesis.I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85, 2149-2151.
5. GRABLEY, S. & THIERICKE, R. (Eds.). 1999. *Drug Discovery from Nature*. Springer-Verlag, Heidelberg.
6. SCHMID, I.; SATTLER, I.; GRABLEY, S. & THIERICKE, R. 1999. Naturstoffe im Hochdurchsatz-Screening, Teil 1: Methodenentwicklung und Automatisierung. *BIOforum* 22, 17-20.
7. KUNZ, R. W. 1991. *Molecular Modelling für Anwender*. Teubner Studienbücher.
8. MARTIN, E. J.; BLANEY, J. M.; SIANI, M. A.; SPELLMEYER, D. C.; WONG, A. K.; & MOOS, W. H. 1995. Measuring Diversity: Experimental Design of Combinatorial Libraries for Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 1431-1436.
9. MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A. M.; MITTERMEIER, C. G.; DE FONSECA, G. A. B. & KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858.
10. LOZOYA, X. 1997. Pflanzliche Arzneimittel gestern und heute. *Spektrum der Wissenschaft*, Spezial 6: Pharmaforschung, 10-16.
11. LEZNOFF, C. C. 1978. The Use of Insoluble Polymer Supports in General Organic Synthesis. *Accounts of Chemical Research*, 11, 327-333.
12. NOVABIOCHEM 1999. Solid Phase Organic Synthesis Notes. *The Combinatorial Chemistry Catalogue*. <http://www.nova.ch>, e-mail: uk@nova.ch.
13. NEFZI, A.; OSTRESH, J. M. & HOUGHTEN, R. A. 1997. Combinatorial Chemistry. *Chemical Reviews*, 97 (2), 449-464.
14. BOOTH, S.; HERMKENS, P. H. H.; OTTENHEIJM, H. C. J. & REES, D. C. 1998. Solid-Phase Organic Reactions III. *Tetrahedron*, 54, 15385-15397

15. BALDWIN, J. J. & HENDERSON, I. 1996. Recent Advances in the Generation of Small-Molecule Combinatorial Libraries. *Medicinal Research Reviews*, 16, 391-395.
16. THOMPSON, L. A. & ELLMAN, J. A. 1996. Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries. *Chemical Reviews*, 96, 555-587.
17. MELDAL, M. 1997. Properties of Solid Supports. *Methods of Enzymology; Solid-Phase Peptide Synthesis*, 289, 83-104. Ed. G. B. Fields. Academic Press, New York.
18. HUDSON, D. 1999. Matrix Assisted Synthetic Transformations: A Mosaic of Diverse Contributions. I. The Pattern Emerges. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 1 (5), 333-360.
19. HUDSON, D. 1999. Matrix Assisted Synthetic Transformations: A Mosaic of Diverse Contributions. II. The Pattern Is Completed. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 1 (6), 403- 457.
20. LAMBERT, J. L.; MITCHELL, J. P. & ROBERTS, K. D. 2001. The synthesis of cyclic peptides. *Journal of the Chemical Society; Perkins Transactions*, 1, 471-484.
21. BLACKBURN, C. & KATES, S. A. 1997 Solid-Phase Synthesis of Cyclic Homodetic Peptides in *Methods in Enzymology, Solid Phase Peptide Synthesis*, 289. 175- 198. Ed. G. B. Fields. Academic Press.
22. ATRASH, B.; BRADLEY, M.; KOBYLECKI, R.; COWELL, D. & READER, J. 2001. Revolutionizing Resin Handling for Combinatorial Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 40 (5), 938-941.
23. GUTTE, B. & MERRIFIELD, R. B. 1971. *Journal of Biological Chemistry*, 6, 1922-1941.
24. RAPP, W. 1996. PEG Grafted Polystyrene Tentacle Polymers: Physico- Chemical Properties and Application in Chemical Synthesis. *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries*. Ed. G. Jung. Wiley- VCH, Weinheim.
25. GUILLIER, F.; ORAIN, D. & BRADLEY, M. 2000. Linkers and Cleavage Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis and Combinatorial Chemistry. *Chemical Reviews*, 100, 2091-2157.
26. WANG, S. 1973. p- Alkoxybenzyl Alcohol Resin and p- Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments. *Journal of the American Chemical Society*, 95 (4), 1328- 1333.
27. RINK, H. 1987. Solid-Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments Using A Trialkoxy- Diphenyl- Methylene Resin. *Tetrahedron Letters*, 28 (33), 3787- 3790.

