

**Strategien zum Aufbau niedermolekularer GTPase-Aktivatoren
und zur direkten massenspektrometrischen Reaktionskontrolle
am polymeren Träger (MS-SPOS)**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften Dr. rer. nat.
vom Fachbereich Chemie
der Universität Dortmund
angenommene

Dissertation

von Dipl. Chem. ETH
Jantje Mareike Gerdes
aus
Lübeck

Dekan: Prof. Dr. K. Jurkschat
1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann
2. Gutachter: Prof. Dr. P. Eilbracht

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Mai 2003

1	ALLGEMEINER TEIL	1
1.1	Synthesestrategien zum Aufbau niedermolekularer GTPase-Aktivatoren	1
1.1.1	Einleitung	1
1.1.2	Ras-Proteine und ihre Rolle in der Signaltransduktion	2
1.1.3	Ras als Target für Wirkstoffe	3
1.2	Direkte, matrix-freie massenspektrometrische Reaktionskontrolle organischer Festphasensynthesen – MS-SPOS	7
1.2.1	Einleitung	7
1.2.2	Photolabile Linker	8
1.2.3	Direkte Massenspektrometrie an Harzen	11
2	AUFGABENSTELLUNG	15
3	SPEZIELLER TEIL	17
3.1	Synthesestrategien zum Aufbau niedermolekularer GTPase Aktivatoren	17
3.1.1	Molecular Modelling	17
3.1.2	Aufbau der Benzophenongrundstruktur	19
3.1.3	Benzophenon-Nukleotid-Konjugate	23
3.1.4	Variationen des Grundgerüsts	27
3.1.5	Nukleophile Kopfgruppen	29
3.1.6	Aminothiazole	36
3.1.7	2-Aminothiazol-Derivate als Inhibitoren von Rezeptor-Tyrosinkinasen	40
3.2	Direkte massenspektrometrische Reaktionskontrolle organischer Festphasensynthesen – MS-SPOS	47
3.2.1	Prinzip von MS-SPOS	47
3.2.2	Möglichkeiten und Beschränkungen	48
3.2.3	Reaktionskontrolle durch MS-SPOS	54
3.2.4	Versuche zur Ausweitung des Prinzips auf andere funktionelle Gruppen	63
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	67
4.1	Zusammenfassung	67
4.2	Ausblick	74
5	EXPERIMENTELLER TEIL	76

5.1	Messgeräte und Hilfsmittel	76
5.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	78
5.3	Colorimetrische Verfahren zur Reaktionskontrolle	81
5.4	Versuche zu Kapitel 3.1	83
5.4.1	Versuche zu Kapitel 3.1.2	83
5.4.2	Versuche zu Kapitel 3.1.3	87
5.4.3	Versuche zu Kapitel 3.1.4	90
5.4.4	Versuche zu Kapitel 3.1.5	91
5.4.5	Versuche zu Kapitel 3.1.6	103
5.5	Versuche zu Kapitel 3.2	117
5.5.2	Versuche zu Kapitel 3.2.2	117
5.5.3	Versuche zu Kapitel 3.2.3	130
5.5.4	Versuche zu Kapitel 3.2.4	140
6	LITERATURVERZEICHNIS	142
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	149
8	ANHANG	151
8.1.1	Messdaten der Kinasetests (Ralph Mazitschek)	151

1 Allgemeiner Teil

1.1 Synthesestrategien zum Aufbau niedermolekularer GTPase-Aktivatoren

1.1.1 Einleitung

Vor vierzig Jahren stellte Merrifield die erste Synthese von Peptiden an polymeren Trägern vor.^[1] Das Prinzip wurde rasch auch auf andere modular aufgebaute Substanzen wie z. B. Oligonukleotide ausgeweitet.^[2, 3] Die Verwendung polymerer Schutzgruppen für eine von mehreren funktionellen Gruppen des verknüpften Moleküls stellt eine revolutionäre Entwicklung in der organisch-präparativen Chemie dar, ohne die die Kombinatorische Chemie nicht denkbar wäre.^[4] Nach anfänglich relativ einfachen Strukturen werden zunehmend komplexere Moleküle synthetisiert. In einigen Fällen gelang sogar die Synthese von Naturstoffen am polymeren Träger.^[5-9] Dennoch ist der Bedarf an Methodenentwicklung für organische Reaktionen an fester Phase nach wie vor groß. Die Reaktionsbedingungen für bestimmte Transformationen in Lösung können häufig nicht einfach auf die feste Phase übertragen werden, d. h. sie müssen angepasst und optimiert werden.

Die Chance, eine biologisch-aktive Verbindung zu entdecken, hat sich durch den stark gestiegenen Umfang der synthetisierten Bibliotheken nicht so deutlich verbessert wie zunächst erhofft. Da Bibliotheken durch ihren modularen Aufbau nur ein Grundgerüst variieren, sind die verschiedenen Verbindungen häufig einander zu ähnlich, die molekulare Diversität geringer, als die Größe der Bibliothek vermuten ließe. Für die Optimierung einer gefundenen Leitstruktur ist die Synthese fokussierter Bibliotheken hingegen sehr gut geeignet. Ein Schwerpunkt moderner Wirkstoff-Forschung liegt daher im Bemühen, die Leitstruktursuche zu einem rationalen Prozess zu entwickeln, um sie besser steuern zu können. Bisher bleibt jedoch der Zufall ein wichtiger Faktor in der Wirkstoff-Forschung, und alle Hinweise auf die mögliche biologische Aktivität kleiner Moleküle sind wertvolle Ansätze, um Wirkstoffe zu entwickeln.

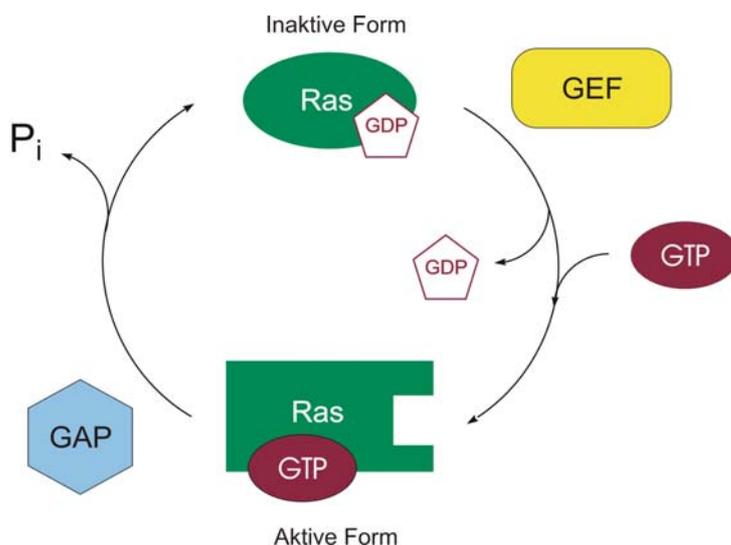
1.1.2 Ras-Proteine und ihre Rolle in der Signaltransduktion

Die Ras-Proteine gehören zur übergeordneten Ras-Familie monomerer GTPasen, Ras selbst leitet Signale von der Zelloberfläche in andere Zellkompartimente weiter. Es spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion von Rezeptor-Tyrosinkinasen zum Zellkern, um die Zellproliferation oder –differenzierung durch eine Änderung in der Genexprimierung anzuregen. In Säugetieren existieren drei Isoformen, N-Ras, K-Ras und H-Ras.^[10] Dabei induziert Ras immer mehrere Signalwege zugleich, es stellt gewissermaßen einen Knotenpunkt verschiedener Signalwege dar.

Ras wurde zunächst in Tumolviren von Nagern entdeckt, der Name leitet sich von „rat sarcoma“ ab. Seine Eigenschaft, Tumore in Tieren und auch Zellkulturen zu induzieren, machen es zum Onkogen. Später entdeckte man aktivierte Formen von Ras auch in menschlichen Tumoren. In der Tat kommt in etwa 30% aller menschlichen Tumore eine solch hyperaktive *ras* Mutation vor. Dabei überwiegen Mutationen in beiden Spleißvarianten von K-Ras (K-Ras 4A und K-Ras 4B).^[11]

Wie auch andere GTP-bindende Proteine agiert Ras als eine Art molekularer Schalter, d. h. es wechselt zwischen der inaktiven, GDP-gebundenen Form und der aktiven, GTP-gebundenen Form (s. Schema 1).^[12] Da die Bindungsaffinität von Ras zu GDP sehr hoch ist ($K_D = 10^{-12}$ pM), muss der Austausch der Nukleotide durch Nukleotidaustauschfaktoren („guaninnucleotide exchange factors“ GEF) herbeigeführt werden. Die Affinität von GTP zu Ras ist vergleichbar hoch, allerdings liegt GTP in wesentlich höherer intrazellulärer Konzentration (ca. 0.35 mM) vor, so dass das Gleichgewicht auf der Seite von Ras-GTP liegt. Zu den wichtigsten GEFs gehört Sos („son of sevenless“), das in einem Proteinkomplex mit Grb2 („growth receptor binding“) und phosphorylierten Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert vorliegt und so seinerseits Ras aktiviert. Andere GEFs können z. B. durch Ca^{2+} und Ca^{2+} -Calmodulin aktiviert werden, ein weiterer durch Diacylglycerin, ein Prozess, der vor allem im Gehirn gefunden wird. Allen Austauschfaktoren ist eine sogenannte Cdc25 Domäne gemein, die für einen schnellen Guaninnukleotid-Austausch notwendig und hinreichend ist.^[13] Dazu findet sich in variablem Abstand die „Ras Exchange Motif“ REM Domäne.^[14]

Nur in der aktiven Form hat Ras die geeignete Konformation, um an weitere Effektoren zu binden.^[12] Ein Signalweg mit besonderer Bedeutung ist dabei die Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade, die aus drei nachgeschalteten Kinasen besteht. Die letzte dieser Kinasen heisst „mitogen-activated protein“ MAP-Kinase, sie leitet den Stimulus an eine Reihe anderer Proteine weiter, darunter sowohl Kinasen als auch genregulierende Proteine. Die erste der drei Kinasen, die MAP-Kinase-Kinase-Kinase, ist in Säugetieren das Raf-Protein, das durch Ras aktiviert wird. Einen weiteren Effektor von Ras stellt die Phosphatidyl-3-kinase (PI 3-Kinase) dar, die Teil eines der bedeutendsten Signalfade ist, die zum Zellwachstum führen.



Schema 1: Schalterfunktion von Ras.

Das Signal wird durch Hydrolyse des gebundenen Nucleosid-Triphosphats zum entsprechenden Guanosindiphosphat GDP terminiert. Obwohl Ras eine intrinsische GTPase Aktivität aufweist, wird die Hydrolyse durch sogenannte GAPs („GTPase activating protein“) auf die ca. 10^5 fache Reaktionsgeschwindigkeit beschleunigt.^[15-17] Die wichtigsten und auch am besten untersuchten Ras-spezifischen GAPs sind p120GAP (auch GAP-334)^[18, 19] und Neurofibromin^[20-23]. Die Hydrolyse des gebundenen Nucleotids bewirkt wiederum einen Konformationswechsel, so dass Effektoren nicht länger binden können.

1.1.3 Ras als Target für Wirkstoffe¹

Die herausragende Rolle des Ras-Proteins in der zellulären Signalweiterleitung und die Häufung von hyperaktiven Ras-Mutationen in menschlichen Tumoren haben den Gedanken nahe gelegt, dass eine gezielte Manipulation der Ras-Aktivität einen Ansatzpunkt für neuartige Antitumor-Therapeutika bieten könnte.^[24, 25] Eine Möglichkeit hierfür wäre die Inhibierung der Farnesyltransferase, da diese Lipidmodifizierung der Ras-Proteine für die biologische Aktivität essenziell ist.^[26] Dieser Weg ist bereits intensiv verfolgt worden, derzeit befinden sich mindestens sechs Kandidaten in fortgeschrittenen klinischen Phasen.^[27] Beispielsweise wurden der natürlich vorkommende Farnesyl-Inhibitor Pepticinnamin **1** und seine Analoga synthetisiert und auf ihre biologische Wirkung hin untersucht.^[28, 29]

Eine Inhibierung der Wechselwirkung von Ras mit „downstream“ Effektoren würde das Signal an dieser Stelle unterbrechen. Der NSAID-Wirkstoff („non-steroidal anti-inflammatory“) Sulindac Sulfid **2** inhibiert die Protein-Protein-Wechselwirkung von Ras mit

¹ Eine umfassende Darstellung aller beschriebener Ansätze, die Funktion von Ras mit niedermolekularen Verbindungen zu manipulieren, findet sich in Lit.^[24]

Raf, es stellt somit eine vielversprechende Leitstruktur für der Entwicklung von Ras-Raf-Wechselwirkungs-Inhibitoren dar.^[30]

Die häufigsten onkogenen Mutationen in Codon 12 und 61 blockieren die GTP Hydrolyse sowohl durch Ras selbst als auch in Gegenwart von GAPs.^[11] Damit bleiben Ras-Proteine in ihrem aktiven Zustand und tragen zu anhaltender Zellproliferation und Tumorentstehung bei. Die Kristallstruktur von H-Ras und GAP-334 in Gegenwart von Aluminiumtrifluorid zeigt, dass ein Argininrest von GAP-334, der sogenannte „Arginin-Finger“, in das aktive Zentrum von Ras ragt.^[31, 32] Dieser Argininrest spielt wegen der Aktivierung eines gebundenen Wassermoleküls eine wichtige Rolle bei der Hydrolyse von GTP zu GDP. Außerdem wird deutlich, dass die Mutation von Gly12 zu jeder anderen Aminosäure zu einer Kollision der Seitenkette mit Atomen des Übergangszustandes führen würde. Die GAP-induzierte Hydrolyse wird somit inhibiert. In der Kristallstruktur wird ferner eine stabilisierende Wechselwirkung von Gln61 auf das Übergangszustandsanalogon sichtbar.

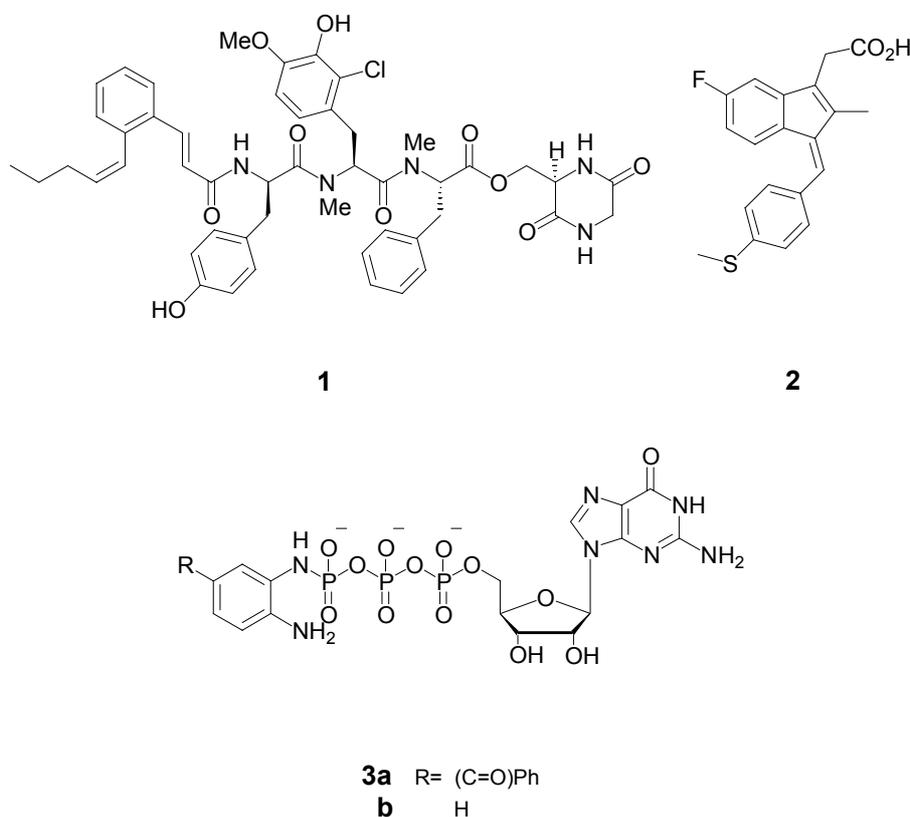


Abb. 1: Substanzen, die mit Ras wechselwirken bzw. die Wirkung von Ras beeinflussen: Farnesyltransferase Inhibitor Peptidcinnamin E **1**, NSAI-Wirkstoff Sulindac Sulfid **2**, der die Ras-Raf-Wechselwirkung inhibiert, und DABP-GTP **3a**, das die GTPase Aktivität von onkogenem Ras wiederherzustellen in der Lage ist.

Untersuchungen mit DABP-GTP **3a**, einem Addukt aus Guanosin triphosphat und 3,4-Diaminobenzophenon, das über ein Phosphorsäureamid verknüpft ist, zeigten die zunächst überraschende Spaltung der β,γ -Phosphatbindung (Bildung von GDP).^[33] Dabei findet sich sogar eine Selektivität, da das Addukt mit der bis zu 110-fachen Geschwindigkeit von mutiertem Ras im Vergleich zu Wildtyp Ras gespalten wird. Weil das 3-Aminobenzophenonanalogon keine solchen Effekte zeigte, wurde darauf geschlossen, dass die aromatische Aminogruppe Hauptursache für die beschleunigte Hydrolyse sein muss. Vermutungen, dass sie als allgemeine Base fungiert und ein Wassermolekül für den Angriff auf entweder das β - oder γ - Phosphat positioniert, wurden jedoch widerlegt, indem ein zyklisches Phosphorsäureamidderivat isoliert werden konnte.^[34] DABP-GTP **3a** agiert also nicht als niedermolekularer Arginin-Finger oder als Ersatz für das fehlende Glutamin 61, wie zunächst spekuliert worden war. Diese Untersuchungen zeigen jedoch, dass onkogenes Ras prinzipiell dazu gebracht werden kann, die β,γ -Phosphatbindung zu lösen, wenn im aktiven Zentrum die passende Umgebung geschaffen wird. Die G12 und Q61 Mutationen beeinträchtigen also die Hydrolyse von GTP, nicht aber die Fähigkeit von Ras, als molekularer Schalter zu operieren.

Die Kristallstrukturen von G12V und G12P Ras mit dem hydrolysestabilen DABP-GppNp zeigen unter anderem eine höhere Flexibilität des Benzoylringes als üblich, es ist also keine Wechselwirkung zwischen Protein und Benzoylrest zu erkennen.^[33] Die DABP Einheit liegt nahe einem hydrophoben Oberflächenbereich, der von V12 bzw. P12 und G13 gebildet wird. Die exozyklische Aminogruppe der 3,4-Diaminobenzophenon-Einheit liegt etwa 4.5 Å vom Sauerstoff der γ -Phosphatgruppe entfernt. Experimente mit einem Addukt aus Phenylendiamin und GTP, PDA-GTP **3b**, zeigten, dass die Rate der Hydrolyse von PDA-GTP **3b** im Vergleich zu DABP-GTP **3a** deutlich geringer war. Die Benzoylgruppe zeigt also einen deutlichen Effekt. Da der pKa Wert von PDA-GTP **3b** höher liegt als der von DABP-GTP **3a**, sollte eigentlich ein umgekehrter Effekt zu beobachten sein. Wahrscheinlich ändert sich hier die Protonierung, d. h. die Phenylendiaminverbindung liegt unter den Reaktionsbedingungen protoniert vor, während das 3,4-Diaminobenzophenonaddukt mit freier, unprotonierter Aminogruppe vorliegt.

Im Vergleich zu GTP weist DABP-GTP **3a** eine zwanzigfach schlechtere Bindungsaffinität zu Ras auf. Man kann also darauf schließen, dass das kovalent gebundene 3,4-Diaminobenzophenon einen negativen Beitrag leistet. Die intramolekulare GTP-Konzentration ist zudem mit ca. 0.35 mM so hoch, dass DABP-GTP **3a** selbst nicht als Wirkstoff in Frage kommt. Dennoch stellt diese Verbindung einen interessanten Ansatzpunkt für die Suche nach Molekülen dar, die an Ras binden und anschließend die GTP-Spaltung induzieren können. An einen solchen Wirkstoff werden zwei Anforderungen zu stellen sein:

- Die geeigneten Verbindungen sollten an die Proteinoberfläche in der Nähe der GTP-Bindungstasche an aktives Ras binden.
- Die Bindung an die Oberfläche sollte gleichzeitig eine nukleophile Gruppe so positionieren, dass die GTPase Reaktion von onkogenem Ras wiederhergestellt wird. Das bedeutet, dass ein intramolekularer durch einen intermolekularen Reaktionsmechanismus ersetzt werden muss.

1.2 Direkte, matrix-freie massenspektrometrische Reaktionskontrolle organischer Festphasensynthesen – MS-SPOS²

1.2.1 Einleitung

Kombinatorische Chemie und Parallelsynthese von Substanzbibliotheken an fester Phase ermöglichen die rasche Herstellung einer Vielzahl von Verbindungen mit einem festgelegten Eigenschaftsprofil. Während die organisch-chemische Synthese an fester Phase weit voran geschritten ist, bleibt die Analytik der Reaktionsprodukte und damit auch die Reaktionskontrolle an fester Phase umständlich und zeitaufwendig.^[35] Für die Analysemethoden, die üblicherweise zur Verfügung stehen, muss häufig eine Probe entnommen werden, von der das Produkt anschließend abgespalten werden kann. Das Harz steht dann nicht mehr für eine weitere Umsetzung zur Verfügung. Bei indirekten Nachweismethoden, wie z. B. dem Kaiser Test^[36], wird ebenfalls eine Probe entnommen. Zudem muss die Derivatisierungsreaktion möglichst quantitativ verlaufen, um das Ergebnis nicht zu verfälschen. In Abhängigkeit von Reaktand und Reaktionsprodukt kann also eine Vielzahl verschiedener Analysemethoden angewendet werden.

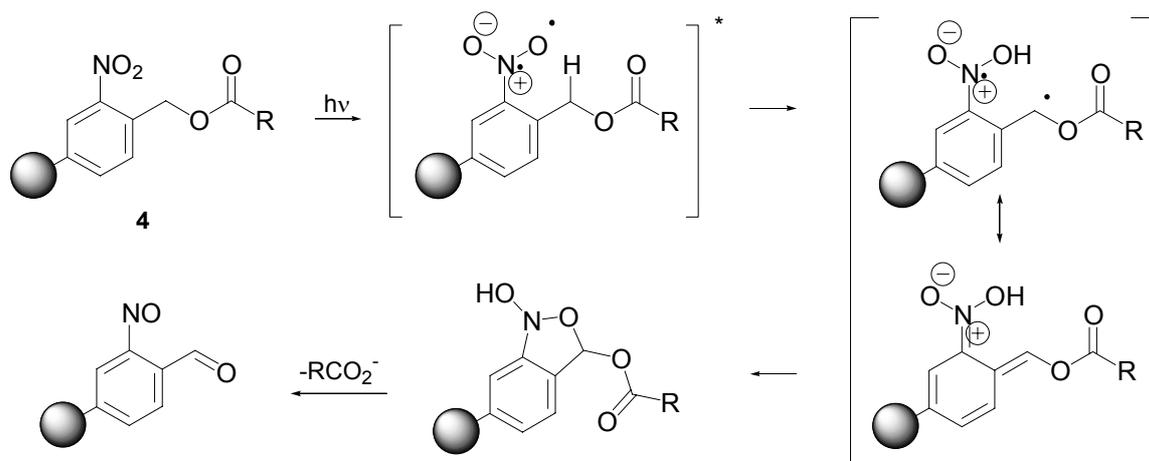
Eine wichtige spektroskopische Methode zur Analyse von festphasengebundenen Substanzen stellt die IR-Spektroskopie dar.^[35] Diese nicht invasive Nachweismethode kann wichtige Informationen geben, wenn funktionelle Gruppen mit charakteristischen Absorptionsbanden im Verlaufe einer Reaktion generiert oder transformiert werden. Darüber hinaus wurde gerade in den letzten Jahren die MAS-NMR Spektroskopie so weit entwickelt, dass sie routinemäßig für die Festphasenanalytik angewendet wird.^[35] Beide Methoden sind insoweit eingeschränkt, als dass Signale, die sich mit harzeigenen Signalen überlagern, nicht eindeutig nachgewiesen werden können. Im Falle der IR-Spektroskopie kommt noch hinzu, dass beispielsweise bei der Festphasen-Peptidsynthese nur eingeschränkt charakteristische Banden gebildet werden, die Amidbanden werden im Allgemeinen nicht quantifiziert und insofern können neu hinzugekommene Banden in diesem Bereich nicht nachgewiesen werden.

Neben der IR- und der NMR-Spektroskopie wird die Massenspektrometrie zur Charakterisierung von chemischen Verbindungen eingesetzt. Eine direkte massenspektrometrische Untersuchung am polymeren Träger stellt somit eine wertvolle Erweiterung des analytischen Repertoires dar. Mit der Verwendung eines geeigneten photolabilen Linkers bietet sich diese Möglichkeit durch die MALDI-TOF Spektrometrie. Nach der *in situ* Photolyse mit Hilfe des Lasers, der in das MALDI-TOF-Gerät integriert ist, kann das Produkt in die Gasphase übertreten und nach entsprechender Beschleunigung im Time-of-flight (TOF)- Detektor nachgewiesen werden.

² „Mass spectrometric monitoring of solid-phase organic syntheses“ MS-SPOS

1.2.2 Photolabile Linker³

Wie auch andere Ankergruppen, die für die Festphasensynthese entwickelt wurden, beruhen viele photolabile Linkersysteme auf der Immobilisierung der entsprechenden Schutzgruppen an fester Phase. Im Jahr 1973 berichteten Rich et al. erstmals über einen photolabilen Linker **4**.^[38] Dieses System leitet sich von *o*-Nitrobenzylalkoholen ab, die von Patchornik et al. 1970 als photolabile Schutzgruppen für Carboxylfunktionen entwickelt wurden.^[39] Die Abspaltung der Carboxylgruppe erfolgt über eine Norrish Typ II-artige Reaktion (Schema 2). Die Ausbeuten waren für kurze Peptidketten gut, allerdings nahmen sie mit zunehmender Anzahl an Aminosäureresten rapide ab. Man erweiterte das Repertoire an immobilisierten funktionellen Gruppen, indem man anstelle des Benzylalkohols ein Benzylbromid einführte, das auch mit Stickstoffnukleophilen substituiert werden konnte. Durch Ausbildung einer Amidbindung mit der entsprechenden Carbonsäure können so nach der Spaltung Carboxamide erhalten werden. In Analogie zur Nitroveratryloxycarbonyl(Nvoc)-Schutzgruppe erfolgt die Anbindung von Aminogruppen über ein Urethan, das bei der Abspaltung neben der freien Aminogruppe Kohlendioxid freisetzt.



Schema 2: Mechanismus der photolytischen Spaltung des *o*-Nitrobenzyllinkers **4**

Die Einführung einer Methylgruppe in α -Position zur immobilisierten Carbonsäure erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit der Abspaltung erheblich und vermeidet so unerwünschte Nebenreaktionen, wie z. B. die Oxidation von Methionin. Darüber hinaus ist das Photolyseprodukt, ein *o*-Nitrosoacetophenon, wesentlich weniger reaktiv als das entsprechende *o*-Nitrosobenzaldehyd-Derivat und bildet mit freien Aminen nicht so schnell Schiff'sche Basen. Ähnlich wie bei der Schutzgruppe (vgl. Nitrobenzyl vs. Nitroveratryl) wurde zudem das Absorptionsmaximum der Linkereinheit durch Einführung eines

³ Eine umfassende Darstellung aller derzeit bekannten photolabilen Linker- und Schutzgruppensysteme findet sich in Lit.[37] C. G. Bochet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2002**, 125-142.

Methoxysubstituenten und der Anbindung als *p*-Phenylether weiter erhöht ($\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$). Je höher die Wellenlänge, desto geringer die Energie, die dem System zugeführt wird, und somit auch die Gefahr von Photonebenreaktionen des Produktes.

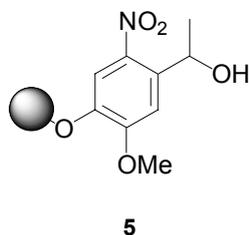
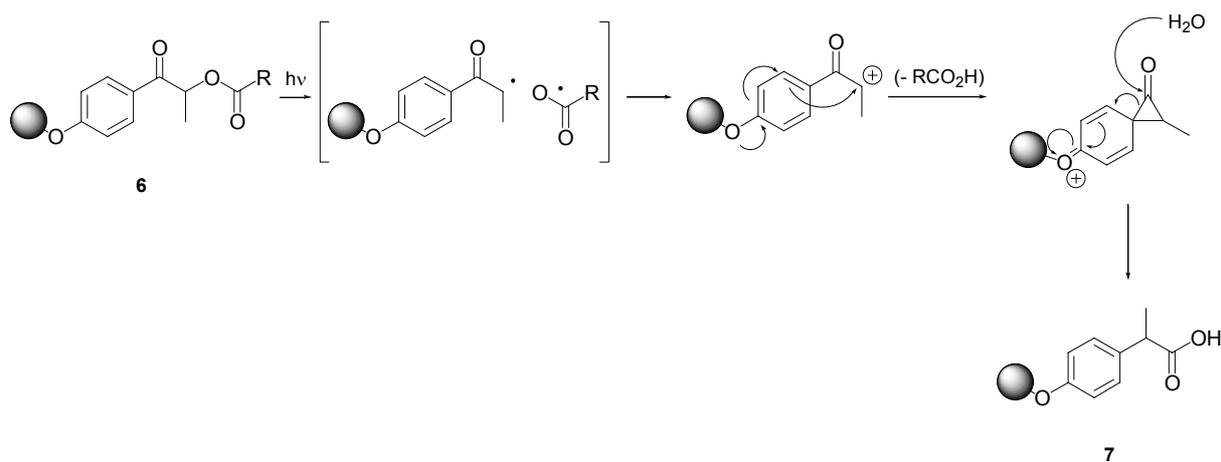


Abb. 2: *o*-Nitroveratryllinker **5**

Wie die *o*-Nitroveratrylgruppe wurde auch die Phenacylschutzgruppe als Vorbild für die Entwicklung des Linkers **6** genommen.^[40] Die Stabilität gegenüber wasserfreien Säuren (organisch wie anorganisch) und die Labilität gegenüber Nucleophilen sowie ihre Photoreaktivität versprechen eine wertvolle Erweiterung der Möglichkeiten zur Anknüpfung an polymere Trägermaterialien. Ein Sauerstoffsubstituent (Hydroxy- oder Alkoxygruppe) in *para*-Position trägt wesentlich zur Photolabilität des entsprechenden Phenacylestere bei, wahrscheinlich durch die bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 350 nm. Das analoge System ohne Sauerstoffsubstituenten in *para*-Position wurde von Wang entwickelt.^[41] Auch hier liegt eine gewisse Photoreaktivität vor, allerdings sind die erforderlichen Bestrahlungszeiten zu lang, um eine echte Alternative zur nucleophilen Abspaltung darzustellen.

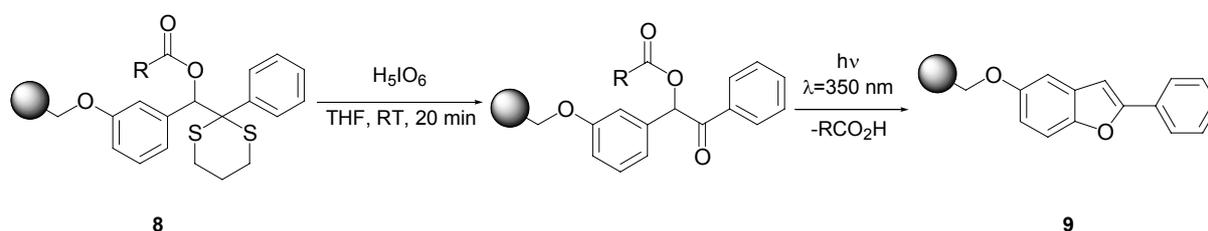


Schema 3: Photolytische Spaltung des Phenacyllinkers **6** und anschließende Umlagerung zur freien Säure **7**

Der Mechanismus der Photolyse von Phenacylestern wird noch diskutiert, es scheint allerdings gesichert, dass er über einen Triplettzustand und anschließende homolytische Spaltung verläuft (Schema 3).^[42-44] Das gebildete Carboxylradikal abstrahiert sofort ein

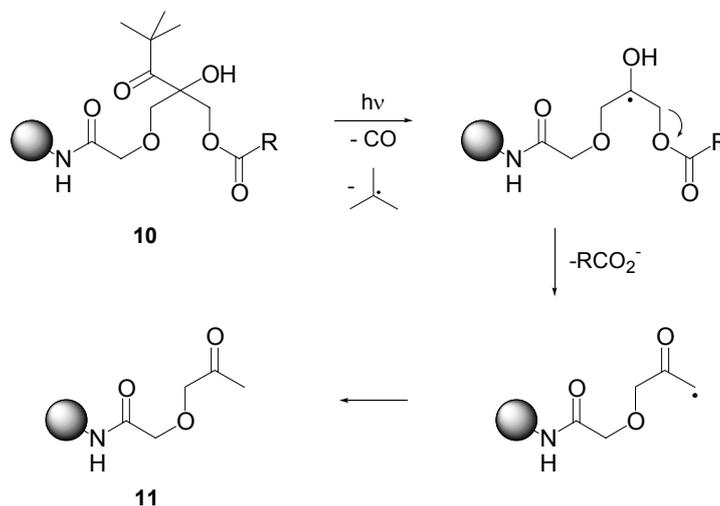
Elektron vom Linkermolekül und bildet ein Anion. Das harzgebundene Kation kann auf unterschiedlichen Wegen weiterreagieren, z. B. durch eine Umlagerung zur entsprechenden *p*-Alkoxyphenyl- α -methylelessigsäure **7**. Sowohl das *o*-Nitroveratryllinker- als auch das Phenacyllinkersystem **5** bzw. **6** sind an Polystyrol gebunden kommerziell erhältlich.

Balasubramanian hat die photolabile Benzoin Schutzgruppe als Vorbild zum Safety-Catch-Linker **8** genommen (Schema 4).^[45-47] Die Carbonylgruppe wird in einer Umpolungsreaktion als Dithian eingeführt und bleibt über den gesamten Syntheseverlauf als solches bestehen, um unerwünschte Abspaltungsreaktionen zu vermeiden. In einem letzten Schritt wird die Carbonylgruppe entschützt und die Photoreaktivität somit wieder hergestellt.



Schema 4: Spaltung des photolabilen Benzoin Safety Catch Linkers **8** in zwei Stufen

Die Photolyse läuft wahrscheinlich über den S_1 -Zustand, aus dem heraus die Esterbindung heterolytisch gespalten wird und das so entstandene Kation zum entsprechenden 2-Phenylbenzofuran-Derivat **9** zyklisiert.^[48]

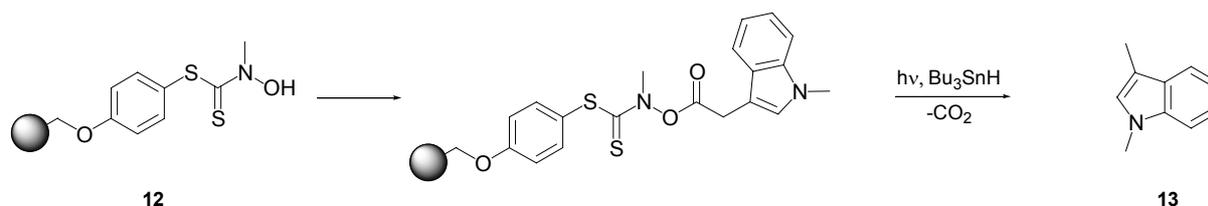


Schema 5: Spaltung des Pivaloylglykol Linkers^[49]

In der Gruppe von Giese wurde ein photolabiler Linker **10** entwickelt, über den gleichermaßen Alkohole über eine Etherbindung wie auch Carbonsäuren über eine Esterbindung immobilisiert werden können (Schema 5).^[49, 50] Bei Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 320 nm wird zunächst in einer Norrish Typ I-artigen Reaktion ein α -Hydroxyradikal erzeugt,

das anschließend durch heterolytische Spaltung der β -CO-Bindung zum Enolat-Radikal und durch Wasserstoffabstraktion vom Lösungsmittel zum entsprechenden Acetonderivat **11** weiterreagiert. Für die *in situ* Spaltung im MALDI Massenspektrometer ist dieser Linker jedoch nicht geeignet, da bei Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 337 nm nicht genug Energie übertragen würde, um Substratmoleküle in die Gasphase übertreten zu lassen.^[51]

Während die bisher besprochenen Linker ausnahmslos polare funktionelle Gruppen freisetzen, haben Routledge und Mitarbeiter einen „traceless“ Linker **12** entwickelt, der eine aliphatische CH-Bindung bei Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 350 nm generiert.^[52] Zuvor hatten Arbeiten von Barton et al. gezeigt, dass die Bestrahlung von Thiohydroxamsäureestern in Gegenwart eines geeigneten „chain carrier“ eine schnelle decarboxylierende Radikalumlagerung initiiert, die ein Alkan z. B. **13** freisetzt. Dieses Prinzip wurde auf die Festphase übertragen und *N*-Methylindol-3-essigsäure als Thiohydroxamester angeknüpft (Schema 6).



Schema 6: Photolabiler „traceless“ Linker **12** nach Routledge^[52]

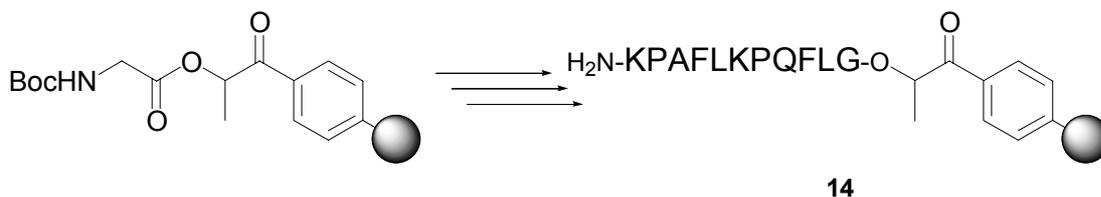
Mit Ausnahme des „traceless“ Linkers **12** wurden alle bisher bekannten photolabilen Linkergruppen für Säuren oder Alkohole entwickelt. Sowohl der Phenacyllinker als auch die Nitroveratrylgruppe können in ihrer Anwendbarkeit auf Amide ausgedehnt werden. Für freie Amine wären sie allerdings nur nach Modifikation, d. h. Anknüpfung als eine Urethaneinheit geeignet (s. a. Nvoc-Schutzgruppe).

1.2.3 Direkte Massenspektrometrie an Harzen

Das eingeschränkte analytische Repertoire für die Organische Synthese an fester Phase bedingt, dass die Analytik der Produkte häufig nicht direkt am Harz ausgeführt wird, sondern das Produkt gespalten und in Lösung untersucht wird. Diese Methode erfordert jedoch große Mengen an Harz, die dann nicht zur weiteren Synthese verwendet werden können, und ist je nach Linkersystem zeitaufwendig. Die aus der Reaktionsmischung entnommene Harzprobe muss zunächst gewaschen werden, bevor sie mit Abspaltlösung behandelt werden kann. Erst nach der Aufarbeitung der Abspaltreaktion und eventuell sogar des Filtrats und der Waschfraktionen kann eine entsprechende Charakterisierung vorgenommen werden.

Da die Photolyse von geeigneten Linkern keine weiteren ungewöhnlichen und mit üblichen massenspektrometrischen Methoden unverträglichen Reagenzien erfordert, wurde von Geysen et al. ein Verfahren entwickelt, das die Reaktionslösungen solcher Abspaltungen direkt im ESI-MS untersucht.^[53] Dabei wird nach der Bestrahlungsdauer von einer Stunde die Lösung mit 2% Essigsäure in Methanol:Wasser 1:1 verdünnt und analysiert. Dieses Verfahren wurde später noch durch eine Isotopenmarkierung (¹⁵N) verfeinert, die eine sichere Unterscheidung des Produktsignals vom Hintergrundrauschen erlaubt.^[54] Eine direktere Methode stellt die Untersuchung von Harzkügelchen im EI-Massenspektrometer dar.^[55] Hierfür wird das Polystyrol-Harz auf über 400 °C erhitzt und bei dieser Temperatur ein Massenspektrum aufgenommen. Dabei treten vor allem Signale auf, die von Styrol-Monomeren und -Oligomeren stammen, da bei höheren Temperaturen eine Depolymerisierung einsetzt. Daneben treten jedoch Signale auf, deren m/z-Verhältnis eindeutige Rückschlüsse auf gebundene Substrate zulässt. So können mit relativ kleinen Mengen Harz Reaktionsprodukte charakterisiert und Reaktionen überwacht werden. Bisher beschränkt sich diese Methode allerdings noch auf Polystyrolharze als polymere Träger. Darüber hinaus bleibt dieser Ansatz auf relativ kleine Moleküle beschränkt, da größere aufgrund der relativ harschen Ionisierungsmethode im EI häufig keinen Molekülpeak zeigen.

Die MALDI Spektrometrie beruht auf der Energieübertragung eines Lasers auf den Analyten durch eine absorbierende Matrix. Dieses Verfahren ist erheblich milder als die EI-Spektrometrie und kann sogar komplexe Systeme wie Proteine der massenspektrometrischen Charakterisierung zugänglich machen. Üblicherweise sind MALDI Geräte mit UV-Lasern mit einer Wellenlänge von 337 nm ausgestattet. Siuzdak und Mitarbeiter berichteten 1996 erstmals von einer direkten massenspektrometrischen Charakterisierung festphasengebundener Moleküle.^[56] Dabei handelte es sich um Peptid **14** aus elf Aminosäuren, das unter anderem zwei Lysinreste umfasst (Schema 7). Während der Synthese sind die Lysinseitenketten durch Fmoc-Gruppen geschützt, werden jedoch vor der Analyse entschützt, da für die Detektion des Produkts als Kation im positiven Modus ausreichend Protonierungsstellen vorhanden sein müssen. Siuzdak demonstrierte außerdem die Eignung dieser Methode zur Reaktionskontrolle, indem er die Kupplung eines weiteren Aminosäurerestes nach einer und sechs Minuten überprüfte. Während nach einer Minute noch ein deutliches Eduktsignal zu erkennen war, konnte nach sechs Minuten nur noch das Produktsignal detektiert werden.



Schema 7: Synthese des Peptids **14**, das von Siuzdak et al. detektiert wurde^[56]

Im Jahr 1997 berichteten Carrasco et al. über die direkte Überwachung organischer Reaktionen an polymeren Trägern.^[57] Dabei verfolgten sie eine sogenannte „dual-handle“ Strategie, d. h. sie verknüpften einen *o*-Nitrobenzyllicher **4** über eine Ionisierungssequenz mit einem Rink Amid Linker und damit auch mit dem Substrat (Abb. 3). Da sowohl das eigentliche Reaktionsprodukt als auch der Spacer als Amid abgespalten wurde, musste die Ionisierung im Molekül selbst vorhanden sein.

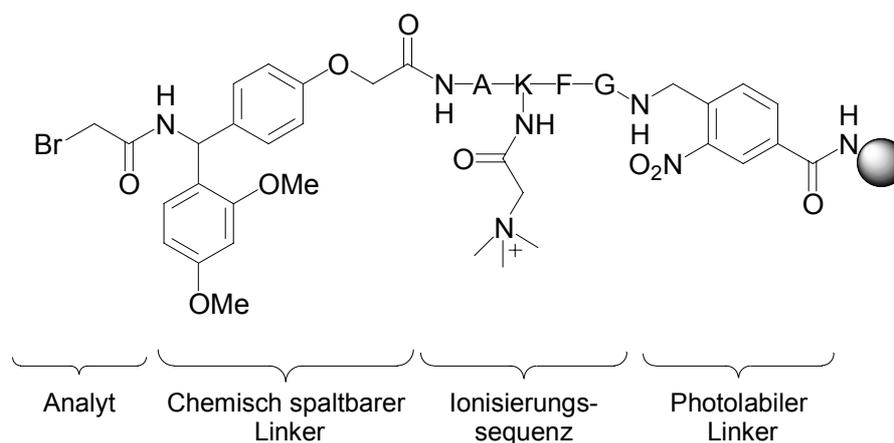


Abb. 3: „Dual-handle“ Strategie zur Reaktionskontrolle an fester Phase^[57]

Mit dieser Methode wurde die nukleophile Substitution von Bromid durch Cyanid an festphasengebundener Bromessigsäure überwacht. Neben weiteren nukleophilen Substitutionsreaktionen wurde auch eine Heck-Reaktion durchgeführt, über die jedoch keine genauere Auskunft gegeben wird.