28. YAN, B. 1998. Monitoring the Progress and the Yield of Solid-Phase Organic Reactions Directly on Resin Supports. *Accounts on Chemical Research*, 31, 621-630.
29. EGNER, B. J. & BRADLEY, M. 1997. Analytical techniques for solid-phase organic and combinatorial techniques. *Drug Discovery Today*, 2, 102-109.
30. LINDSEY, J. S. 1997. Automated Approaches to Reaction Optimization in *A Practical Guide to Combinatorial Chemistry*. Ed. A. W. Czarnik & S. H. DeWitt. American Chemical Society.
31. BRAY, A. M.; CHIEFARI, D. S.; VALERIO, R. M. & MAEJI, N. J. 1995. Rapid Optimization of Organic Reactions on Solid Phase using the Multipin Approach: Synthesis of 4-Aminoproline Analogues by Reductive Amination. *Tetrahedron Letters*, 36 (28), 5081-5084.
32. FITCH, W. L. 1999. Analytical methods for the quality control of combinatorial libraries *Molecular Diversity*, 4, 39-45.
33. MANT, C. T. 1997. Analysis of Synthetic Peptides by High Performance Liquid Chromatography. *Methods in Enzymology; Solid Phase Peptide Synthesis*, 289. Ed. G. B. Fields. Academic Press.
34. DULEÉRY, B. D.; VERNE-MISMER, J.; WOLF, E.; KUGEL, C. & VAN HIJFTE, L. 1999. Analyses of compound libraries obtained by high-throughput parallel synthesis: strategy of quality control by high-performance liquid chromatography, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance techniques. *Journal of Chromatography B*, 725, 39-47.
35. SÜBMUTH, R. D. & JUNG, G. 1999. Impact of mass spectrometry on combinatorial chemistry. *Journal of Chromatography B*, 725, 49-65.
36. VIRGILIO, A. & ELLMAN, J. A. 1994. Simultaneous Solid-Phase Synthesis of β -turn Mimetics Incorporating Side-Chain Functionality. *Journal of the American Chemical Society*, 116, 11580-11581.
37. BRADLEY, M. 1998. Cleavage and Analysis of Material from Single Resin Beads. *Journal of Organic Chemistry*, 63 (19), 6430-6431.
38. JÖNNSON, D.; MOLIN, H. & UNDÉN, A. 1998. Solid Phase Synthesis of Tropane Derivatives. *Tetrahedron Letters*, 39, 1059-1062.
39. ATUEGBU, A.; MACLEAN, D.; NGUYEN, C.; GORDON, E. M. & JACOBS, J. W. 1996. Combinatorial Modification of Natural Products: Preparation of Unencoded and Encoded Libraries of *Rauwolfia* Alkaloids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 4 (7), 1097-1106.

40. EGNER, B. J.; LANGLEY, G. J.; BRADLEY, M. 1995. Solid Phase Chemistry: Direct Monitoring by Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. A Tool for combinatorial Chemistry. *Journal of Organic Chemistry*, 60 2652-2653.
41. STREGE, M. A. 1999. High-performance liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening. *Journal of Chromatography B*, 725, 67-78.
42. BUDZIKIEWICZ, H. 1998. *Massenspektrometrie: Eine Einführung*. 4^{te} Auflage. VCH Weinheim.
43. KOENIGBAUER, M. J. 1995. Automation in HPLC and GC. Column Transfer Techniques. *Automation in the Laboratory*, 122-146. Ed. W. Hurst. VCH Publishers Inc.
44. CARRASCO, M. R.; FITZGERALD, M. C.; ODA, Y. & KENT, S. B. H. 1997. Direct Monitoring of Organic reactions on Polymeric Supports. *Tetrahedron Letters*, 38 (36), 6331-6334.
45. ZAMBIAS, R. A.; BOULTON, D. A. & GRIFFIN, P. R. 1994. Microchemical Structural Characterization of a Peptoid Covalently Bound to a polymeric Bead by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Tetrahedron Letters*, 35 (25), 4283-4286.
46. McKEOWN, S. C.; WATSON, S. P.; CARR, R. A. E. & MARSHALL, P. 1999. A photolabile carbamate based dual linker analytical construct for facile monitoring of solid phase chemistry: 'TLC' for solid phase?. *Tetrahedron Letters*, 40 (12), 2407-2409.
47. GOTTWALD, W. 1993. *RP-HPLC für Anwender*. VCH Weinheim.
48. HIROSHIGE, M.; HAUSKE, J. R. & ZHOU, P. 1995. Palladium-Mediated Macrocyclization on Solid Support and Its Applications to Combinatorial Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 117, 11590-11591.
49. XIAO, Z. 1995. Design and Synthesis of a Taxoid Library Using Radiofrequency Encoded Combinatorial Chemistry. *Journal of Organic Chemistry*, 60, 6029-6035.
50. BOYCE, R.; LI, G.; NESTLER, P.; SUENAGA, T. & STILL, W. C. 1994. Peptidosteroidal Receptors for Opioid Peptides. Sequence-Selective Binding Using a Synthetic Receptor Library. *Journal of the American Chemical Society*, 116, 7955-7956.

51. NAGY, A.; ARMATIOS, P.; CAI, R.; SZEPESHAZY, K.; HALMOS, G. & SCHALLY, A. V. 1997. Design, Synthesis, and *in vitro* evaluation of cytotoxic analogs of bombesin-like peptides containing doxorubicin or its intensely potent derivative, 2-pyrrolinodoxorubicin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94, 652-656.
52. ALBERICIO, F. & CARPINO, L. A. 1997. Coupling Reagents and Activation. *Methods in Enzymology; Solid Phase Peptide Synthesis*, 289. Ed. G. B. Fields. Academic Press.
53. BODANSZKY, M. 1988. *Peptide Chemistry, A practical textbook*. 2^{te} Auflage. Springer-Verlag.
54. BIRCH-HIRSCHFELD, E.; FOELDES-PAPP, Z.; GUEHRS, K.-H. & SELIGER, H. 1996. Oligonucleotide Synthesis on Polystyrene-Grafted Poly(tetrafluoroethylene) Support. *Helvetica Chimica Acta*, 79 (1), 137-150.
55. FRUCHART, J.-S.; GRAS-MASSE, H. & MELNYK, O. 1999. A New Linker for the Synthesis of C-Terminal Peptide α -Oxo-aldehydes. *Tetrahedron Letters*, 40 (34), 6225-6228.
56. DEVRAJ, R. & CUSHMAN, M. 1996. A Versatile Solid Phase Synthesis of Lavendustin A and Certain Biologically Active Analogues. *Journal of Organic Chemistry*, 61 (26), 9368-9373.
57. WANG, F. & HAUSKE, J. R. 1997. Solid-Phase Synthesis of Benzoxazoles via Mitsunobu Reaction. *Tetrahedron Letters*, 38 (37), 6529-6532.
58. STROCKER, A. M.; KEATING, T. A.; TEMPEST, P. A. & ARMSTRONG, R. W. 1996. Use of a Convertible Isocyanide for Generation of Ugi Reaction Derivatives on Solid Support: Synthesis of α -Acylaminoesters and Pyrroles. *Tetrahedron Letters*, 37 (8), 1149-1152.
59. LANTER, C. L.; GUILLES, J. W. & RIVERO, R. A. 1999. The Solid Phase Synthesis of Novel 14-Membered Macrocycles for High Throughput Screening. *Molecular Diversity*, 4 (2), 149-153.
60. EBNÖTER, W. 1958. Über die Mutarrotation des Lobelins. Cis-trans-isomere in der Reihe de Lobelia-Alkaloide. *Helvetica Chimica Acta*, 41, Fasciculus II (48), 386-396.
61. MEKKAWI, A. G.; AL-BADR, A. 1987. Yohimbine. *Analytical Profiles of Drug Substances*, 16, 731- 769. Academic Press.
62. MUHTADI, F. J. 1990. Analytical Profile of Lobeline Hydrochloride. *Analytical Profiles of drug Substances*, 19, 261-313. Academic Press.