Das beschriebene Prinzip der direkten Massenspektrometrie am Harz wurde in einigen Beispielen angewendet, die sich jedoch auf die Detektion von Peptiden und Oligosacchariden beschränken.^[58] So benutzten Meldal et al. sogenannte „ladder sequences“ (Leitersequenzen) zur eindeutigen Identifizierung biologisch aktiver Glykopeptide.^[59] Die Peptide wurden am Nitroveratryllinker synthetisiert. Um einen exakt definierten Anteil an Abbruchsequenzen zu haben, wurde ein 9:1 Gemisch aus Fmoc- bzw. Boc-geschützter Aminosäure eingesetzt. Nach basischer Entschützung blieb somit ca. ein Zehntel der Aminosäuren blockiert. Im Anschluss wurden die Harzkügelchen im MALDI-TOF Spektrometer untersucht, die die biologisch aktiven Moleküle trugen. Das Muster der Abbruchsequenzen ließ einen eindeutigen Rückschluss auf die Sequenz der Glykopeptide zu.

Sowohl die Methode von Siuzdak als auch die von Carrasco verzichten nach wie vor nicht auf die Energieübertragung durch geeignete Matrixchemikalien (α -Cyano-4-hydroxymizinsäure bzw. *trans*-3-Indolacrylsäure). Dadurch wird der untere Massenbereich (<300 Da) gestört und die Detektion von kleinen Molekülen ist nicht mehr uneingeschränkt möglich. Außerdem muss eine Ionisierungsstelle im Molekül vorhanden sein, damit es im MALDI detektierbar

bleibt. Siuzdak et al. lösen diese Probleme, indem ein ausreichend großes Peptid hergestellt wird, das zudem protonierbare Lysinreste enthält. Da eine Carboxylatgruppe freigesetzt wird, müssen mindestens zwei Protonierungsstellen im Molekül vorhanden sein, um das Produkt im positiven Modus nachweisen zu können.

Carrasco et al. hingegen umgehen mit der Verwendung einer Ionisierungssequenz dieses Problem. Durch die Verwendung eines zweiten Linkers wird außerdem die Anwendbarkeit der Methode ausgeweitet, da unterschiedliche funktionelle Gruppen angeknüpft werden können. Gleichzeitig wird die Masse des analytischen Konstrukts erhöht. So können auch niedermolekulare Substrate trotz der Verwendung einer Matrix zweifelsfrei nachgewiesen werden. Im Beispiel von Meldal et al. wird in die Sequenz ebenfalls ein „ionization and mass peptide spacer“ eingefügt, der ebenso wie in der Arbeit von Carrasco et al. zugleich die Ionisierung vermitteln und die molekulare Masse soweit erhöhen soll, dass sie aus dem Bereich der Matrixsignale austritt.

2 Aufgabenstellung

Die gezielte Manipulation von Ras-Proteinen stellt einen geeigneten Ansatzpunkt für die weitergehende Aufklärung intrazellulärer Signalwege und eventuell sogar die Entwicklung neuer Tumortheraeutika dar. Die Verbindung DABP-GTP **3a** ist in der Lage, die Hydrolyse von GTP zu GDP zu initiieren und den Konformationswechsel von der aktiven in die inaktive Form herbeizuführen. Dadurch wurde gezeigt, dass die Schalterfunktion von mutiertem Ras durch die onkogenen Mutationen nicht beschädigt ist. Wird die geeignete chemische Umgebung geschaffen, können die intrinsische Hydrolyse-Aktivität von Ras angeregt und so über Ras vermittelte Signale terminiert werden.

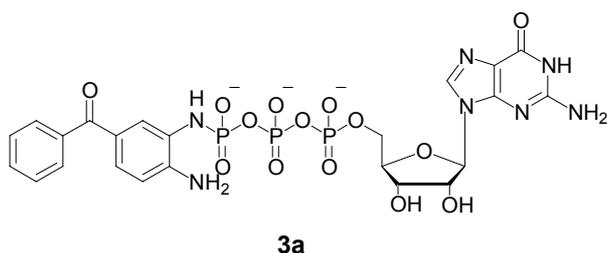


Abb. 4: DABP-GTP **3a**, ein Addukt aus 3,4-Diaminobenzophenon und GTP, das durch onkogenes Ras hydrolysiert wird.

In der vorliegenden Arbeit sollen Strategien für die Synthese niedermolekularer GTPase Aktivatoren erarbeitet werden. Um die Benzophenon-Grundstruktur beizubehalten, soll zunächst ein synthetischer Zugang zu Benzophenonderivaten an fester Phase gefunden werden.

Die synthetisierten, mit Guanin-Nukleotiden modifizierten Verbindungen sollen mit höherer Affinität als **3a** an Ras binden. Da 3,4-Diaminobenzophenonanaloga zur Spaltung von GTP führen, müssen Synthesestrategien zur Herstellung entsprechender Analoga führen, die zwar an Ras binden können, nicht aber GTP zu spalten in der Lage sind. So wird die genauere Charakterisierung der Bindungseigenschaften in Bezug auf Ras möglich. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Synthese von entsprechenden 3-Aminobenzophenonanaloga sowie die Derivatisierung ihrer Carbonylgruppe und andere strukturelle Variationen entwickelt werden.

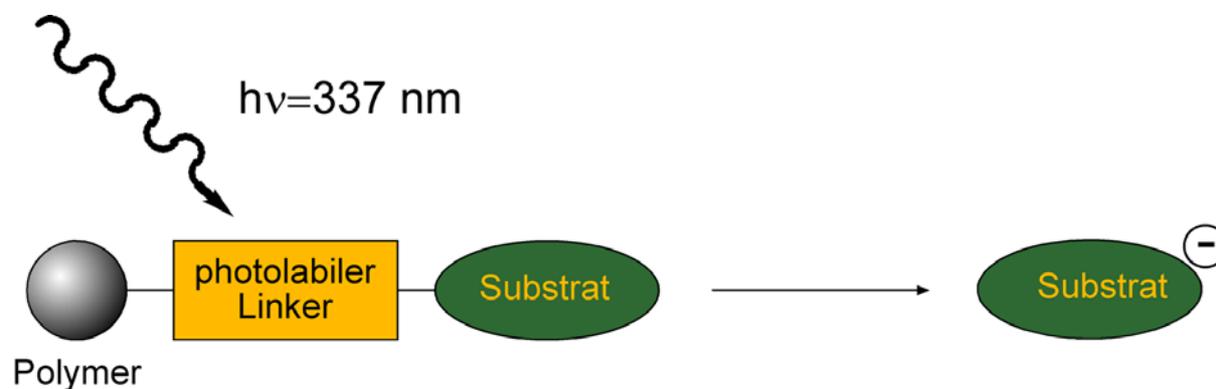
Die Spaltung von GTP, im Falle von DABP-GTP **3a** durch eine intramolekulare Aminogruppe, soll durch eine geeignete nukleophile Gruppe herbeigeführt werden, die bei der Bindung an die Proteinoberfläche günstig positioniert wird. Dabei könnte ein endozyklisches Heteroatom wie z. B. in 6-Aminonicotinoyl- oder 2-Aminothiazolylderivaten in Wechselwirkung mit dem γ -Phosphat von GTP treten und so einen gerichteten Beitrag zur Bindung an die Proteinoberfläche leisten. Der Aufbau verschiedener aminofunktionalisierter Heterozyklen soll daher ebenfalls Teil der vorliegenden Arbeit sein.



Schema 8: Prinzip der Intervention mit niedermolekularen GTPase Aktivatoren

Die Analytik festphasengebundener Verbindungen und damit auch die Reaktionskontrolle von Organischer Festphasensynthese ist häufig umständlich und zeitaufwendig. Neben IR- und NMR-Spektroskopie ist die Massenspektrometrie ein häufig verwendetes Mittel zur Charakterisierung chemischer Verbindungen. Die direkte massenspektrometrische Analyse polymergebundener Verbindungen durch *in situ* Abspaltung im Massenspektrometer würde die Möglichkeiten zur raschen Reaktionskontrolle erheblich erweitern. Da MALDI-TOF-Spektrometer mit einem Laser der Emissionswellenlänge 337 nm ausgestattet sind, wäre ein photolabiler Linker dazu geeignet, im Spektrometer selbst gespalten zu werden.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit soll eine Methode entwickelt werden, Reaktionen am polymeren Träger und ohne Verwendung von Matrix massenspektrometrisch zu überwachen. Zunächst sollen Möglichkeiten und Beschränkungen dieser Methode untersucht und diskutiert werden. Darüber hinaus soll jedoch die Anwendbarkeit auf verschiedene Reaktionen und Synthesesequenzen an fester Phase demonstriert werden.



Schema 9: Prinzip der Reaktionskontrolle im MALDI-Spektrometer

3 Spezieller Teil

3.1 Synthesestrategien zum Aufbau niedermolekularer GTPase Aktivatoren

3.1.1 Molecular Modelling

Häufig kann der Umfang neuer Bibliotheken durch Molecular Modelling begrenzt werden. Dabei werden entweder potenzielle Liganden durch einen Computeralgorithmus entworfen und auf ihre Bindungseigenschaften hin virtuell untersucht oder Strukturen aus Datenbanken, also schon existierende chemische Verbindungen, wiederum virtuell getestet (Docking).

Zu diesem Zweck wurden zunächst die zwei Kristallstrukturen von verkürztem, mutiertem Ras-Protein (G12P und G12V) mit DABP-GppNp untersucht.^[33] Dabei fiel zunächst auf, dass die Lage des Benzophenonsystems sich in beiden Strukturen unterscheidet. In der G12V Struktur „liegt“ das Benzophenonsystem quasi auf der Oberfläche, auch wenn keine Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche direkt erkennbar sind. In der G12P Struktur ist der Benzoylring um ca. 180° gedreht und stört eventuell die Switch I-Region. Für die folgenden computergestützten Betrachtungen der Proteinoberfläche scheint daher die G12V-Mutante die nützlichere zu sein, zumal sie im Gegensatz zu G12P onkogen ist.^[60]

Den Kristallstrukturen wurden auf mathematischem Wege Wasserstoffatome hinzugefügt, die bei der Röntgenstrukturanalyse keine Strahlen beugen und daher in der Struktur unsichtbar sind. Durch Energieminimierung wurde ihnen unter Berücksichtigung potenzieller Wechselwirkungen mit Wasserstoffbrückenakzeptoren eine wahrscheinliche Position zugeordnet. Die Minimierungen wurden zum einen in Insight^[61] und zum anderen in Sybyl^[62] durchgeführt. Im Falle von Insight wurden alle anderen Atome als Wasserstoff (C, N, O usw.) fixiert und mit dem in Insight implementierten CFF-Kraftfeld minimiert. Unter Sybyl wurden das Peptidrückgrat fixiert, die Seitenketten jedoch freigegeben, um geringe Konformationsänderungen zuzulassen. Hier wurde die Minimierung mit Kollman United, einem Vorläufer des Amber-Kraftfeldes, durchgeführt. Eine Überlagerung beider Strukturen nach der Minimierung zeigte zumindest im Bereich der GTP-Bindungsstelle keine nennenswerten Abweichungen voneinander. Anschließend wurde mit Hilfe des Programms LUDI^[63] nach Strukturen sowie Strukturfragmenten gesucht, die nahe der GTP-Bindungsstelle binden könnten. Als Zielregion wurde das γ -Phosphat als zentraler Punkt definiert und ein Umkreis mit einem Radius $r = 8 \text{ \AA}$ gezogen. Dabei analysiert das Programm zunächst die vom Anwender definierte Bindungsstelle nach potenziellen Wechselwirkungspartnern. Aus einer großen Anzahl von Kristallstrukturdaten sind optimale Abstände und Winkel für bestimmte Wechselwirkungen bekannt, mit Hilfe dieser geometrischen Parameter wird die Bindungstasche dargestellt. Anschließend werden Datenbanken nach Strukturen durchsucht, die mit den festgelegten Parametern möglichst gut übereinstimmen. Einerseits wird die

Available Chemical Database ACD verwendet, in der sämtliche kommerziell erhältlichen Chemikalien aufgeführt sind. Hier werden also existierende Verbindungen überprüft. Zum anderen gibt es eine eigene Fragmentdatenbank, deren Bestandteile unabhängig voneinander in die Bindungsstelle eingepasst werden und anschließend in eine chemische Struktur übersetzt werden müssen.

Es wurden keine Strukturen in der *ACD* identifiziert, die als potenzielle Liganden in Frage kämen. Auch die Suche nach geeigneten Substituenten an den beiden aromatischen Ringen sowie dem Kohlenstoffatom, das die beiden Ringe verbrückt, lieferte nur wenige Vorschläge. Die gefundenen Fragmente zeigten geringe Scores und wurden daher mit Hilfe von Docking Verfahren (GOLD^[64]) überprüft. Hier zeigten sie keine Affinität zur Proteinoberfläche, so dass sie verworfen werden mussten.

Ein wichtiges Kriterium im computergestützten Design von Proteinliganden ist die korrekte Vorhersage von Bindungsenergien.^[65] Ohne eine zumindest in ihren Tendenzen korrekte Einordnung der gefundenen Ligandenstrukturen hat das Ergebnis einer solchen Operation geringen Wert. Bis heute ist es nur sehr schwer möglich, Vorgänge an Proteinoberflächen korrekt zu simulieren, da die Solvatation hier eine viel größere Rolle spielt als in echten Bindungstaschen, die nur durch wenige Wassermoleküle besetzt sind. Vor allem ist es nach wie vor schwierig abzuschätzen, wie stark gebunden ein Wassermolekül vorliegt. Auch im Ligandendesign für Bindungstaschen entfernt von der Proteinoberfläche ist es nur schwer möglich, indirekte Wechselwirkungen, z. B. eine durch ein Wassermolekül vermittelte Wasserstoffbrücke zu simulieren. Derzeit wird versucht, den zur Verfügung stehenden Raum möglichst optimal auszunutzen, um eine maximale Bindungsaffinität zu erreichen. Die Wassermoleküle an der Proteinoberfläche sind um so schwieriger zu erfassen, als sie weniger definiert gebunden vorliegen und wesentlich zahlreicher auftreten. Neuere Arbeiten setzen sich mit dieser Problematik auseinander und suchen vor allem nach Ansätzen, die die Scoring Funktionen in den derzeit gebräuchlichen Programmen an Proteinoberflächen anpassen können.^[66]

Die Bemühungen, durch LUDI fokussierte Bibliotheken von potenziellen Ras-Desaktivatoren zu entwerfen, wurden bald eingestellt, da das Programm nicht dazu geeignet ist, Liganden an Proteinoberflächen zu entwickeln. Jedoch zeigte die Betrachtung der Kristallstrukturen, dass beispielsweise eine teilweise positiv geladene Proteinoberfläche relativ nah am zweiten Ring der Benzophenoneinheit eine Wechselwirkung mit einem negativ geladenen Substituenten (z. B. Carboxylatgruppe o.ä.) eingehen könnte.

3.1.2 Aufbau der Benzophenongrundstruktur

Ausgangspunkt der synthetischen Arbeit war die Fähigkeit von 3,4-Diaminobenzophenon, die Spaltung von kovalent gebundenem Guanosintriphosphat zu Guanosindiphosphat und einer bis dahin nicht näher untersuchten Phosphor^V-Verbindung herbeizuführen (vide infra). Die intrazelluläre Konzentration von GTP ist mit ca. 0.35 mM so hoch, dass ein modifiziertes GTP nur dann als Modulator wirken kann, wenn die Bindungsaffinität um einige Dimensionen erhöht wird. Die inhärente Labilität und zu erwartende schlechte Membrangängigkeit machen das Addukt zu einer ungeeigneten Leitstruktur. Um einen besseren Ausgangspunkt für die Entwicklung von Ras-Effektoren zu finden, wurden daher mehrere Ansätze gewählt. Zum einen wurde in einer anderen Arbeit eine Bibliothek von Tripeptiden mit GTP modifiziert und auf ihre Fähigkeit getestet, Ras zu binden.^[67] Ausgehend von den so gewonnen Erkenntnissen sollte es anschließend möglich sein, höhere Bindungsaffinitäten zu generieren und dann beispielsweise über das Design von Peptidmimetika in einem iterativen Prozess zu nicht-peptidischen Ras-Effektoren zu gelangen.

Im Bereich der niedermolekularen Verbindungen sollte zunächst in einer Bibliothek das Benzophenon-Gerüst konstant gehalten werden. So sollten sowohl die Bindungsaffinität zu Ras als auch die Fähigkeit, die Hydrolyse anzuregen, untersucht werden. In ersten Versuchen wurde hierzu die Aminogruppe in *para*-Stellung als Anknüpfungspunkt für die Festphasensynthese genutzt. Das Polystyrolharz wurde dazu über das Brommethylanalogon zum Wang-Linker mit Anilin verknüpft und sollte in einer Friedel-Crafts-Reaktion mit Benzoylchlorid umgesetzt werden.^[68, 69] Weder mit Bor- noch mit Aluminiumtrichlorid in Methylchlorid oder 1,2-Dichlorethan gelang eine Umsetzung. Eine Funktionalisierung von 4-Iodanilin am Harz durch einen Iod-Magnesiumbromid-Austausch, anschließende Transmetallierung zum Cuprat und darauffolgenden Angriff auf das entsprechende Säurechlorid^[70] gelang ebenso wenig wie eine carbonylierende Stille-Kupplung.^[71] Meist wurde das Edukt reisoliert und in keinem Fall konnte Anilin nachgewiesen werden, was zumindest auf die Bildung des reaktiven organometallischen Intermediats (4-Magnesiumbromidanilin bzw. 4-Trialkylzinnanilin oder die Palladiumspezies) schließen lassen könnte. Hier müssen die elektronischen Eigenschaften der Grund für die Reaktionsträgheit sein.

Durch die Einführung einer Carboxylgruppe als Ankergruppe für die Festphasensynthese konnten diese Schwierigkeiten umgangen werden. Die elektronenziehenden Eigenschaften dieses Substituenten machen die C-I-Bindung für eine Metallinsertion zugänglich. Ausgehend von 3- bzw. 4-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz waren nun 3- bzw. 4-Benzoylbenzoesäurestrukturen zugänglich. Aus Betrachtung der Kristallstruktur von G12V- und G12P- mutiertem Ras mit DABP-GTP **3a** konnte geschlossen werden, dass eine Säurefunktion keine sterischen Probleme verursachen würde. Im Gegenteil, eine partiell positiv geladene Proteinoberfläche in räumlicher Nähe zum zweiten aromatischen Ring könnte sogar vorteilhafte

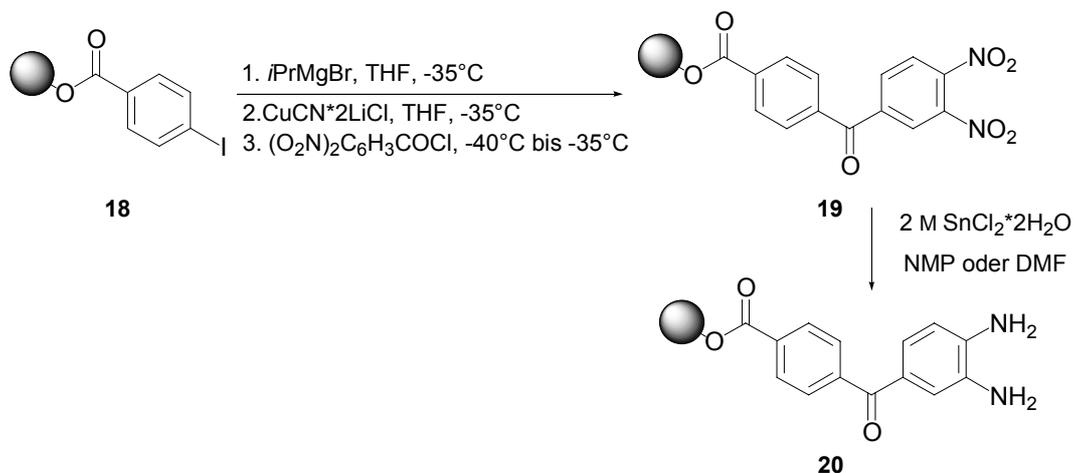
Wechselwirkungen mit dem Substrat bedingen. Zudem ließe sich eine solche Carboxylgruppe leicht zu einer Ester- bzw. Amidgruppe oder durch entsprechende Abbaureaktionen sogar zu einer Aminogruppe derivatisieren. Die gleiche Reaktion an 2-Chlortrityl PS Harz zeigte deutlich schlechtere Umsetzungen und somit auch schlechtere Ausbeuten.

Als Reaktionskomponente, die später in das entsprechende Säurechlorid überführt werden sollte, wurde zunächst eine entsprechend geschützte 3,4-Diaminobenzoesäure gewählt. Da die Verbindungen über einen säurelabilen Linker ans Harz gebunden waren, fiel die Wahl zunächst auf *tert*-Butyloxycarbonyl-(Boc-)-Schutzgruppen, um so eine globale Entschützung im Abspaltungsschritt zu gewährleisten. Die geringe Nukleophilie der Aminogruppen verursachte einige Probleme bei der zweifachen Schützung der Verbindung. Erst in refluxierendem absolutiertem Tetrahydrofuran mit sechs Äquivalenten Di-*tert*-butylpyrocarbonat gelang eine Umsetzung zu 3,4-Di-*tert*-butyloxycarbonylaminobenzoesäure (**15**) in 67% Ausbeute nach Flashchromatographie. Allerdings erwiesen sich die nun folgenden Acylierungsbedingungen als zu basisch. Die IR-Analyse zeigte eine Bande bei 2133 cm^{-1} (Isocyanatgruppen) und aus der Abspatlösung konnte kein Produkt mit der richtigen Masse isoliert werden. Aus Arbeiten von Knölker et al. ist bekannt, dass aus Boc-geschützten Aminogruppen unter stark basischen Bedingungen die entsprechenden Isocyanate erhalten werden können. [72, 73]

Die leichte Überführbarkeit aromatischer Nitrogruppen in Aminogruppen z. B. durch Zinndichlorid Hydrat in Dimethylformamid oder *N*-Methylpyrrolidon war Anlass, die Aminogruppen als Nitrogruppen zu maskieren, das heißt 3,4-Dinitrobenzoylchlorid (**16**) als Säurechlorid zu verwenden.

Nach Knochel et al.^[70] wurde die sorgfältig getrocknete immobilisierte 3- oder 4-Iodbenzoesäure **17** bzw. **18** in wasserfreiem THF bei $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 25 Äquivalenten frisch bereiteter 0.7 M *iso*-Propylmagnesiumbromid Lösung in THF versetzt. Das Harz wurde zwei Stunden bei $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ langsam gerührt. Nach Ummetallierung durch Zugabe von 25 Äquivalenten 1 M $\text{CuCN}\cdot 2\text{LiCl}$ in wasserfreiem THF und Kühlen auf $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ werden 30 Äquivalente 3,4-Dinitrobenzoylchlorid (**16**) in wenig THF zugegeben, das Gemisch auf $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ gebracht und weitere 2 h vorsichtig durchmischt (s. Schema 10). Das Säurechlorid wurde zuvor in Methylenechlorid aus 3,4-Dinitrobenzoesäure, 1.05 Äquivalenten Oxalylchlorid und katalytischen Mengen Dimethylformamid hergestellt. Das Produkt wurde zum einen durch Infrarotspektroskopie charakterisiert und zum anderen von einem Teil des Harzes eine Probe zur weiteren analytischen Charakterisierung abgespalten. Die Beladung wurde durch Elementaranalyse anhand des Stickstoffanteils an der Gesamtmenge bestimmt. Da erst im Acylierungsschritt Stickstoff in die Gesamtmasse eingebracht wird, kann auf dieser Stufe eine solche Untersuchung über den Beladungsgrad des Harzes Auskunft geben. Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurden drei verschiedene Proben je zweimal gemessen,

die Variation lag innerhalb von $\pm 3\%$. Die Beladungen lagen jeweils im Bereich 0.45 und 0.55 mmol/g.

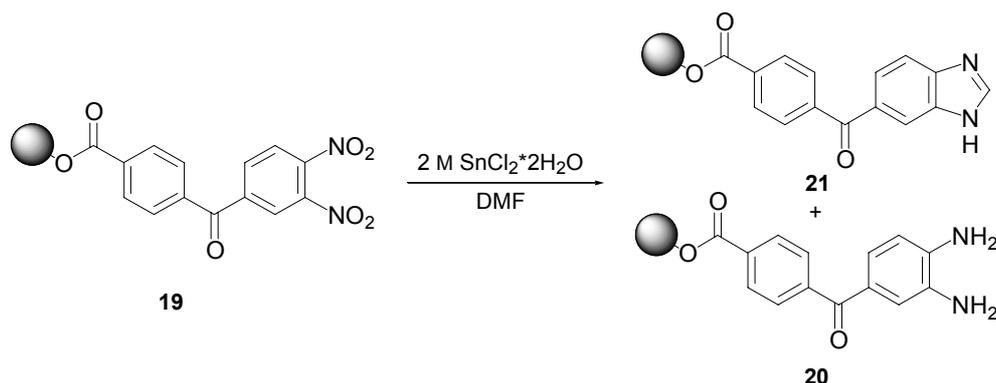


Schema 10: Synthese von 4-(3',4'-Diaminobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz (**20**), die Herstellung von 3-(3',4'-Diaminobenzoyl)-benzoesäure (**20b**) erfolgt analog ausgehend von 3-Iodbenzoesäure (**17**)

Die Reduktion der Nitrogruppen mit Zinndichlorid Hydrat in Dimethylformamid gelang zunächst nur unvollständig. Daher wurden Alternativen getestet, wie z. B. die Reduktion durch Natriumborhydrid in Anwesenheit von Kupferacetylacetonat^[74, 75] oder Natriumdithionit^[76] in einem Zwei-Phasen-System mit Phasentransferkatalysator. Auch der Zusatz von elektronenarmen Aromaten (in diesem Fall Hexafluorobenzol) zum Reduktionsgemisch wurde getestet. Obwohl die genannten Methoden erfolgreich waren, wurde die Durchführung der Reduktion mit Zinndichlorid Hydrat bei 50°C schließlich als die einfachste und direkteste ausgewählt.

Da die Reaktionsbedingungen sauer sind, wurde im Hinblick auf die Säurelabilität des Linkers die Reduktion in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung untersucht. Während eine einfache Zugabe von Base entweder zu keiner Reaktion oder aber zur Disproportionierung in Zinn⁰ und Zinn^{IV} führte, gelang eine Reduktion bei 50°C in Acetattuffer. Dazu wurde in einer 0.45 M Natriumacetat- und 0.54 M Essigsäurelösung in *N,N*-Dimethylformamid die entsprechende Menge Zinnchlorid gelöst. Die Reaktion verlief quantitativ. Bei säurerempfindlichen Substraten wie auch Linkern wäre demnach eine Reduktion im Acetat-Puffer möglich. Der Wang Linker ist jedoch ausreichend stabil, um die Reduktion in 2 M Zinnchlorid Hydrat Lösung auch ohne Puffer ohne Nebenreaktionen zu überstehen.

Die Reduktion erfolgte daher in 2 M $\text{SnCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in Dimethylformamid bei 50°C über Nacht. Dabei wurde als Nebenprodukt 4-(3*H*-Benzimidazolyl-5-carbonyl)benzoesäure **21** gefunden, die sehr wahrscheinlich durch Formylierung des Produktes mit Dimethylformamid entstanden ist (Schema 11). Der Wechsel des Lösungsmittels von Dimethylformamid zu *N*-Methylpyrrolidon unterbindet diese Nebenreaktion vollständig.



Schema 11: Bildung von 4-(3H-Benzoimidazol-5-carbonyl)-benzoesäure (**21**) bei der Behandlung mit Zinndichlorid Hydrat in DMF

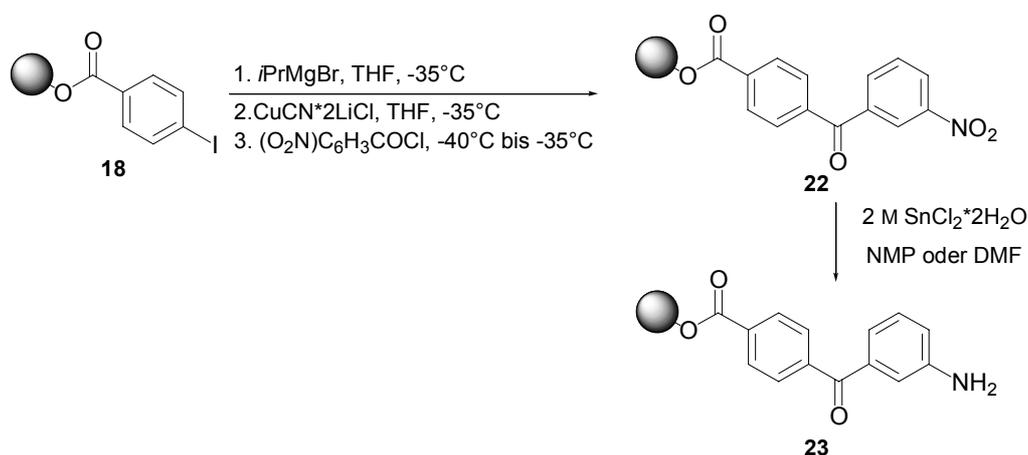
Die Spaltung der Produkte vom Wang-Linker erfolgte in 90% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid mit 0.1% Dimethylsulfid oder 1% Wasser als Scavenger. Die Produkte zeigten die erwartete Oxidationsempfindlichkeit und in der massenspektrometrischen Analyse fanden sich stets neben den Molekülpeaks auch die Signale für teilweise oxidierte Verbindungen. Eine Lagerung unter Argon verminderte das Auftreten solcher Signale, konnte es aber nicht völlig unterbinden. Wahrscheinlich erfolgt die Oxidation schon bei der Abspaltung.

Bei keiner der aromatischen Aminosäuren gelang trotz Variation der Laufmittel, basischer oder saurer Zusätze der Nachweis der Verbindung im LCMS. Der Protonierungszustand konnte nie so beeinflusst werden, dass die Verbindungen ionisierten und im Massenspektrometer sichtbar waren.

Wie die Arbeiten von Robert Gail in der Gruppe von Professor Wittinghofer zeigten, war die *p*-Aminogruppe von 3,4-Diaminobenzophenon dazu in der Lage, durch einen nukleophilen Angriff auf die γ -Phosphatgruppe die β -Phosphatgruppe zu eliminieren und ein zyklisches Phosphodiamid zu bilden.^[34] Bei der Entwicklung eines Assays zum Test der biologischen Wirkung konnte nur die Spaltung von GTP zu GDP untersucht werden. Eine Unterscheidung der beiden entscheidenden Vorgänge, nämlich die Bindung der Substanzen an Ras-GTP und der anschließende nukleophile Angriff auf das γ -Phosphat, war so nicht möglich.

Daher wurde nun eine Bibliothek entwickelt, deren Substanzen die Spaltung von GTP zu GDP nicht initiieren können. Bei Derivaten von 3-Aminobenzoylbenzoesäure kann wegen des Fehlens der Aminogruppe an Position 4 kein nukleophiler Angriff auf das γ -Phosphat mehr stattfinden, während die Bindungsabstände zwischen Benzophenongrundgerüst und kovalent gebundenem GTP gleich bleiben. Die Synthese des Grundgerüsts wurde wie auch schon mit 3,4-Dinitrobenzoesäure nun mit 3-Nitrobenzoesäure durchgeführt (s. Schema 12). Die Reduktion der Nitrogruppe wurde sowohl in Dimethylformamid als auch in *N*-Methylpyrrolidon durchgeführt, eine Formylierung des Produktes wurde nicht beobachtet.

Die Weiterreaktion zum Benzimidazolderivat **21** bedingt wohl eine Verlagerung des Reaktionsgleichgewichts zugunsten des formylierten Produkts. Auch die 3-Aminobenzoylbenzoesäuren sind oxidationsempfindlich, wie bei aromatischen Aminen üblich. Sie lassen sich jedoch besser handhaben und lagern als die vicinalen Diaminoverbindungen, die beispielsweise sehr leicht *ortho*-Chinon artige Strukturen ausbilden können.



Schema 12: Synthese von 4-(3'-Aminobenzoyl)benzoesäure an Wang-PS-Harz (**23**), die Herstellung von 3-(3'-Aminobenzoyl)benzoesäure (**24**) erfolgt analog ausgehend von 3-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz (**17**)

3.1.3 Benzophenon-Nukleotid-Konjugate

Die Synthese von 3-Aminobenzoylbenzoesäuren und der von diesen Verbindungen abgeleiteten möglichen Substanzbibliothek erfordert zugleich die Entwicklung eines Assays, um diese Verbindungen auch zu testen. Parallel zu den Synthesestrategien zum Aufbau niedermolekularer Verbindungen wurde eine Bibliothek von Oligopeptiden synthetisiert.^[67] Ihre Substanzen sollten anschließend auf ihre Bindungsaffinität bezüglich Ras untersucht werden. Um gleichzeitig zu erreichen, dass nur Liganden gefunden werden, die in räumlicher Nähe zur GTP-Bindungsstelle mit der Proteinoberfläche in Wechselwirkung treten, wurden die Peptide über einen Phosphonessigsäure-Anker mit GDP verknüpft und diese Addukte dann am Harz mit fluoreszenz-markiertem Ras-Protein auf ihre Bindungseigenschaften untersucht. Eine Modifizierung des beschriebenen Assays könnte auch für die Untersuchung der geplanten Bibliothek von niedermolekularen Liganden für das Ras-Protein in Frage kommen. Die 3-Aminogruppe der synthetisierten Substanzen dient dabei als Anknüpfungspunkt für ein GTP-Derivat unter Beibehaltung der Bindungsabstände, die in DABP-GTP vorliegen (s. Abb. 5).

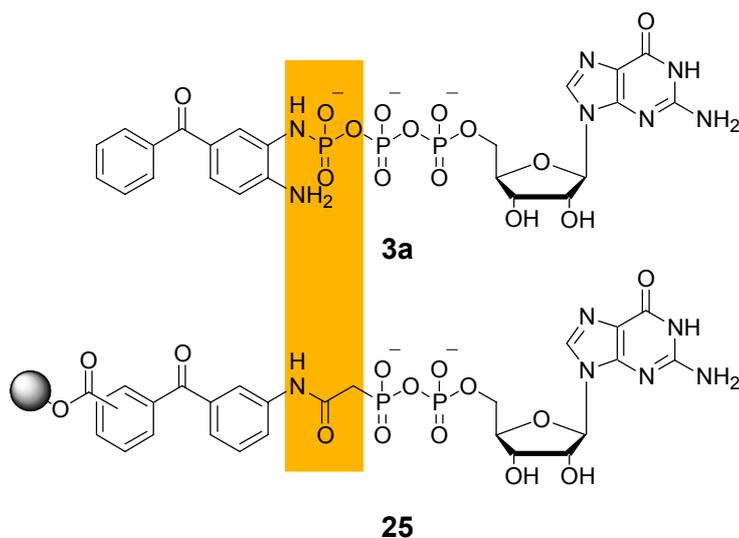


Abb. 5: Vergleich von DABP-GTP **3a** und dem festphasengebundenen Derivat ABB-GDP **25**, in dem das γ -Phosphat durch eine Acetylgruppe ersetzt wurde.

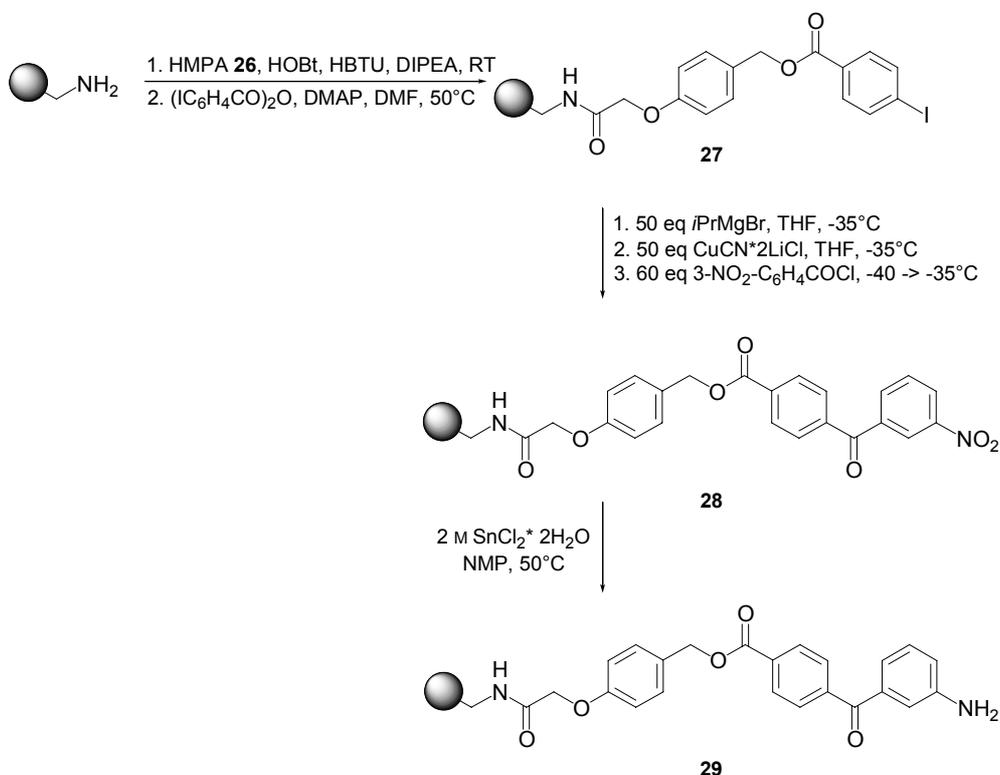
Da GDP und GTP eine vergleichbare Affinität zu Ras aufweisen, sollte das Ersetzen der γ -Phosphatgruppe durch einen Acetylrest nicht zu einem bedeutenden Affinitätsverlust führen. Die Verbindungen, die sich von 3-Aminobenzoylbenzoesäure ableiten, könnten an der Festphase aufgebaut und anschließend auch getestet werden.

Die Entwicklung des Assays für Oligopeptide zeigte, dass weder Polystyrolharz noch Tentagel[®] für die Untersuchungen geeignet waren. Daher wurde auf PEGA-Harz, ein von Meldal entwickeltes Trägerpolymer, zurückgegriffen, das eigens für chemoenzymatische Synthesen entwickelt worden war. Es ist dazu in der Lage, die gebundenen Moleküle einem Enzym oder allgemeiner einem Protein in wässrigem Medium zu präsentieren.^[77] Die Polyethylenglykolgruppen sind hydrophil und verursachen daher unter Umständen Probleme beim Aufbau der Verbindungen, denn schon der Aufbau der Benzophenonuntereinheit ist wasserempfindlich. Zudem wird das Harz spröde und brüchig, wenn es am Hochvakuum getrocknet wird, so dass das Wasser auf andere Weise aus dem Harz entfernt werden muss. Die Synthesebedingungen für 3-Aminobenzoylbenzoesäure und daraus abgeleitet von 3-[2-Phosphonoacetylamino]-benzoylbenzoesäure mussten daher angepasst werden.

Aminomethyl PEGA-Harz ist kommerziell erhältlich und wurde mit ebenfalls kommerziell erhältlicher 4-Hydroxymethylphenoxyessigsäure HMPA (**26**), einem säurelabilen Linker, gekuppelt.^[78] Die Hydroxymethylgruppe ist unter den für die Peptidsynthese an der festen Phase üblichen Bedingungen deutlich weniger nukleophil als die Aminomethylgruppe des Harzes, so dass eine Schützung dieser Funktionalität nicht erforderlich ist. Der Kaiser Test verläuft nach der Kupplung negativ, während der Methylrot-Test positiv verläuft. Es finden sich also keine freien Aminogruppen mehr am Harz, wohl aber freie Hydroxygruppen. Das Harz wird gleich nach der Aufarbeitung mit 4-Iodbenzoesäureanhydrid in Gegenwart von DMAP und Ethyldi-*iso*-propylamin umgesetzt. Eine IR-spektroskopische Untersuchung des

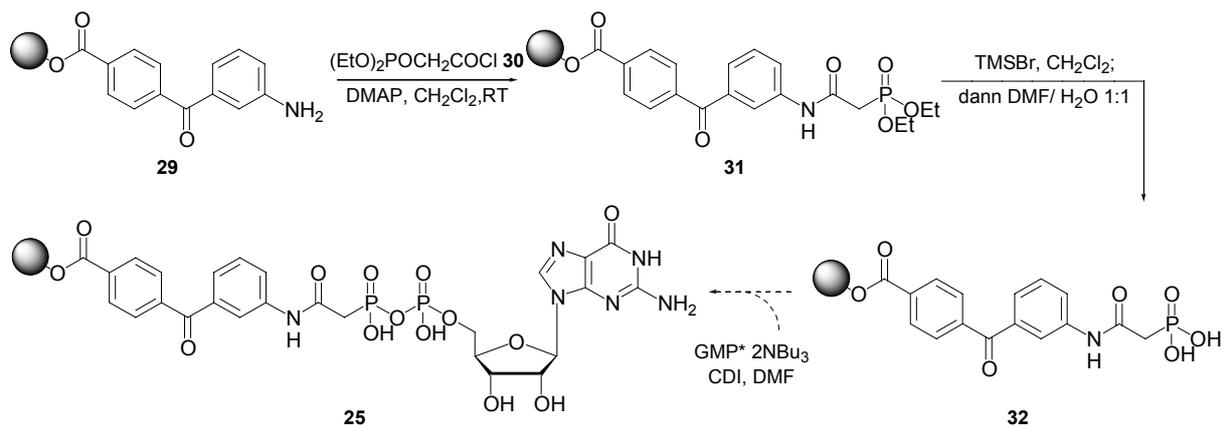
Harzes ist indes nicht möglich, da gequollenes Harz im wesentlichen das Spektrum des Lösungsmittels (DMF o. ä.) liefern würde und getrocknetes Harz stark schmiert und sich deswegen nur schwer handhaben lässt. Zudem würden die Amidgruppen des PEGA-Harzes interessante Bereiche des Spektrums dominieren, so dass der Informationsgewinn gering wäre. Sowohl die Kupplung der HMPA-Ankergruppe als auch die Beladung mit 4-Iodbenzoesäure erfolgt mit fünffachem Überschuss des Acyldonors (Schema 13).

Für die Acylierung wird das Harz viermal mit absolutiertem Dimethylformamid und dreimal mit absolutiertem Tetrahydrofuran gewaschen. Dimethylformamid ist sehr gut mit Wasser mischbar und sollte verbleibendes Wasser aus dem Harz hinausspülen. Die Acylierung wird in Tetrahydrofuran durchgeführt, daher wird das Harz mit diesem Lösungsmittel konditioniert. Die Reaktion wird ebenso wie die an Polystyrolharz bei $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt, allerdings wird ein fünfzigfacher Überschuss an *iso*-Propylmagnesiumbromid und Kupfercyanid-Lithiumchlorid-Lösung sowie ein sechzigfacher Überschuss an Säurechlorid eingesetzt. Durch diese hohen Überschüsse soll die Hydrolyse der festphasengebundenen Grignard- bzw. Cupratreagenzien vermieden werden. Die stark basischen Reaktionsbedingungen können zu einer teilweisen Deprotonierung im polymeren Träger führen. Die Reaktion wird durch Abspalten von der Festphase überwacht, sie verläuft in vergleichbaren Ausbeuten wie die an Polystyrolharz.