63. CAREY, F. A. & SUNDBERG, R. J. 1995. Nucleophilie und der Einfluß des Lösungsmittels. *Organische Chemie*, 273-278. VCG.
64. TUMELTY, D.; SCHWARZ, M. K.; NEEDELS, M. C. 1998. Solid-phase Synthesis of Substituted 1-Phenyl-2-aminomethyl-benzimidazoles and 1-Phenyl-2-thiomethyl-benzimidazoles. *Tetrahedron Letters*, 39, (41), 7467-7470.
65. GOFF, D. A. & ZUCKERMANN, R. N. 1995. *Journal of Organic Chemistry*, 60 (18), 5744-5745.
66. LOUNASMAA, M. 1988. The Tropane Alkaloids. *The Alkaloids*. 33. Academic Press.
67. COREY, E. J.; ENSLEY, H. E. & SUGGS, W. 1976. A Convenient Synthesis of (S)-(-)-Pulegone from (-)-Cintronellol. *Journal of Organic Chemistry*, 41 (2), 380-381.
68. KURTH, M. J.; O'BRIEN, M. J.; HOPE, H. & YANUK, M. 1985. Intramolecular Diels-Alder Reaction of 1-Nitrodeca-1,6,8-trienes. *Journal of Organic Chemistry*, 50, 2626-2632.
69. KOH, J. S. & ELLMAN, J. A. 1996. Palladium-Mediated Three-Component Coupling Strategy for the Solid-Phase Synthesis of Tropane Derivatives. *Journal of Organic Chemistry*, 61, 4494-4495.
70. PAPARIN, J.; CRÉVISY, C. & GRÉE, R. 2000. *tert*-Butoxycarbamate group: a useful protecting group for the synthesis of orthogonally protected „tropane-like“ scaffolds. *Tetrahedron Letters*, 41, 2343-2346.
71. CAIX-HAUSMESSER, S.; HANNA, I.; LALLEMAND, J. & PEYRONEL, J. 2001. Solid-phase synthesis of functionalized tropane derivatives via 1, 3-dipolar cycloaddition. *Tetrahedron Letters*, 42, 3721-3723.
72. DANKWARDT, S. M.; NEWMAN, S. R. & KRSTENANSKY, J. L. 1995. Solid Phase Synthesis of Aryl and Benzylpiperazines and their Application in Combinatorial Chemistry. *Tetrahedron Letters*, 36 (28), 4923-4926.
73. PHILLIPS, G. B. & WIE, G. P. 1996. Solid Phase Synthesis of Benzimidazoles. *Tetrahedron Letters*, 28, 4887-4890.
74. LEE, J.; MURRAY, W. V. & RIVERO, R. A. 1997. Solid Phase Synthesis of 3,4-Disubstituted-7-carbamoyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-2-ones. *Journal of Organic Chemistry*, 62, 3874-3879.
75. SCHWARZ, M. K.; TUMELTY, D. & GALLOP, M. 1999. Solid-Phase Synthesis of 3,5-Disubstituted 2,3-Dihydro-1,5-benzothiazepin-4(5H)-ones. *Journal of Organic Chemistry*, 64, 2219-2231.

76. CAREY, F. A., SUNDBERG, R. J. 1995. *Organische Chemie*, s. 559. VCG.
77. KILEY, J. S. 1991. Quinolone Antibacterials: Preparation and Activity of Bridged Bicyclic Analogues of the C₇-Piperazine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 34, 656-663.
78. ZUCKERMANN, R. N.; KERR, J. M.; KENT, S. B. H. & MOOS, W. H. 1992. Efficient method for the Preparation of Peptoids [Oligo(N-substituted glycines)] by Submonomer. Solid-Phase Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 114, 10646-10647.
79. KUISLE, O.; QUIÑOÁ, E. & RIGUERA, R. 1999. A General Methodology for Automated Solid-Phase Synthesis of Depsides and Depsipeptides. Preparation of a Valinomycin Analogue. *Journal of Organic Chemistry*, 64, 8063-8075.
80. NIELSEN, J. & LYNGSØ, L. O. 1996. Combinatorial Solid-Phase Synthesis of Balanol Analogues. *Tetrahedron Letters*, 37 (46), 8439-8442.
81. SCAPECCHI, S. 1998. Further structure-activity relationships in the series of tropanyl esters endowed with potent antinociceptive activity. *Il Farmaco*, 53, 764-772.
82. ARYA, P.; CHOU, D. T. H. & BAEK, M. 2001. Diversitätsorientierte organische Synthese im Zeitalter der Genom- und Proteomforschung. *Angewandte Chemie*, 113 (2), 351- 358.
83. HALL, D. G.; MANKU, S. & WANG, F. Solution- and Solid-Phase Strategies for the Design, Synthesis, and Screening of Libraries on Natural Product Templates: A Comprehensive Survey. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 3 (2), 125-150.
84. SCHREIBER, S. L. 2000. Target-Oriented and Diversity-Oriented Organic Synthesis in Drug Discovery. *Science*, 287. 1964-1968.
85. NICOLAU, K. C.; PFEFFERKORN, J. A.; ROECKER, A. J.; CAO, G. -Q., BARLUENGA, S. & MITCHELL, H. J. Natural Product-like Combinatorial Libraries Based on Privileged Structures 1. General Principles and Solid-Phase Synthesis of Benzopyrans.
86. NICOLAU, K. C.; PFEFFERKORN, J. A.; ROECKER, A. J.; CAO, G. -Q.; BARLUENGA, S.; MITCHELL, H.; AFFLECK, R. L. & LILLIG, J. E. Natural Product-like Combinatorial Libraries Based on Privileged Structures 2. Construction of a 10000- Membered Benzopyran Library by Directed Split-and-Pool Chemistry Using NanoKans and Optical Encoding.