Schema 13: Synthese von 4-(3'-Aminobenzoyl)-benzoesäure an HMPA-PEGA-Harz **29**

Nach Reduktion der Nitrogruppe mit Zinndichlorid Hydrat in *N*-Methylpyrrolidon wird das Harz sofort mit Diethylphosphonoessigsäure umgesetzt (s. Schema 14). Wie die Parallelsynthese der Verbindung an Polystyrolharz gezeigt hat, ist dabei die aromatische Aminogruppe nicht reaktiv genug, um unter üblichen Kupplungsbedingungen mit dem entsprechenden Aktivester zu reagieren. Daher wird auch hier die Säure als Säurechlorid **30** voraktiviert und in Gegenwart von 4-Dimethylaminopyridin in Methylenchlorid gekuppelt. Das ^{31}P -Gelphasen-NMR von **31** zeigt nach der Umsetzung zwei Signale unterschiedlicher Intensität mit nur geringem Unterschied in der chemischen Verschiebung (23 bzw. 21 ppm). Dies könnte daran liegen, dass die Amidgruppen bei der Behandlung mit Diethylphosphonoacetylchlorid **30**, vielleicht auch schon zuvor mit 3-Nitrobenzoylchlorid, acyliert wurden und die Phosphonogruppe sich somit in zwei unterschiedlichen chemischen Umgebungen befindet. Die Entschützung des Phosphonats erfolgt mit Trimethylsilylbromid in absolutiertem Methylenchlorid und nachfolgender Aufarbeitung mit einem Dimethylformamid-Wasser-Gemisch. Das ^{31}P -NMR zeigt zwei dicht beieinander liegende Signale (15.3 ppm und 15.2 ppm), die chemische Verschiebung entspricht der freier Phosphonatgruppen. Damit ist die Verbindung **32** bereit für die Nucleotidkupplung.



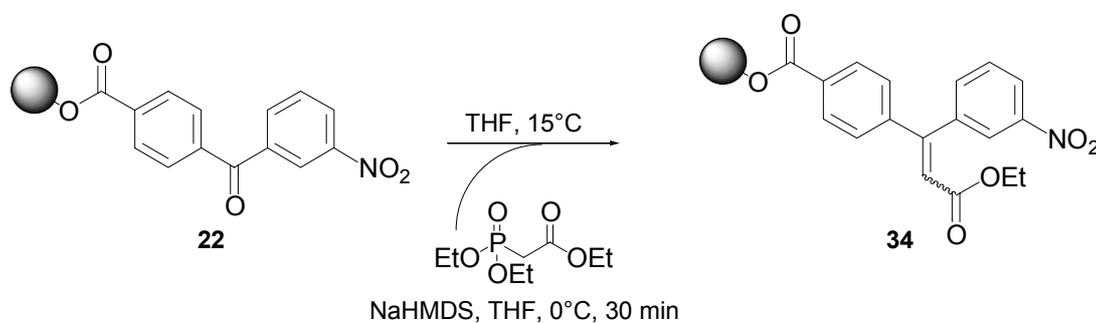
Schema 14: Mögliche Synthese des GMP-Aminobenzoylbenzoesäure-Adduktes an HMPA PEGA-Harz **25**

Prinzipiell sollte es somit möglich sein, einen On-bead-Assay durchzuführen. Mit fluoreszenz-markiertem Ras Protein kann die Bindung detektiert und auch grob nach ihrer Qualität beurteilt werden. Der Syntheseweg von 4-[3'-(Phosphonoacetylamino)benzoyl]benzoesäure (**32**) an PEGA-Harz belegen, dass mit entsprechender Vorbehandlung auch wasserempfindliche Schritte an diesem polymeren Träger ausgeführt werden können. Neben der Acylierungssequenz aus Iod-Magnesiumbromid-Austausch und Transmetallierung sind beispielsweise auch die Wittig- oder Horner-Wadsworth-Emmons-Olefinierung als Reaktionen einzuordnen, die absolut wasserfreie Bedingungen erfordern. Die Synthese einer Bibliothek an der Festphase und anschließende biologische Untersuchung ist also nach dem derzeitigen Kenntnisstand möglich.

3.1.4 Variationen des Grundgerüsts

Derivatisierungen der Aminobenzophenongrundstruktur könnten beispielsweise die elektronischen Verhältnisse der Kopfgruppe modulieren, um den nukleophilen Angriff zu beschleunigen. Die Einführung geeigneter Substituenten könnte zudem eine Bindung an die Proteinoberfläche herbeiführen. Außerdem können die konformativen Eigenschaften verändert werden und so Rückschlüsse auf günstigere Bindungskonformationen zulassen.

Eine Derivatisierung der Carbonylgruppe war geplant, um die strukturelle Vielfalt der niedermolekularen Verbindungen zu erhöhen. Die Carbonylgruppe sorgt für eine relativ hohe Rigidität im Molekül, die durch Derivatisierung und zum Beispiel durch einen Wechsel der Hybridisierung von sp^2 auf sp^3 vermindert werden kann. Betrachtungen der Kristallstrukturen von DABP-GppNp mit G12V bzw. G12P zeigen, dass die Benzophenoneinheiten nicht planar vorliegen, sondern die beiden aromatischen Ringe gegeneinander verdrillt sind. Sie behalten die Konformation bei, die sie auch in anderen Kristallstrukturen einnehmen. Eine flexiblere Struktur könnte eventuell bessere Wechselwirkungen mit dem Protein ausbilden, weil eine angepasste Konformation leichter eingenommen wird. Als erster Startpunkt der Untersuchungen wurde eine Olefinierungsreaktion (beispielsweise Wittig- oder Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktionen) ausgewählt. Zudem sollte eine Verkürzung des Abstands der beiden Ringe untersucht werden, d. h. eine Biphenyleinheit anstelle der Benzophenoneinheit oder ihrer Derivate.

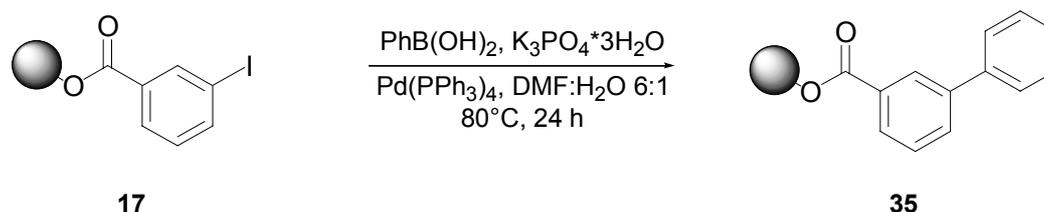


Schema 15: Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion von **22** an Wang-PS-Harz mit Triethylphosphonsäureacetat

Unter den Olefinierungsreaktionen von Carbonylgruppen haben sich die Wittig- und die Horner-Wadsworth-Emmons Reaktion als äußerst vielseitig und tragfähig erwiesen. Für beide Reaktionen sind schon zahlreiche Umsetzungen an der festen Phase beschrieben worden. Wie auch bei der Reaktion in Lösung sind die gebildeten Ylide sehr feuchtigkeitsempfindlich, daher müssen die polymeren Träger durch Koevaporation mit Toluol sorgfältig getrocknet werden, um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten. Die Reaktion am polymeren Träger wird in Tetrahydrofuran durchgeführt, denn das Harz quillt nur schlecht im für Wittig-Reaktionen üblichen Dimethylsulfoxid. Außerdem erwies sich die Horner-Wadsworth-

Emmons Variante als die bessere Reaktion zur Derivatisierung der Carbonylgruppe. Das aromatische Keton ist vergleichsweise reaktionsträge. Erst die Reaktionsführung bei 15 °C über Nacht mit zehnfachem Überschuss an Ylid erzielte vollständige Umsetzungen (s. Schema 15). In einer Modellreaktion wurde 4-(3'-Nitrobenzoyl)benzoesäure **22** mit Triethylphosphonsäureacetat umgesetzt, das zuvor durch Deprotonierung mit Natrium-hexamethylsilazid in das Ylid überführt worden war.

Im Benzophenongrundgerüst liegen die beiden aromatischen Ringe gegeneinander verdreht und aus der gemeinsamen Ebene herausgedreht vor. Die Verdrillungsachsen schneiden sich etwa im verbrückenden Kohlenstoffatom zwischen den Ringen. Eine formale Verkürzung des Grundgerüsts um eben diese verbrückende Carbonylgruppe auf ein Biphenylgerüst lässt interessante Aufschlüsse über Einfluss der Molekülgeometrie und –rigidität auf das biologische Verhalten zu. Biphenylfragmente finden sich in vielen biologisch aktiven Molekülen und wurden unter anderem in einer NMR-spektroskopischen Protein-Bindungsstudie als „privilegierte Struktur“ identifiziert,^[79] bei geeigneter Substitution kann diese Einheit als α -Helix Mimetikum betrachtet werden.^[80, 81]



Schema 16: Suzuki-Kupplung von 3-Iodbenzoesäure an Wang- Ps-Harz **17** mit Phenylboronsäure

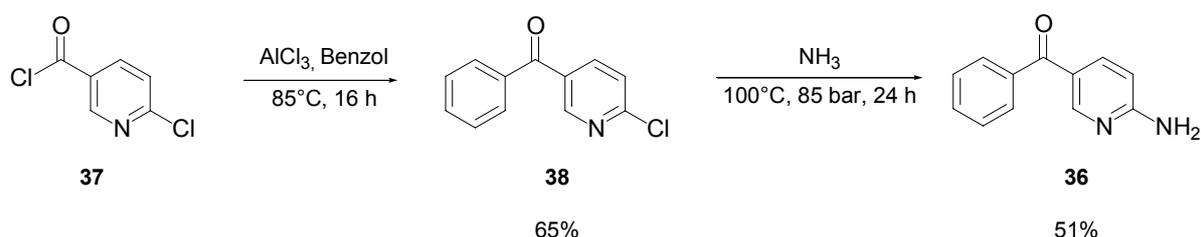
In einem orientierenden Experiment wurde 3-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz **17** in einer Suzuki-Reaktion mit Phenylboronsäure umgesetzt (s. Schema 16). Dabei konnten die von Uwe Grether gefundenen Reaktionsbedingungen ohne größere Anpassung übernommen werden.^[82, 83] Die Umsetzung verläuft mit elf Äquivalenten Phenylboronsäure und 22 Äquivalenten Kaliumtriphosphat Hydrat in einem Gemisch aus Dimethylformamid und Wasser im Verhältnis 6:1 bei 80 °C über 24 Stunden quantitativ.

Eine Bibliothek divers substituierter Biphenylderivate wird allerdings durch die geringe Anzahl von Boronsäuren (speziell solcher mit Aminofunktionen) stark beschränkt. Alternativ wäre die Herstellung der Boronsäure an der Festphase denkbar, indem beispielsweise die entsprechende Iodbenzoesäure durch ein Lithiumreagenz metalliert und anschließend mit Borsäure in das entsprechende Borderivat umgewandelt werden könnte. Die erfolgreiche Palladium-katalysierte Kupplung von Iodbenzoesäure zeigt auch, dass eine Pd-vermittelte Umsetzung der Iodbenzoesäure mit einem Diboranreagenz zur entsprechenden Boronsäure durchführbar sein sollte.

3.1.5 Nukleophile Kopfgruppen

Die ursprüngliche Entdeckung der Spaltung von GTP zu GDP durch kovalent gebundenes 3,4-Diaminbenzophenon an GTP in Gegenwart von Ras hatte die Natur der gespaltenen Phosphatspezies nicht berücksichtigt.^[33] Parallel zu den Synthesen wurden von Robert Gail weitere Untersuchungen vorgenommen und man konnte eine zyklische Phosphodiamid-Verbindung isolieren.^[34] Nachdem in den bisherigen Untersuchungen das Hauptaugenmerk auf der Variation des Grundgerüsts lag, sollten nun Strategien entwickelt werden, um nukleophile Kopfgruppen in die Moleküle zu integrieren, die keine kovalente Bindung zu GTP aufweisen.

Eine erste Idee für eine Kopfgruppe war die 6-Aminonicotinoylgruppe. Durch nicht kovalente Wechselwirkungen des endozyklischen Stickstoffs beispielsweise über eine Wasserstoffgruppe sollte ein gerichteter Beitrag zur Bindung an das Ras-Protein geleistet werden, der die nukleophile Aminogruppe für einen Angriff günstig positioniert. Aus diesem Grund wurde in Lösung 6-Aminonicotinoylbenzol (**36**) synthetisiert.^[84] Eine Friedel-Crafts-Acylierung von Benzol mit 6-Chlornicotinoylchlorid **37** bei 85 °C über Nacht führte zu 6-Chlornicotinoylbenzol (**38**). Unter Überdruck wurde das Reaktionsprodukt bei 100 °C mit Ammoniak umgesetzt. Nach wässriger Aufarbeitung ist keine weitere Aufreinigung mehr notwendig.

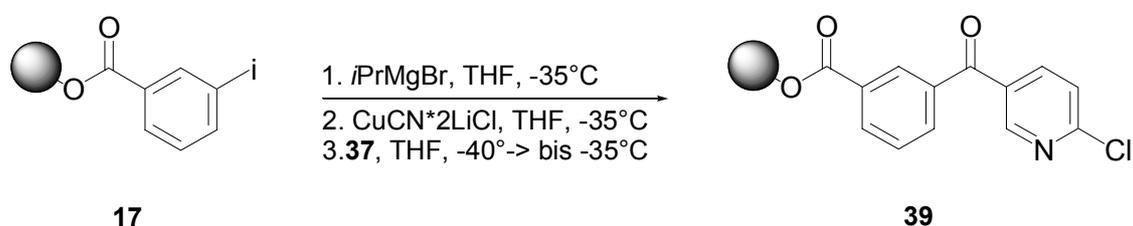


Schema 17: Synthese von 2-Amino-5-benzoylpyridin (**36**)

Die biologischen Tests mit 2-Amino-5-benzoylpyridin (**36**) waren nicht eindeutig. Der Nachweis von freiem Phosphat über eine Farbreaktion zeigte eine 20 prozentige Steigerung der Absorption. Allerdings zeigte auch der Vergleichstest eine gewisse Zunahme der Absorption, die wahrscheinlich auf eine Eigenabsorption der Verbindung bei der gegebenen Wellenlänge zurückzuführen ist.^[85] Auf jeden Fall stellte sich der entwickelte Assay als für diese Substanzklasse ungeeignet heraus.

Beim Aufbau des aromatischen Ketongrundgerüsts über die Acylierung einer festphasengebundenen Grignardverbindung kann 6-Aminonicotinsäure nicht mit freier Aminogruppe verwendet werden. Sämtliche Versuche, die Aminogruppe zu schützen, scheiterten vor allem an der äußerst schlechten Löslichkeit der Verbindung in nahezu allen organischen Lösungsmitteln bei neutralem pH-Wert, aber auch an der geringen Reaktivität der Aminogruppe. Aus diesem Grund wurde 6-Chlornicotinsäure eingesetzt, die in einem weiteren Schritt aminiert werden sollte. In der bekannten Reaktionsfolge wurden zunächst 3- und 4-Iodbenzoesäure an

Polystyrolharz über den Wang-Linker gebunden, anschließend in einer Iod-Magnesiumbromid-Austausch-Reaktion in das entsprechende Grignard-Reagenz überführt, kupriert und daraufhin mit 6-Chlornicotinsäure acyliert (Schema 18). Wie zuvor 3,4-Dinitrobenzoylchlorid und 3-Nitrobenzoylchlorid wurde auch 6-Chlornicotinoylchlorid (**37**) aus der entsprechenden Säure durch Behandlung mit Oxalylchlorid und katalytischen Mengen DMF in Methylenchlorid erhalten. Bemerkenswert ist, dass laut Elementaranalyse die erhaltene Beladung des Harzes mit 6-Chlornicotinoylbenzoesäure mit ca. 0.7 mmol/g deutlich über der Beladung für 3'-Nitro- bzw. 3',4'-Dinitrobenzoylbenzoesäure aus der gleichen Reaktionssequenz liegt. Eine Erklärung für dieses Ergebnis liegt vielleicht in der bekannt schlechten Verträglichkeit zwischen Nitrogruppen und Grignardreagenzien.^[86-88] Die Transmetallierung mit CuCN*2LiCl in THF dürfte ausschlaggebend dafür sein, dass bei der Acylierung mit nitrosubstituierten Säuren Produkt erhalten wird.



Schema 18: Festphasensynthese von 3-(6'-Chlornicotinoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz **39**

Für die Aminierung des Produktes am polymeren Träger waren die zuvor in Lösung verwendeten Reaktionsbedingungen (Suspension in einkondensiertem Ammoniak, Druck) ungeeignet. Einerseits sind bisher nur sehr wenige Festphasenreaktionen unter Druck bekannt und andererseits ist Ammoniak ein stark polares und daher ungeeignetes Lösungsmittel für die Festphasensynthese, in dem unpolare Polystyrolharze nicht oder nur sehr schlecht quellen dürften. Die Substitution von Chlor durch geeignete Nukleophile, wie z. B. Azide, führte zu komplexen Produktgemischen bzw. zur Spaltung vom Harz.

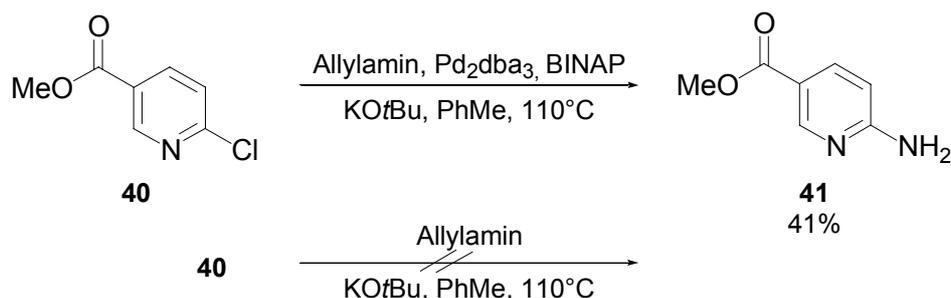
Eine relativ junge Variante der Aminierung ist die Palladium-vermittelte Aminierung von halogenierten Aromaten. Da *N*-Aryleinheiten in vielen Bereichen, unter anderem auch in der Wirkstoffentwicklung, von großer Bedeutung sind, wurde vor allem im letzten Jahrzehnt intensiv an diesem Reaktionstyp geforscht.^[89, 90] Im Fall von Aminopyridylsystemen verhindern Bidentat-Liganden die Bildung von katalytisch inaktiven, verbrückten zweikernigen Pd-Komplexen und außerdem die β -Hydrid-Eliminierung, die häufig als Nebenreaktion auftritt. Übliche Reaktionsbedingungen sind racemisches BINAP als Ligand, Pd₂dba₃ als Metallspezies und Natrium-*tert*-butoxid als Base. Reaktionsträgere Chloraromaten reagieren unter leicht modifizierten Bedingungen (z. B. Kalium-*tert*-butoxid als Base) und bei höheren Temperaturen.

Allylamin könnte die Möglichkeit bieten, in einer Ein-Topf-Reaktion das primäre Arylamin zu liefern. Denn in Anwesenheit eines Fängers kann die Allylgruppe durch Palladium-Katalyse abgespalten werden, wenn das Amin durch Protonierung in eine gute Abgangsgruppe überführt wurde. Unter Umständen wäre es also möglich, nach der Palladiumaminierung (in der für eine maximale Umsetzung erforderlichen Reaktionszeit) die Umgebung z. B. durch Zugabe von Säure und/ oder Allylfänger so zu verändern, dass nun die Allylgruppe abgespalten werden kann.

In einer Modellreaktion wurde 6-Chlornicotinsäuremethylester (**40**) mit Allylamin, Pd₂dba₃, racemischem BINAP und Kalium-*tert*-butoxid in Toluol bei 110 °C umgesetzt (Schema 19). Das 6-Chlornicotinoylsystem kann als zyklisches Imidylchlorid interpretiert werden und ist durch die Carboxylsubstitution zusätzlich aktiviert, so dass es unter den gegebenen Reaktionsbedingungen eine Reaktion eingehen sollte. Nach zwei Stunden ist das Edukt vollständig umgesetzt. Im GCMS des Rohprodukts wird unter anderem ein Signal mit der Masse von 6-Aminonicotinsäuremethylester (**41**) gefunden. Die Masse des geschützten Reaktionsproduktes 6-Allylaminonicotinsäuremethylester wird hingegen nicht detektiert. Nach Aufreinigung durch Flashchromatographie konnten 41% 6-Aminonicotinsäuremethylester (**41**) isoliert werden. Offensichtlich sind die Reaktionsbedingungen ebenso für eine Aminierung des Eduktes wie auch für eine Allylabspaltung geeignet.

Wahrscheinlich liegt zunächst ein Gemisch verschiedener Palladiumspezies im Reaktionsgemisch vor. Da jedoch im Fall von Allylamin mit Ammoniak keine gute Abgangsgruppe vorliegt, kann eine Reaktion nur aus dem Produkt einer oxidativen Addition des Palladiumkomplexes an das 2-Chlorpyridylsystem erfolgen. Nach der Koordination desamins an den Heteroaromaten und anschließender reduktiver Eliminierung könnte es zu einer erneuten Koordination des Substrates an das Metallzentrum kommen. Da die zyklische Amidinstruktur des Aminierungsproduktes eine weit bessere Abgangsgruppe als Ammoniak darstellt, wäre eine Übertragung des Allylrestes trotz der basischen Umgebung zumindest plausibel.

In einer Kontrollreaktion wurde Methylester **40** mit Allylamin und Kalium-*tert*-butoxid in Toluol versetzt. Die Reaktionskontrolle nach 30 min und nach 20 h zeigt keine Umsetzung. Die Reaktion verläuft also nur in Gegenwart von Palladium.



Schema 19: Testsystem zur Pd-Aminierung von 6-Chlornicotinsäurederivaten

Obwohl die Eigenschaften dieses besonderen Systems die Art der Reaktion stark begünstigen, bestätigt sich Allylamin als ein lohnendes Objekt in der Untersuchung geeigneter Ammoniakäquivalente zum Einsatz in Palladium-Aminierung. Bisherige Systeme erfordern zweistufige Reaktionsfolgen, bestehend aus Aminierung und anschließender Entschützung der eingebrachten Aminofunktionalität, deren Gesamtausbeuten ebenso wie die vorgestellte einstufige Reaktion im Bereich von 40% liegen.^[91-93] Da Umesterungen zwischen Methylestern und *tert*-Butoxiden unter den Reaktionsbedingungen bekannt sind, könnte ein Wechsel der Base von Natrium-*tert*-butoxid zu Cäsiumcarbonat günstige Auswirkungen auf die Ausbeute haben. Zum anderen könnten auch andere (Bidentat-) Liganden für dieses System besser geeignet sein als das verwendete BINAP-System. Der Zusatz von Liganden wie Chlorid-Ionen ist unter Umständen nicht notwendig, dafür ein Zusatz von LiBr von Vorteil. Da jedoch diese Reaktion nur als Test für die entsprechende Umsetzung an der Festphase dienen sollte und die Reaktionsbedingungen von Lösung zu Festphase stets sehr stark variieren, wurden die Bemühungen nun auf die Pd-Aminierung am polymeren Träger konzentriert.