87. CHRISTENSEN, T. 1979. A Qualitative Test for Monitoring Coupling Completeness in Solid Phase Peptide Synthesis Using Chloranil. *Acta Chemica Scandinavia*, B33, 763-766.
88. CASY, A.F. 1974. Conformational Analysis of the tropane Analogue of Pethidine and Related Compounds by ^1H NMR Spectroscopy. *Organic Magnetic Resonance*, 6, 441-444
89. BUNIN, B. A. 1998. *The Combinatorial Index*. Academic Press.
90. GORDON, D. W. & STEELE, J. 1995. Reductive Alkylation on a Solid Phase: Synthesis of a Piperazinedione Combinatorial Library. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 5 (1), 47-50.
91. COY, D. H.; HOCART, S. J. & SASAKI, Y. 1988. Solid Phase reductive Alkylation Techniques in Analogue Peptide Bond and Side- Chain Modification. *Tetrahedron Letters*, 44 (3), 835 – 841.
92. MCGILL, J.; LABELL, E. S. & WILLIAMS, M. 1996. Hydride Reagents for Stereoselective Reductive Amination. An Improved Preparation of 3-Endo-Tropanamine. *Tetrahedron Letters*, 37, 977- 3980.
93. ABDEL-MAGID, A. F.; CARSON, K. G.; HARRIS, B. D.; MARYANOFF, C. A. & SHAH, R. D. 1996. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect reductive Amination Procedures. *Journal of Organic Chemistry*, 61, 3849-3862.
94. BAGLEY, J. R. & RILEY, T. N. 1977. Synthesis and Conformational Analysis of Isomeric 3- Propananilidotropanes. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 14, 599.
95. HUTCHINS, R. O.; SU, W.; SIVAKUMAR, R.; CISTONE, F. & STERCHO, Y. P. 1983. Stereoselective Reductions of Substituted Cyclohexyl and Cyclopentyl Carbon-Nitrogen p Systems with Hydride reagents. *Journal of Organic Chemistry*, 48, 3412-3422.
96. MEYERS, H; DILLEY, G. J.; DURGIN, T. L.; POWERS, T. S.; WINSSINGER, N. A.; ZHU, H. & PAVIA, M. R. 1995. Multiple Simultaneous Syntesis of Phenolic Libraries. *Molecular Diversity* 1 (1), 13-20.
97. WELLS, J. A. 1996. Hormone Mimicry. *Science*, 273, 449-450.
98. HO S.N.; BIGGAR, S. R.; SPENCER, D. M.; SCHREIBER, S. L. & CRABTREE, G. R. 1996. Dimeric ligands define a role for transcriptional activation domains in reinitiation. *Nature*, 382, 822-826.

99. PATTARAWARAPAN, M. & BURGESS, K. 2000. A Linker Scaffold to Present Dimers of Pharmacophores Prepared by Solid Phase Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 39 (23), 4299-4301.
100. ACHARYA, A., N.; NEFZI, A.; OSTRESH, J. M. & HOUGHTEN, R. A. 2001. Tethered Libraries: Solid-Phase Synthesis of Substituted Urea-Linked Bicyclic Guanidines. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 3 (2).
101. FENG, Y. & BURGESS, K. 1999. Solid Phase S_NAr Macrocyclizations to Give Turn-Extended-Turn Peptidomimetics. *Chemistry, a European Journal*, 5 (11), 3261-3272.
102. ALETRAS, A.; BARLOS K.; GATOS, D.; KOUTSOGIANI, S. & MAMOS, P. 1995. Preparation of the very acid sensitive Fmoc-Lys(Mtt)-OH. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 45, 488-496.
103. BARLOS, K., MAMOS, P., PAPAIOANNOU, D., PATRIANAKU S., SANIDA C., SCHÄFER, W. 1987. Einsatz von Trt- und Fmoc-Gruppen zum Schutz polyfunktioneller α -Aminosäuren. *Liebigs Annalen Chemie*, 1025-1030.
104. PLAUE, S. 1990. Synthesis of cyclic peptides on solid support. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 35, 510-517.
105. NEWCOMB, W. S., TRACY, L. D., MILLER W., PORCO, J. A. 1998. Analysis of 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc). Loading of Solid Phase Synthesis Resins by Gas Chromatography. *Biotechnology and Bioengineering (Combinatorial Chemistry)*, 61 (1), 55-60.

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena am 18 Juni 2003

Ich erkläre, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Dr. rer. nat. beworben habe und dass ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb de o.g. Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe.

Jena am 18 Juni 2003