Bisher bekannte Umsetzung von Bromaromaten an der Festphase liefen unter Standardbedingungen (Pd_2dba_3 , BINAP, NaOtBu) mit sekundären, zyklischen oder α -Methylbenzylamin an als Amid immobilisierter 4-Brombenzoesäure ab.^[94, 95] Daher wurden zunächst die Bedingungen auf die Festphase übertragen, lediglich der Überschuss an Reagenzien wurde drastisch erhöht. Unter Verwendung von 30 Äquivalenten Allylamin und Kalium-*tert*-butoxid in Tetrahydrofuran wird das Harz bei 110 °C in Toluol umgesetzt. Das IR-Spektrum zeigt deutliche Veränderungen, unter anderem nimmt die Intensität der Bande bei 1731 cm^{-1} ab (Carbonylbande). Da Esterbindungen unter den Bedingungen bekanntermaßen leicht gespalten werden, ist es wahrscheinlich, dass das Substrat vom polymeren Träger abgespalten wurde. Eine Behandlung mit 90% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid liefert kein eindeutig analysierbares Produkt. Auch der Wechsel der Reaktionsbedingungen zu Natrium-*tert*-butoxid als Base ändert dies nicht. Außerdem geliert nun das Reaktionsgemisch bei Zugabe der Base, so dass keine gute Durchmischung mehr möglich ist. Weitere Bemühungen, die Reaktionsbedingungen für die Reaktion an der festen Phase zu optimieren, wurden abgebrochen, weil sich durch Untersuchungen mit 2-Aminopyridin herausstellte, dass diese Gruppe auch in hohen Überschüssen nicht dazu in der Lage war, GTP zu spalten.^[96] Daher wurden die Anstrengungen zur Synthese von 2-Aminopyridylkopfguppen eingestellt.

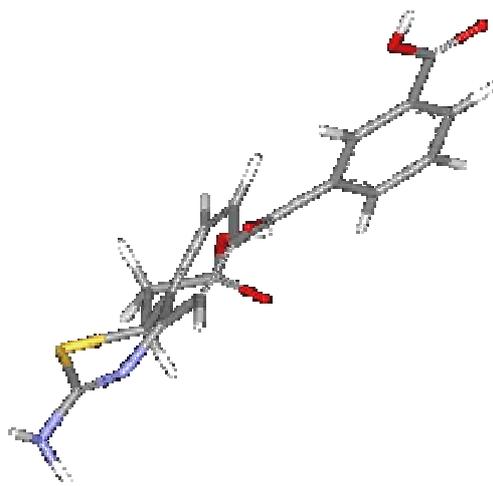
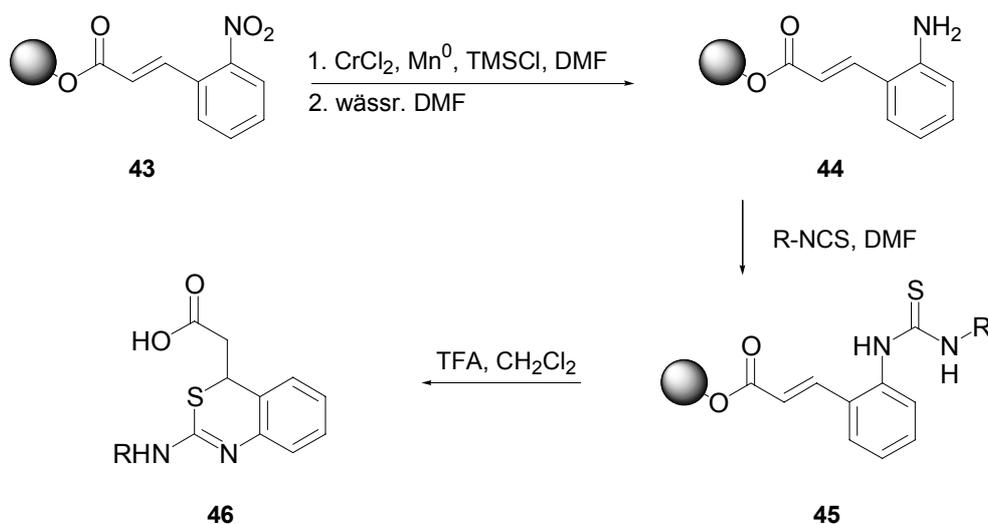


Abb. 6: Kraftfeldminimierte Struktur von 3-(2-Amino-4-carboxymethyl-4H-benzo[d][1,3]thiazin-7-carbonyl)-benzoesäure (**42a**) (Tripos^[62] Kraftfeld).

Eine bessere Nukleophile als die zyklische Amidin-Struktur sollte eine Thioharnstoff-Einheit aufweisen, die in etwa mit einer Guanidylgruppe verglichen werden kann. Eine Arbeit von Miller et al. demonstrierte die Synthese von Aminobenzothiazinen an der Festphase ausgehend von 2-Nitrozimtsäure (**43**).^[97] Eine 2-Aminobenzothiazin-Einheit kann als zyklischer Isothioharnstoff und somit als Nukleophil aufgefasst werden. Darüber hinaus bietet die Tatsache, dass es sich hierbei um kein aromatisch-planares Ringsystem handelt (s. Abb. 6), die Möglichkeit konformative Effekte der Kopfgruppe zu untersuchen. Ähnlich wie bei der Aminopyridylstruktur könnten Wechselwirkungen der endozyklischen N- und S-Heteroatome mit der γ -Phosphatgruppe von GTP die nukleophile Aminogruppe für einen Angriff positionieren.



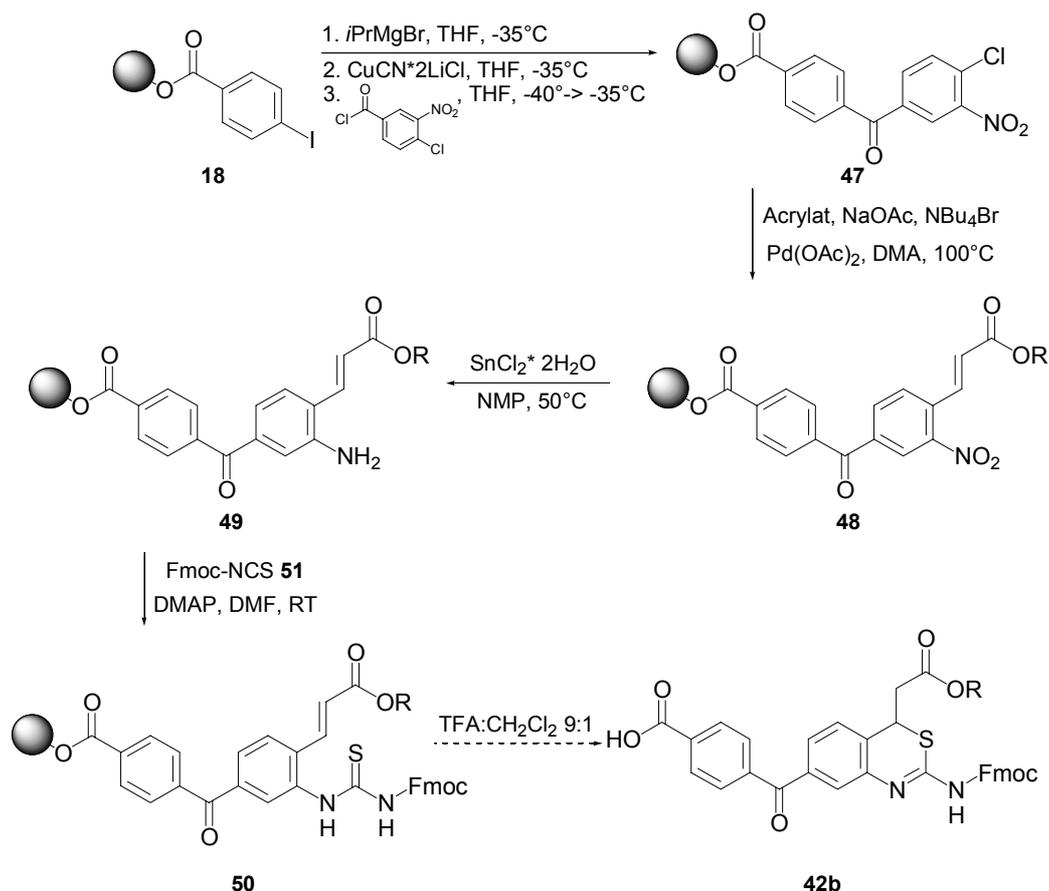
Schema 20: Festphasensynthese von Aminothioazinderivaten **46** an Wang-PS-Harz nach Hari et al.^[97]

Die publizierte Synthese geht von verschiedenen Nitrozimtsäurederivaten aus, die über die Säurefunktion an Wang-PS-Harz geknüpft werden. Nach einer Sequenz aus Reduktion und Umsetzung der Aminogruppe mit verschiedenen substituierten Isothiocyanaten wird durch Behandlung mit Trifluoressigsäure in Methylenchlorid in einem Schritt das Produkt **46** durch eine 1,4-Addition des Schwefels an die α,β -ungesättigte Säuregruppe erhalten und zugleich vom Träger entlassen.

Die angepasste Reaktionssequenz ging wiederum von 3- bzw. 4-Iodobenzoesäure an Wang-PS-Harz **17** oder **18** aus. Die Acylierungssequenz mit 4-Chlor-3-nitrobenzoylchlorid lieferte Beladungsgrade des Harzes von ca. 0.5 mmol/g, vergleichbar mit den Produkten der Acylierung mit anderen Nitrobenzoesäurederivaten (s. Schema 21). Um den Michael-Akzeptor zu erhalten, wurde nun eine Heck-Olefinierung mit Acrylsäurederivaten (*tert*-Butyl- und Ethylester) durchgeführt. Dabei zeigte sich der Chloraromat durch die elektronenziehenden Nitro- und Carbonylsubstituenten ausreichend für eine Palladium-Reaktion aktiviert. Die von Uwe Grether gefundenen Reaktionsbedingungen für Heck-Olefinierungen mussten dabei nur leicht angepasst werden.^[82, 83] So wurden statt sechs zwölf Äquivalente Acrylat eingesetzt, um eine vollständige Umsetzung zu erreichen. Die Reaktion von Chloraromat und *tert*-Butylacrylat verlief quantitativ, das Edukt konnte nicht isoliert werden. Die gleiche Umsetzung mit Ethylacrylat als Olefinkomponente verlief nicht vollständig. Grundsätzlich wurde auch ein geringer Anteil an 3'-Nitrobenzoylbenzoesäure gefunden, was auf die Insertion von Palladium schließen lässt. Allerdings wurde das Olefin nicht übertragen, sondern das Pd-Intermediat wahrscheinlich bei der Aufarbeitung hydrolysiert. Auch eine weitere Erhöhung des Überschusses an Acrylat konnte die Nebenreaktion nicht vollständig unterbinden. Nach der Heck-Arylierung wurde die Nitrogruppe mit 2M SnCl₂*2H₂O in NMP reduziert.

Um eine freie Aminogruppe am Benzothiazin erhalten zu können, wurde zunächst eine Umsetzung mit Tetrabutylammoniumrhodanid durchgeführt, die jedoch ohne Ergebnis blieb. Bei Verwendung von Fmoc-Isothiocyanat **51** kann die entstehende Aminogruppe sehr einfach basisch entschützt werden. Die Einführung einer Fmoc-Gruppe in das festphasengebundene Substrat erlaubt gleichzeitig die Reaktionsüberwachung durch quantitative Fmoc-Bestimmung.^[98] Die Synthese von Fmoc-Isothiocyanat **51** aus Kaliumrhodanid und Fmoc-Cl in Essigester erfolgt in guten Ausbeuten, die Produktbildung kann gaschromatographisch verfolgt und das Rohprodukt durch einfache Flashchromatographie gereinigt werden.^[99]

Durch den Carbonylsubstituenten in *meta*- und vor allem den vinylogenen Carbonylsubstituenten in *ortho*-Position ist die Nukleophilie der Aminogruppe eingeschränkt. Die einfache nukleophile Addition an das Isothiocyanat zeigte keine Umsetzung. Erst der Zusatz eines Katalysators wie 4-Dimethylaminopyridin führte zu einer Reaktion.



Schema 21: Synthese des offenkettigen Vorläufers **50** von 2-Fmoc-Aminobenzothiazinderivaten

Die nun geplanten Reaktionsschritte - zum einen die Zyklisierung und Abspaltung sowie die Entschützung durch Basenzusatz - könnten in beliebiger Reihenfolge durchgeführt werden. Die Reaktionssequenz aus Entschützung und anschließender Zyklisierung und Abspaltung schien praktikabler, da nach Abspaltung das Endprodukt ohne weitere Umsetzung nur aufgereinigt werden muss. Daher wurde sie als erstes durchgeführt. Das Abspaltprodukt zeigte ein äußerst komplexes LCMS-Chromatogramm, das zudem den gewünschten Molpeak nicht aufweist. Die alternative Route aus Zyklisierung und Abspaltung von **50** mit 90% Trifluoressigsäure in Methylenechlorid und Wasser als Fänger lieferte ein Produktgemisch, in dessen LCMS-Chromatogramm die Masse des gewünschten Fmoc-geschützten Produkts einem Peak zugeordnet werden kann. Auch das MALDI-TOF Massenspektrum weist das gewünschte Massensignal auf. Das NMR der isolierten Substanz zeigt allerdings ein Gemisch verschiedener Verbindungen. Eine Isolierung des Produkts gelingt nicht. Die entsprechende HPLC-Fraktion zeigt neben der gewünschten Masse noch zahlreiche andere Peaks und nicht das erwartete NMR-Spektrum.

In den Arbeiten von Miller et al. ^[97] wurde Phenylisothiocyanat eingesetzt. Um die Reaktionsfolge zu prüfen, wurde zur Herstellung des Thioharnstoffderivats nun Phenylisothiocyanat unter den für Fmoc-Isothiocyanat optimierten Bedingungen eingesetzt. Auch hier findet sich die gewünschte Molmasse im Massen-Chromatogramm des LCMS.

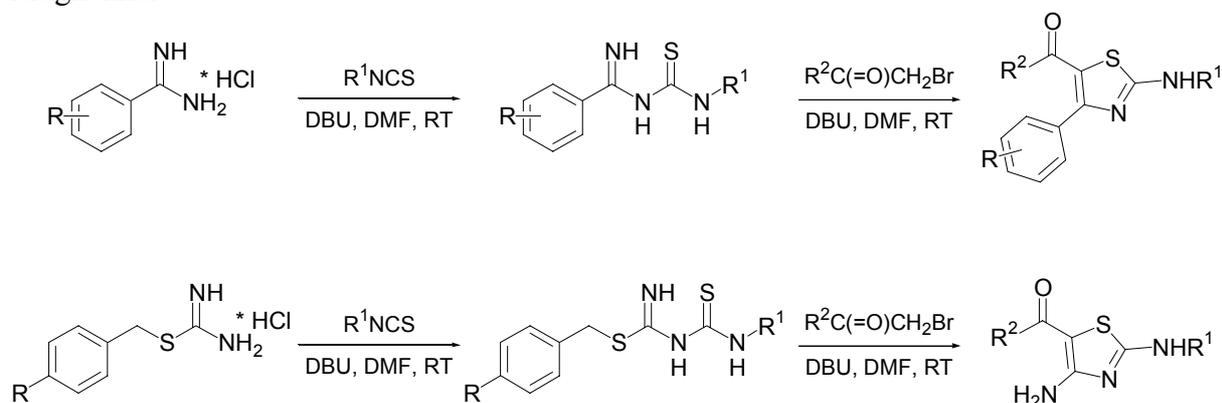
Eine Isolierung gelingt jedoch wiederum nicht. Offenbar wird die Zyklisierung durch die elektronenziehenden Substituenten in *para*-Position zur vinylogenen Säuregruppe erschwert. Während die Originalarbeit^[97] von guten Ausbeuten berichtet, gelingt in keinem Fall die Isolierung der leicht abgewandelten Analoga.

3.1.6 Aminothiazole

Aminothiazole können ebenso wie Aminobenzothiazine als zyklische Thioharnstoffe interpretiert werden. Durch Wechselwirkung des endozyklischen N-Heteroatoms mit der γ -Phosphatgruppe von GTP an Ras könnte diese nukleophile Aminogruppe so positioniert werden, dass ein Angriff auf die γ -Phosphatgruppe und somit eine nukleophile Spaltung von GTP zu GDP begünstigt würde.

Das 2-Aminothiazolsystem ist eine Struktureinheit, die häufig in biologisch aktiven Molekülen vorkommt.^[100] In jüngerer Zeit wurden sie vor allen Dingen wegen ihrer Bedeutung in der Therapie allergischer Erkrankungen^[101], als Angiotensin II Antagonisten^[102], als Cyclooxygenase Inhibitoren^[103], als Inhibitoren bakterieller DNA Gyrase II^[104] und wegen ihres manipulativen Potenzials in Bezug auf Cyclin-abhängige Kinasen und damit der Regulation des Zellzyklus untersucht.^[105-107] Daneben wurde auch gezeigt, dass 2-Aminothiazole dazu in der Lage sind, Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) zu inhibieren.^[108]

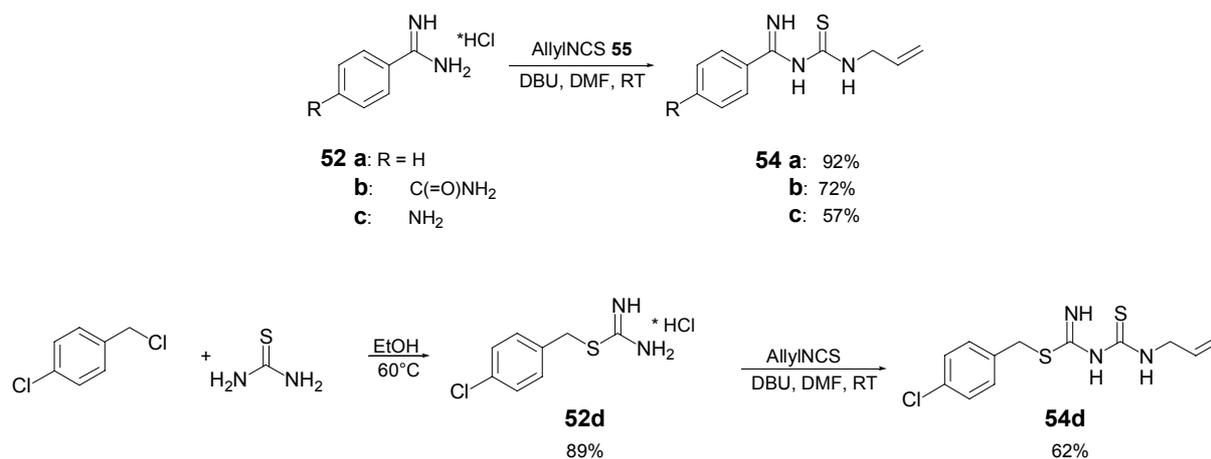
Eine effiziente Synthese in Lösung von verschieden substituierten 2-Amino-1,3-thiazolen und 2,4-Diamino-1,3-thiazolen wurde 2001 von Masquelin et al. berichtet (Schema 22).^[109] In einer Additionsreaktion wurden verschieden substituierte Thioisocyanate mit Arylamidinen zu entsprechenden Iminomethylthioharnstoffen umgesetzt. Mit α -Bromketonen wurden diese dann zu 2-Amino-4-aryl-1,3-thiazolen zyklisiert. Für die Synthese von Diaminothiazolen muss statt der Aryleinheit eine bessere Abgangsgruppe als Ammoniak über den Amidinsubstituenten eingeführt werden. Eine Benzylmercaptangruppe bietet diese Möglichkeit.



Schema 22: Synthese von 2-Amino-1,3-thiazolen und 2,4-Diamino-1,3-thiazolen in Lösung^[109]

Kurz darauf veröffentlichte die gleiche Gruppe die Adaption des Syntheseweges für die Festphase. Dabei wird das Thioharnstoffderivat an fester Phase immobilisiert und das α -Bromketon eingebracht.^[110]

Da in der Synthese von Ras-Desaktivatoren das Grundgerüst eines aromatischen Ketons konstant gehalten werden sollte, erschien es in diesem Fall sinnvoller, das betreffende Keton an der Festphase zu generieren und die Thioharnstoffderivate einzuführen, die leicht in ein bis zwei Stufen erhalten werden.



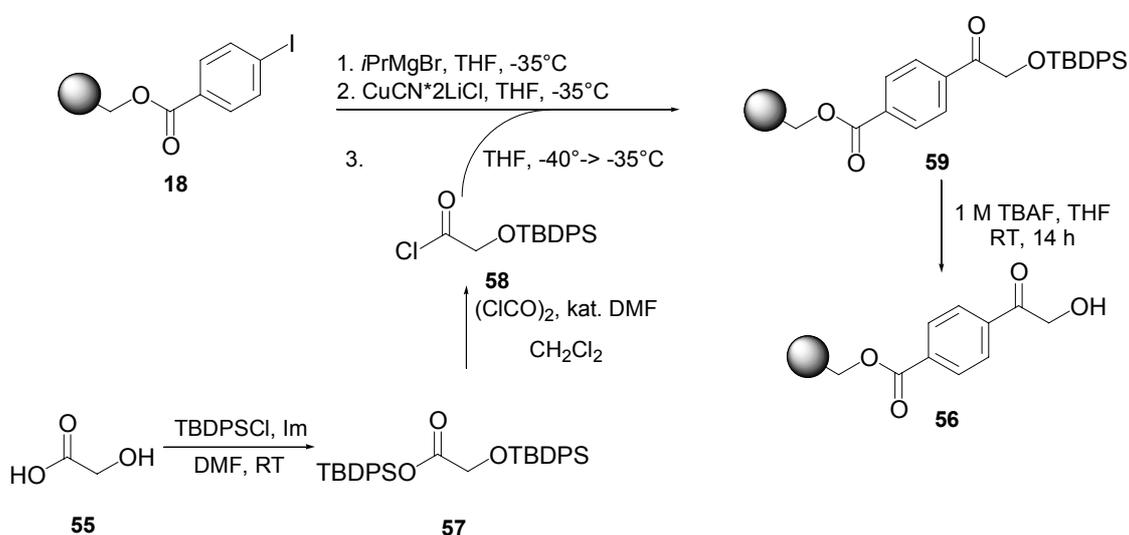
Schema 23: Herstellung der Thioharnstoffderivate **54**

Diese Thioharnstoffderivate wurden aus arylsubstituierten Amidinen **52a-c** bzw. *p*-Chlorbenzylisothioureidoniumchlorid **52d** und Allylisothiocyanat **53** mit DBU als Base hergestellt. Dabei erwies es sich als wichtig, dass die Konzentration der Base in DMF 0.2 mol/l nicht überstieg, da sonst eine Zersetzung der Edukte erfolgte. Um eine freie Aminogruppe am C-2 des Thiazolgerüsts zu generieren, wurde nach einem Thioisocyanat gesucht, das gleichzeitig eine Schutzgruppe für diese Aminogruppe in sich trägt. Kommerziell erhältlich sind Trimethylsilylisothiocyanat und Allylisothiocyanat, außerdem ist Fmoc-Isothiocyanat recht einfach und zügig herzustellen. Die Trimethylsilylgruppe ist als Schutzgruppe für einen Stickstoffsubstituenten wegen der labilen SiN-Bindung nicht geeignet. Aufgrund der stark basischen Bedingungen bei Herstellung der Derivate und auch bei der Zyklisierung ist die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe ebenso ungeeignet. Hingegen bietet die Allylgruppe die Möglichkeit, sie als Schutzgruppe während der Synthese zu erhalten und anschließend recht mild mit Dimethylbarbitursäure als Fänger abzuspalten.^[111] Die Iminomethylthioharnstoffe **54a-c** wurden aus den entsprechenden Amidin-Hydrochloriden und Allylisothiocyanat hergestellt. Nach wässriger Aufarbeitung und anschließender Flashchromatographie wurden die Produkte in guten Ausbeuten erhalten.

Die Herstellung von *p*-Chlorbenzylisothioureidothioharnstoff **54d** verläuft in zwei Stufen über die Reaktion von Thioharnstoff und *p*-Chlorbenzylchlorid zu *p*-Chlorbenzylisothioureidoniumchlorid **52d** und die anschließende Umsetzung mit Allylisothiocyanat **53** und DBU in DMF. Wiederum sollte die Basenkonzentration 0.2 mol/l nicht übersteigen. Auch hier

konnte das Produkt nach wässriger Aufarbeitung und Flashchromatographie erhalten werden. Die Herstellung von Benzylisothioureidothioharnstoff verlief analog über zwei Stufen ausgehend von Benzylmercaptan und Thioharnstoff in vergleichbaren Ausbeuten.

Das α -Bromketon könnte wie die übrigen aromatischen Ketone durch ein festphasengebundenes Organocuprat und beispielsweise Bromessigsäure hergestellt werden. Allerdings bieten sowohl die Carboxylatgruppe als auch das Bromid Positionen für einen nukleophilen Angriff. Um eine klare Unterscheidung der Carboxylatgruppe vom α -Kohlenstoffatom zu erreichen, wurde zunächst von Glykolsäure (**55**) ausgegangen, deren Hydroxyfunktion in einer Appel-Bromierung zum entsprechenden Bromacetylrest umgesetzt werden sollte. Allerdings sind bisher keine Appel-Bromierungen an der Festphase bekannt.



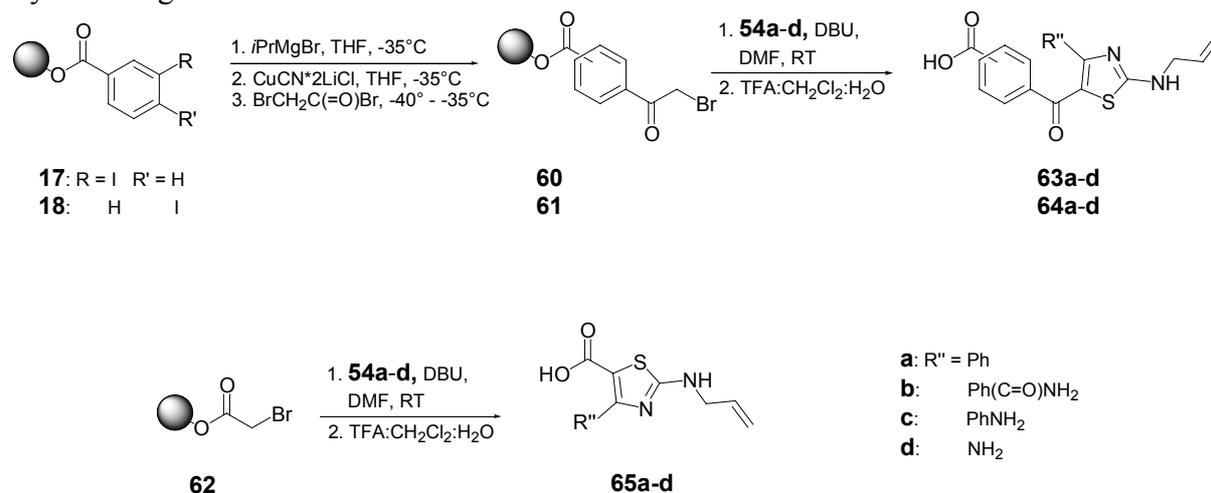
Schema 24: Synthese von 4-Hydroxymethylbenzoesäure an Wang-PS-Harz **56**

Zunächst wurde Glykolsäure (**55**) mit *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid global geschützt. Der *tert*-Butyldiphenylsilyloxyessigsäure-*tert*-butyldiphenylsilylester (**57**) lässt sich mit Oxalylchlorid und katalytischen Mengen DMF sehr mild unter neutralen Bedingungen in das Säurechlorid **58** überführen^[112], das in der Acylierungssequenz eingesetzt wird. Um den Silylether **59** zu spalten, wird das Harz mit 1 M Tetrabutylammoniumfluorid in Tetrahydrofuran behandelt. Die Reaktionskontrolle wird IR-spektroskopisch durchgeführt, nach der Reaktion ist eine sehr deutliche, scharfe Hydroxybande zu beobachten. Damit ist der Vorläufer **56** für die Appel-Bromierung bereit. Unter den klassischen Reaktionsbedingungen mit Tetrabromkohlenstoff und Triphenylphosphin zeigte sich jedoch keine oder eine nur unvollständige Umsetzung. Im IR-Spektrum trat jeweils sehr deutlich eine Hydroxy-Absorptionsbande auf. Auch andere Vorläufer der aktiven Bromierungsspezies, wie z. B. *N*-Bromsuccinimid und Triphenylphosphin oder auch *N*-Bromsuccinimid und Dimethylsulfid konnten keine vollständige Umsetzung erreichen. Mit diesen Resultaten wurde nun doch die

Acylierung mit Bromessigsäurebromid untersucht. Nach Abspaltung konnte kein Phenylessigsäurederivat detektiert werden, wie man es von einem Angriff des Cuprats auf das α -Kohlenstoffatom erwarten würde. Damit sind die entsprechenden α -Bromketone in einem Schritt von Iodbenzoesäure ausgehend zugänglich.

In der ersten Stufe des Synthesewegs wurden wiederum ausgehend von 3- bzw. 4-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz **17** bzw. **18** durch Iod-Magnesiumbromid-Austausch, Cuprierung und Acylierung mit Bromessigsäurebromid die entsprechenden Bromacetylbenzoesäuren **60** und **61** hergestellt (Schema 25). Für die freien Aminothiazolylcarbonsäuren wurde Wang-PS-Harz direkt mit Bromessigsäure beladen.

Die Heterozyklen bilden sich aus den Edukten bei Behandlung mit DBU. Auch hier darf die Konzentration der Base nicht über 0.2 mol/l liegen, um eine Zersetzung des Thioharnstoffes zu vermeiden. Die ersten Syntheseversuche fanden mit 20fachem Überschuss der Reagenzien in Bezug auf die festphasengebundenen α -Bromcarbonylverbindungen **60-62** statt. Spätere Optimierungsexperimente zeigten, dass ein fünffacher Überschuss durchaus ausreicht, um die Zyklisierung zu bewirken.

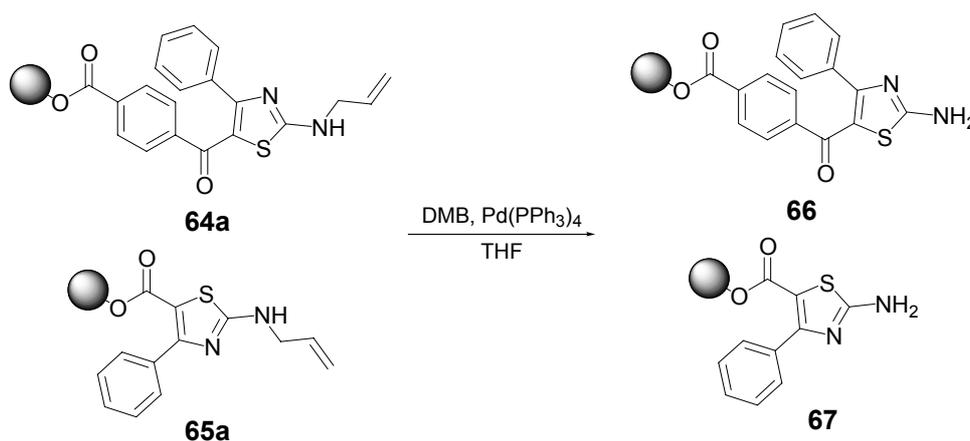


Schema 25: Herstellung von 2-Allylamino-1,3-thiazol-5-yl-5-benzoesäuren **63** und **64** bzw. 2-Allylamino-1,3-thiazol-5-ylcarbonsäuren an Wang-PS-Harz **65**

Im Gegensatz zur Hantzsch-Synthese bleibt die Ketogruppe erhalten, da das Thioharnstoffderivat durch die zusätzliche Iminomethyl- bzw. die Isothioureidogruppe nicht nur die Heteroatome, sondern auch die Carbonylgruppe einführt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass wie bei der Hantzsch-Synthese der erste Schritt die Alkylierung des Schwefel durch die Brommethylgruppe ist. Anschließend erfolgt der Angriff über das Enolat der Ketogruppe auf die entsprechende Iminokomponente. Je nach Substitution dieser Gruppe wird Ammoniak (im Falle des Arylsubstituenten) oder *p*-Chlorbenzylthiolat eliminiert. Experimente mit Benzylisothioureidoniumbromid anstelle der *p*-Chlorkomponente führten in deutlich schlechteren Ausbeuten zum gewünschten 2-Allylamino-4-amino-1,3-thiazolderivat.

Wahrscheinlich verbessert der elektronenziehende Chlorsubstituent die Eigenschaften als Abgangsgruppe im Vergleich zu Ammoniak.

Die Bildung der Aminothiazole führte zu intensiv violett bis braunschwarz gefärbten polymeren Trägern und konnte über charakteristische Banden im IR verfolgt werden (Allylschwingung bei $2800\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$, $\text{-N-C(-NH}_2\text{)=S-}$ um 1690 cm^{-1}). Nach Abspaltung mit $\text{TFA:CH}_2\text{Cl}_2\text{:H}_2\text{O } 90\text{:}10\text{:}1$ wurden die entsprechenden gelb bis rot gefärbten Allylaminothiazole **63-65** isoliert.



Schema 26: Entschützung von Allylaminothiazolylderivaten **64a** und **65a** mit DMB und $\text{Pd(PPh}_3\text{)}_4$

Auf der Stufe der allylgeschützten Aminothiazolderivate ist es nun möglich, die Carbonylgruppen zu derivatisieren (Horner-Wadsworth-Emmons Olefinierung, reduktive Aminierung usw.). Danach wird im letzten Schritt die Allylgruppe entfernt, bevor das Produkt vom polymeren Träger abgespalten wird. Die Entschützung erfolgt unter Pd-Katalyse mit DMB als Abfangreagenz in THF unter Rückfluss. Eine Testreaktion mit 2-Allylamino-4-phenylthiazolyl-5-carbonsäure an Wang-PS-Harz **65a** führte zur vollständigen Abspaltung der Allylschutzgruppe, während die Entschützung von 3-(2-Allylamino-4-phenylthiazolyl-5-carbonyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz **64a** nur zu etwa 25% erfolgte (HPLC 210 nm). Das Edukt konnte reisoliert werden (s. Schema 26).

3.1.7 2-Aminothiazol-Derivate als Inhibitoren von Rezeptor-Tyrosinkinasen

Obwohl die Tyrosinphosphorylierung nur ca. 0.01% der gesamten Phosphorylierung in der Zelle ausmacht, sind Phosphotyrosine wahrscheinlich der primäre, wenn nicht sogar einzige Indikator von Signaltransduktion in multizellulären Organismen.^[113] Phosphorylierung von Tyrosinresten findet sich fast ausschließlich in Metazoen. In einzelligen Eukaryoten treten Phosphotyrosinreste nur bei Regulatoren der Zellzyklus-Kinasen und Mitgliedern der

„mitogen-activated protein“ (MAP) Kinase Familie auf. Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) sind Teil der transmembranären Signalweiterleitung. Wie andere Kinasen übertragen sie die γ -Phosphat Gruppe von ATP auf das Substrat. Eine verstärkte Kinaseaktivität und somit auch intensivere Signalweiterleitung wurde bei vielen Krebsvarianten und anderen proliferativen Krankheiten wie z. B. Psoriasis oder Atherosklerose gefunden.

Die Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase erfolgt durch Autophosphorylierung als Folge der konformativen Änderung durch das extrazelluläre Binden des Wachstumsfaktors. Dadurch wird das aktive Zentrum auf der cytosolischen Seite der Zellmembran für andere Substrate zugänglich und das Signal kann so ins Innere der Zelle weitergeleitet werden. Prinzipiell könnte also ein RTK-Inhibitor die Autophosphorylierung oder die Phosphorylierung von „downstream“ Effektoren unterbinden. Die Inhibition der Autophosphorylierung hätte hierbei den Vorteil, dass der gesamte Signalweg „abgeschaltet“ werden würde. Seit ca. 15 Jahren werden zahlreiche Anstrengungen unternommen, die Signaltransduktionskaskaden zu unterbrechen, die durch Rezeptor Tyrosin Kaskaden ausgelöst werden. Dazu zählen unter anderem auch Farnesyltransferase-Inhibitoren, die die Bindung von Ras-Protein („downstream“ von den wachstumsfaktorbindenden Rezeptor Tyrosinkinase) an die Membran verhindern sollen.^[114, 115]

Auch Kinaseinhibitoren werden aus diesem Grund intensiv erforscht. Die zelluläre Weiterleitung von Signalen erfolgt nicht nur an der Membran, sondern auch im Cytosol mit Hilfe von Kinasen. Häufig wirken aktive Substrate als ATP- kompetitive Inhibitoren, d. h. sie besetzen die ATP-Bindungstasche. Es ist somit nicht immer zu vermeiden, mehr als eine Kinase mit einem Wirkstoff zu inhibieren. Man geht allerdings davon aus, dass für therapeutische Zwecke eine selektive Inhibierung nicht zwingend vonnöten ist, sondern es sogar zum Vorteil gereichen kann, beispielsweise mehrere Schlüsselschritte in der Angiogenese oder anderen biologischen Prozessen zu unterbinden.^[116-118]

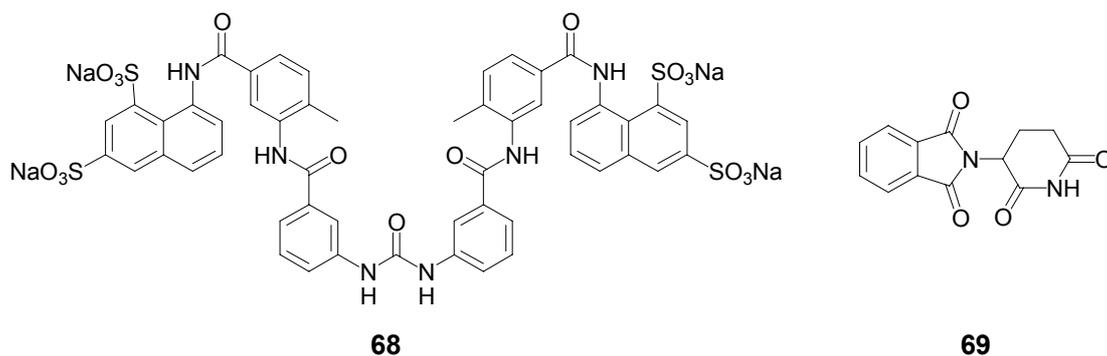


Abb. 7: Suramin **68** und Thalidomid **69** als Angiogenese-Inhibitoren in der klinischen Prüfung

Da der therapeutische Nutzen zudem höher eingestuft wird, als die Herausforderung, selektiv eine bestimmte Kinase zu inhibieren, haben einige Substanzen inzwischen die klinische Phase III erreicht (Abb. 7). Thalidomid **69** wurde als aktiver Bestandteil von Contergan bekannt, hat sich aber auch in der Therapie gegen Lepra bewährt. Auf welche Weise es die

Angiogenese hemmt, ist noch unklar, es wird aber erfolgreich bei der Behandlung von Nierenkrebs und dem multiplen Myelom eingesetzt. Suramin **68** ist schon seit den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts bekannt und wurde ursprünglich als Mittel gegen die Schlafkrankheit eingesetzt. In den 80er Jahren wurde es auch als Therapeutikum bei HIV-Patienten erprobt, die Untersuchungen wurden aber nach einer Häufung von Todesfällen abgebrochen. Suramin bindet an die peptidischen Wachstumsfaktoren und verhindert so die Komplexbildung mit den entsprechenden Rezeptoren.^[119]

Da sich schon andere Aminothiazole in unserer Gruppe als interessante Startpunkte im Hinblick auf die Inhibition von Rezeptor-Tyrosinkinasen (Her-2/Neu, EGFR, IGF1R, VEGFR2 und VEGFR3) erwiesen hatten^[108], wurden diese Intermediate von Ralph Mazitschek im Arbeitskreis von Professor Giannis gegen verschiedene Kinasen getestet.

Für die biologischen Tests wurde ein Spektrum verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen ausgewählt, die von unterschiedlicher Bedeutung für die Zelldifferenzierung und –proliferation sind. Dabei wurde die Kinase-katalysierte Phosphorylierung von poly(Glu-Tyr) in Anwesenheit von verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen bestimmt. Die Kinasen wurden als Fusionsproteine von Glutathion-S-transferase (GST) und der betreffenden Kinasedomäne eingesetzt. Die Kinase-Aktivität wurde durch einen anti-Phosphotyrosin Antikörper bestimmt, der an Meerrettich Peroxidase (*horseradish peroxidase* POD) konjugiert war. Die durch die POD-katalysierte Reaktion hervorgerufene Chemiluminiszenz wurde anschließend quantifiziert.^[120] Für das erste Screening wurden Dreifachbestimmungen und für die Bestimmung des IC₅₀-Wertes Vierfachbestimmungen durchgeführt.

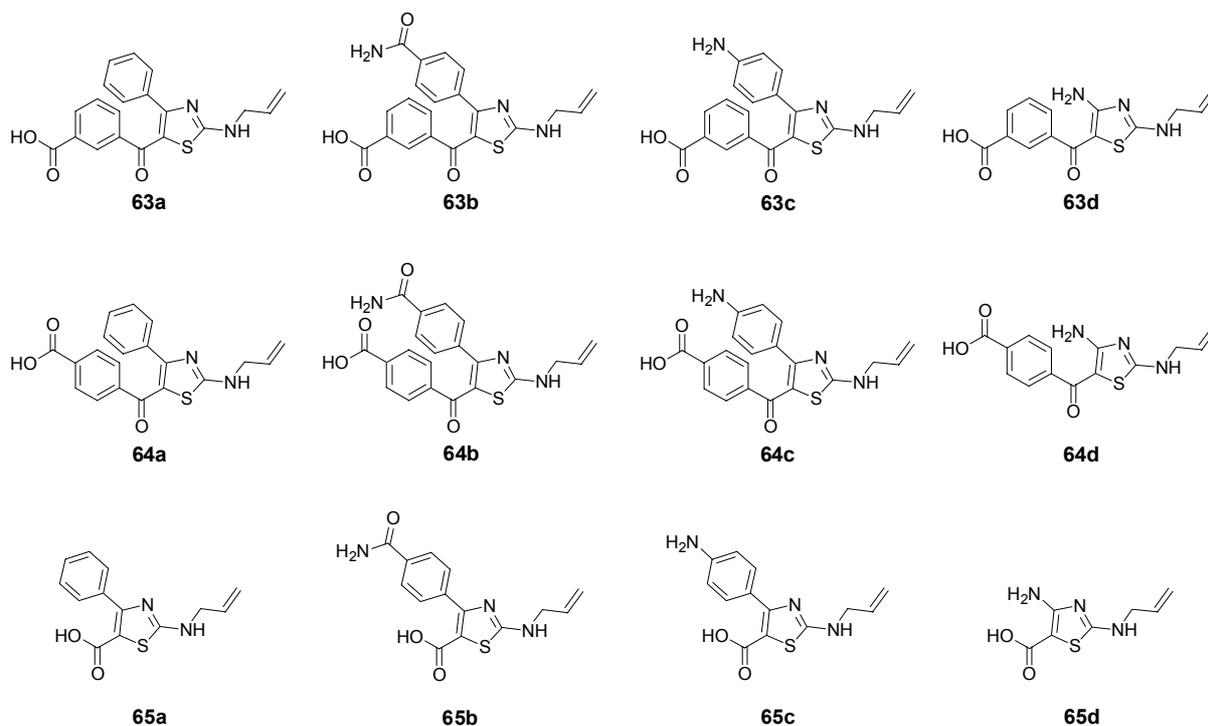


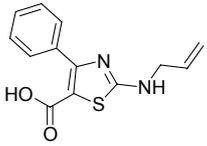
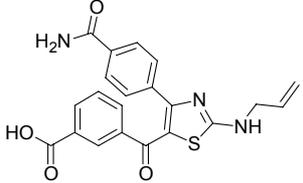
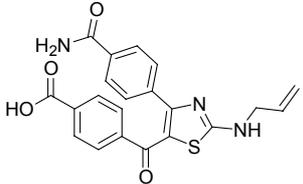
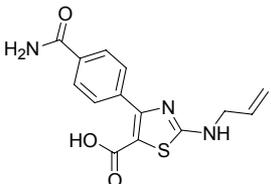
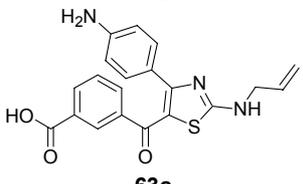
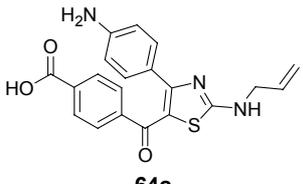
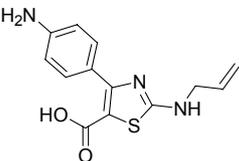
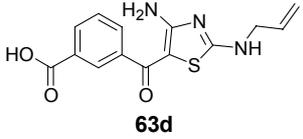
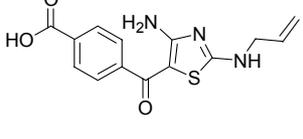
Abb. 8: Strukturen der Aminothiazole, die auf ihre Kinaseinhibition untersucht wurden

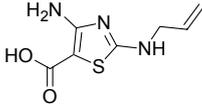
Zu den ausgewählten Rezeptor-Tyrosinkinase zählen die „vascular endothelial growth factor receptors“ 2 und 3 (KDR und flt-4), Tie-2 und der „fibroblast growth factor receptor“ 1 wegen ihrer Rolle in der Tumorangio-genese, der „epidermal growth factor receptor“ 1 (ErbB1) und Her-2/*neu* (ErbB2) sowie der „insulin-like growth factor receptor“ 1 wegen der Rolle, die sie bei Brustkrebs-erkrankungen spielen.

Die meisten Tumoren können nicht über eine gewisse Größe wachsen, wenn sie nicht ihre Nährstoffversorgung durch die Ausbildung neuer Blutgefäße etablieren, die den Tumor mit dem Blutkreislauf des Organismus verbinden (Tumorangio-genese). Da einige Tumore zunächst als kleine avaskuläre Zellhaufen entstehen, die das Einwachsen externer Blutgefäße stimulieren, sollte ein Eingreifen in die Angio-genese, d. h. die Ausbildung neuer Blutgefäße, das Tumorwachstum blockieren oder sogar umkehren. So könnte die Metastasierung ebenfalls wirkungsvoll unterdrückt werden. Die mitgenutzten Blutgefäße ziehen sich in einem Verteidigungsmechanismus zurück, so dass die Tumore nur dann weiterhin wachsen können, wenn eine robuste eigene Blutversorgung gewährleistet ist. Weil das Gewebe des Wirtsorganismus genetisch stabiler ist als Tumorzellen, sollte eine Behandlung, die auf die Endothelzellen des Wirts zielt, eine Krebstherapie ermöglichen, die weniger leicht Resistenzen hervorruft^[121].

Der „vascular endothelial growth factor“ VEGF war der erste Wachstumsfaktor, dessen Spezifität und Bedeutung für die Neubildung von Blutgefäßen bewiesen wurde. Inzwischen gehören zur Familie der vaskulären endothelischen Wachstumsfaktoren fünf Faktoren aus der VEGF Familie, vier aus der Angiopoietin Familie, die vor allem an den Tie-2 Rezeptor binden und mindestens ein Mitglied der großen Ephrin Familie. VEGFR2 und 3 gehören zu den Rezeptoren, die die VEGF Wachstumsfaktoren spezifisch binden. Während VEGFR2 (KDR) den Hauptteil des Wachstums und der Permeabilität der Gefäße reguliert, scheint VEGFR3 zwar auch für die Neubildung von Blutgefäßen verantwortlich zu sein, die Hauptbedeutung liegt aber eindeutig bei der Bildung von lymphatischen Gefäßen, der Lymphangiogenese.^[122] Der Tie2-Rezeptor wurde als Rezeptor für Angiopoietin1 und 2 entdeckt und hat im Gegensatz zu den VEGFR keinen Einfluss auf die Permeabilität der Blutgefäße. Er spielt vielmehr eine regulierende Rolle im Bezug auf die Integration von Endothelzellen und umgebenden Zellen, und somit der Weiterleitung von Signalen aus der Umgebung bis in die Endothelzellen. Eine therapeutische Manipulation der Gefäßneubildung erfordert sehr wahrscheinlich eine gleichzeitige Regulierung von VEGF und Angiopoietin Systemen.^[116]

Neben den VEGF und Angiopoietinen wurden schon früh Hinweise auf die Bedeutung von Fibroblasten Wachstumsfaktoren („fibroblast growth factors“ FGF) für die Bedeutung der Vasculogenese und auch der Angio-genese gefunden. Allerdings ist das Bild hier so komplex, dass die verschiedenen hervorgerufenen Wirkungen nur schwer voneinander unterschieden werden können.^[123] Beispielsweise konnte die Tumorigenese von Melanomzellen durch das

	VEGFR3	Tie2	FGFR1	EGFR	Her-2/ <i>neu</i>	IGF1R
 65a	>100	>100	>100	>100	>100	>100
 63b	>100	>100	>100	>100	>100	>100
 64b	>100	>100	>100	>100	>100	>100
 65b	>100	>100	>100	>100	>100	>100
 63c	13	6	9	9	19	6
 64c	8	2.4	10	5	9	5
 65c	>100	>100	>100	>100	>100	>100
 63d	>100	>100	>100	>100	>100	>100
 64d	27	9	33	25	42	14

	VEGFR3	Tie2	FGFR1	EGFR	Her-2/ neu	IGF1R
 65d	>100	>100	>100	>100	>100	>100

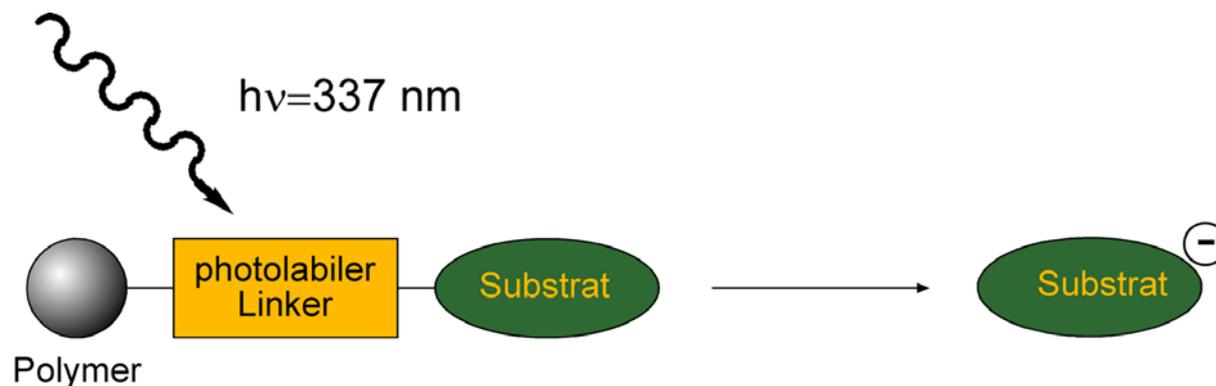
Die von Ralph Mazitschek aus der Gruppe von Prof. Giannis durchgeführten Messungen zeigten bei allen sieben beschriebenen Tyrosinkinase die gleiche Tendenz. Von den zwölf getesteten Strukturen wurden **64c**, **64d** und **63c** als diejenigen herausgefunden, die nach dem ersten Test IC_{50} -Werte unterhalb von $100 \mu\text{M}$ versprochen. Daher wurden sie ausgewählt, um von ihnen IC_{50} -Werte zu bestimmen (s. Anhang). Dabei konnten die Werte für VEGFR2 (KDR) nicht ausgewertet werden, weil die Einzelmessungen zu stark voneinander abwichen.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass alle drei Hitstrukturen einen Substituenten mit Aminogruppe, also einem Wasserstoffbrückendonator, an Position 4 des Thiazolrings aufweisen. Der Phenylring verbessert die Wirkung, ein Anilinsubstituent ist also einer Aminogruppe überlegen. Vielleicht werden durch den Ring beide Wechselwirkungspartner besser zueinander positioniert, so dass die Bindung verstärkt wird. Obwohl die Position der Carboxygruppe offenbar keine große Rolle spielt, scheinen doch die Strukturen mit *para*-Substitutionsmuster denen mit *meta*-Substitution überlegen zu sein. Keine der Allylaminothiazolylsäuren zeigte deutliche Aktivität- die Benzoessäureuntereinheit leistet demnach offenbar einen deutlichen Beitrag zur Bindung.

Die Allylaminothiazole **64c**, **64d** und **63c** mit ihrem Wirkprofil in Bezug auf Angiogenese-Faktoren wie Tie-2, vor allem aber auf den IGF1R können als Leitstrukturen für die Entwicklung von Kinase-Inhibitoren interpretiert werden.

3.2 Direkte massenspektrometrische Reaktionskontrolle organischer Festphasensynthesen – MS-SPOS

3.2.1 Prinzip von MS-SPOS



Schema 9: Zugrundeliegendes Prinzip der massenspektrometrischen Reaktionskontrolle von festphasengebundenen Organischen Synthesen (Mass Spectrometric Monitoring of Solid Phase Organic Synthesis MS-SPOS)

Bei der Entwicklung einer schnellen und einfachen Methode, Reaktionen an fester Phase durch Massenspektrometrie zu überwachen, mussten zunächst geeignete photolabile Linker ausgewählt werden. Um die Anwendbarkeit möglichst breit zu gestalten, sollten die entsprechenden Linkersysteme kommerziell erhältlich sein, so dass eine zeitraubende mehrstufige Synthese der Ankergruppe vermieden werden konnte. Da die handelsüblichen UV-MALDI-Spektrometer mit einem Laser ausgestattet sind, der bei 337 nm emittiert, fiel die Wahl auf zwei kommerziell erhältliche Linkersysteme, zum einen Phenacyllinker **6** und zum anderen *o*-Nitroveratryllinker **5**, die bei 350 nm bzw. bei 365 nm gespalten werden.^[38, 40] Nach einem kurzen Laserpuls sollten dann Carboxylationen freigesetzt werden, die im negativen Modus im TOF Massendetektor nachgewiesen werden können (Schema 9).

Durch die Freisetzung von Carboxylationen wäre zugleich das Problem der Ionisierung gelöst. Während sowohl Siuzdak et al.^[56] als auch Carrasco et al.^[57] im positiven Ionenmodus messen, werden hier direkt die freigesetzten funktionellen Gruppen detektiert. Damit stellen sich an die Struktur des Analyts keine zusätzlichen Anforderungen in Bezug auf ionisierbare Gruppen.

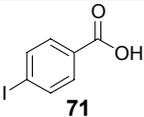
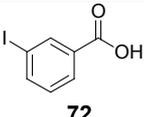
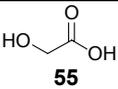
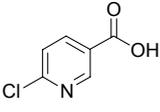
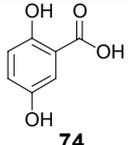
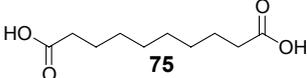
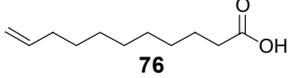
Wie sich im Verlaufe der Untersuchungen ergab, wird darüber hinaus bei der Abspaltung so viel Energie auf die Säure übertragen, dass sie direkt in die Gasphase übertritt. Damit wird keine Matrix mehr benötigt. Das ist ein entscheidender Vorteil beim Nachweis von kleinen Molekülen, da die Massenspektren im niedermolekularen Bereich nicht zusätzlich durch Matrixpeaks gestört werden. Gerade in der Wirkstoffentwicklung sollten ja die

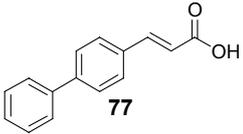
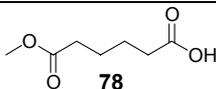
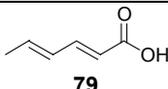
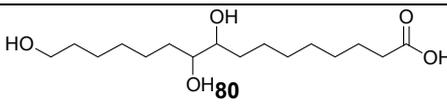
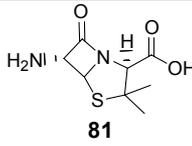
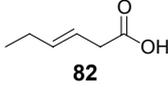
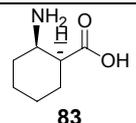
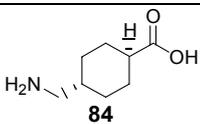
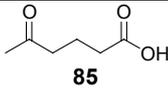
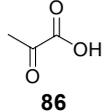
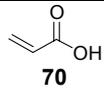
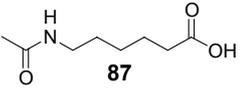
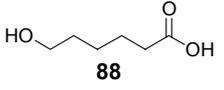
Molekulargewichte einzelner Verbindungen unter 500 liegen (Rule of 5)^[127] und damit im Bereich, der durch Matrixpeaks gestört wird. Im Rahmen der Untersuchungen wird eine untere Nachweisgrenze durch die harzeigenen Signale gesetzt, die im Bereich <120 recht große Intensitäten erreichen. In bestimmten Fällen, wie z. B. Acrylsäure (**70**) kann trotz eines m/z-Verhältnisses von 71 der Peak erkannt werden, generell aber liegt die Grenze bei einem m/z-Verhältnis von ca. 120.

3.2.2 Möglichkeiten und Beschränkungen

Um mehr Informationen über die Tragfähigkeit und die Begrenzungen der Methode zu erhalten, wurden eine Reihe verschiedener Säuren an das Harz gebunden und massenspektrometrisch untersucht (Tabelle 2).

Tabelle 2: Strukturen, die massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnten. „+“ steht für Nachweisbarkeit, „-“ für die Nicht-Nachweisbarkeit. „n.b.“- Diese Kombination aus Substrat und Linker wurde nicht untersucht.

Struktur	MW	Linker 6	Linker 5
 71	248.02	+	+
 72	248.02	+	n. b.
 55	76.05	+	-
 73	157.55	+	+
 74	154.12	+	+
 75	202.25	+	n. b.
 76	184.28	+	-

 77	224.25	+	-
 78	160.17	+	-
 79	112.13	-	+ (Dimer/Tetramer)
 80	304.42	+	-
 81	216.26	+	n. b.
 82	114.14	+	n. b.
 83	143.18	+	n. b.
 84	157.21	+	n. b.
 85	130.14	+	+
 86	88.06	+	n. b.
 70	72.06	+	n. b.
 87	173.21	+	n. b.
 88	132.16	+	n. b.

Die Methode sollte ausdrücklich auf wirkliche synthetische Probleme anwendbar sein. Da im Rahmen der Entwicklung von Synthesestrategien zum Aufbau von Ras-Desaktivatoren von 3- bzw. 4-Iodobenzoesäure (**71** und **72**) ausgegangen wurde, richteten sich die ersten Untersuchungen auf diese Strukturen. Nachdem der Nachweis hierfür gelungen war, wurden

zunächst andere aromatische Säuren getestet. So konnten 6-Chlornicotinsäure (**73**) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (**74**), eine in der MALDI-Spektrometrie gebräuchliche Matrix, problemlos nachgewiesen werden. Auch die Molekülsignale von hydroxyfunktionalisierten aliphatischen Strukturen, wie **55**, **80** und **88**, waren gut im Massenspektrum sichtbar. Ungesättigte aliphatische Säuren wie z. B. 10-Undecensäure (**76**) und *trans*-3-Hexensäure (**82**) oder Acrylsäure (**70**) zeigten ebenso deutliche $[M-H]^-$ Signale im Massenspektrum. Bemerkenswert ist, dass die Molekülmasse von *trans,trans*-2,4-Hexadiensäure (**79**) nur detektiert werden konnte, wenn es an *o*-Nitroveratryl-funktionalisiertes PS-Harz **5** gebunden vorlag, und auch dann nur als Dimer $[2M-H]^-$ bzw. Tetramer $[4M-H]^-$. Allgemein zeigte sich jedoch, dass der Phenacyllinker **6** eine breitere Anwendbarkeit gewährleistet. Von allen getesteten Säuren war **79** die einzige, die nur vom *o*-Nitroveratryl-Linker **5**, nicht aber vom Phenacyllinker **6** im MALDI-Spektrometer abspaltbar bzw. anschließend detektierbar war.

Weiterhin wurden die Massensignale von Dicarbonsäuren (Sebacinsäure **75** und Adipinsäuremonomethylester **79**) detektiert. Aliphatische aminofunktionalisierte Säuren, wie **83** und **84**, und auch acetylgeschützte Aminogruppen, wie in **87**, zeigten Signale im Massenspektrum, ebenso wie die komplexe β -Lactam Struktur **81**. Bei allen Substraten mit freien Aminogruppen konnte die Signalintensität durch Behandlung mit 1% Ammoniumhydroxid in Wasser deutlich verbessert werden. Die Base verschiebt vermutlich das Protonierungsgleichgewicht und vermindert so die Ausbildung von Zwitterionen. Auch die aliphatischen Ketone **85** und **86** konnten nachgewiesen werden.

Hingegen zeigte sich, dass Benzophenonderivate, wie z. B. **91**, also aromatische Ketone, nicht nachgewiesen werden konnten (Abb. 9). Das traf auch auf das Reaktionsprodukt aus der sequenziellen Reaktion von Iodbenzoesäure mit *iso*-Propylmagnesiumbromid, anschließender Transmetallierung und Acylierung mit 3,4-Dinitrobenzoylchlorid zu. Ebenso konnten die $[M-H]^-$ Peaks einiger weiterer aromatischer Carbonsäuren wie 3,4-Diaminobenzoesäure (**89**) und 4-Chloro-3-nitrobenzoesäure (**90**) nicht detektiert werden.

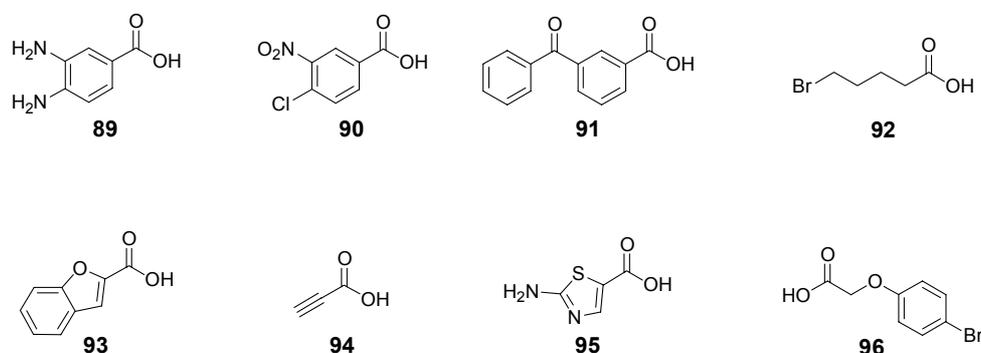
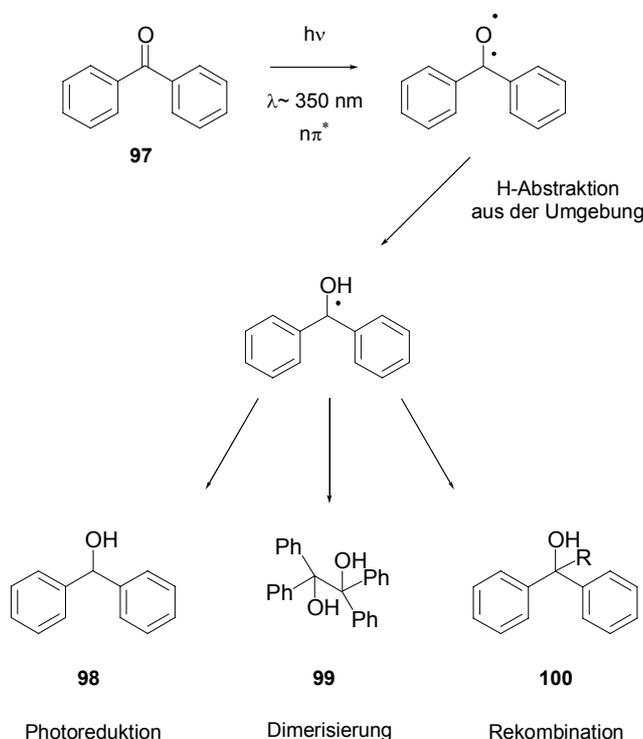


Abb. 9: Strukturen, die nicht nachgewiesen werden konnten.

Dabei schien vor allem die Absorption des gebundenen Substrates bei 337 nm eine wesentliche Rolle zu spielen. Zur Überprüfung wurden die UV/VIS- Absorptionsspektren der ungebundenen Carbonsäuren in Ethanol gemessen. Hier zeigte sich, dass alle Carbonsäuren, deren Massenpeak nicht detektierbar war, lokale Absorptionsmaxima in diesem Bereich aufwiesen. Allerdings hatten auch Substanzen, die nachweisbar waren, lokale Absorptionsmaxima im Bereich von $\lambda = 340$ nm. Die Lage der Absorptionmaxima hat also nur zum Teil Einfluss auf die Detektierbarkeit im Massenspektrometer und lässt noch keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Detektierbarkeit zu.

Die Photoreaktivität von Benzophenon (**97**) wurde schon Anfang des letzten Jahrhunderts eingehend untersucht.^[128] Durch Anregung bei Wellenlängen von ca. 350 nm wird ein Elektron aus den freien Elektronenpaaren des Carbonylsauerstoffs in das antibindende π -Orbital der Carbonylbindung gehoben (Schema 27). Diesem $n\pi^*$ -Übergang folgt ein relativ rasches „Intersystem Crossing“ ISC zum entsprechenden Triplettzustand. Das angeregte Molekül könnte man als Triplett-Biradikal bezeichnen, das mit einer Quantenausbeute von nahezu 1 entsteht. Dieses Triplett ist recht langlebig, so dass weitere Reaktionen aus diesem Anregungszustand folgen können. Zunächst abstrahiert der Carbonylsauerstoff üblicherweise rasch ein Wasserstoffatom aus der Umgebung, hier z. B. aus dem Polymergerüst. Es wurde nachgewiesen, dass das so entstandene Hydroxydibenzylradikal mehrheitlich über drei verschiedene Wege abreagiert (Schema 27 und Abb. 10).



Schema 27: Photoreaktivität von Benzophenon (**97**)

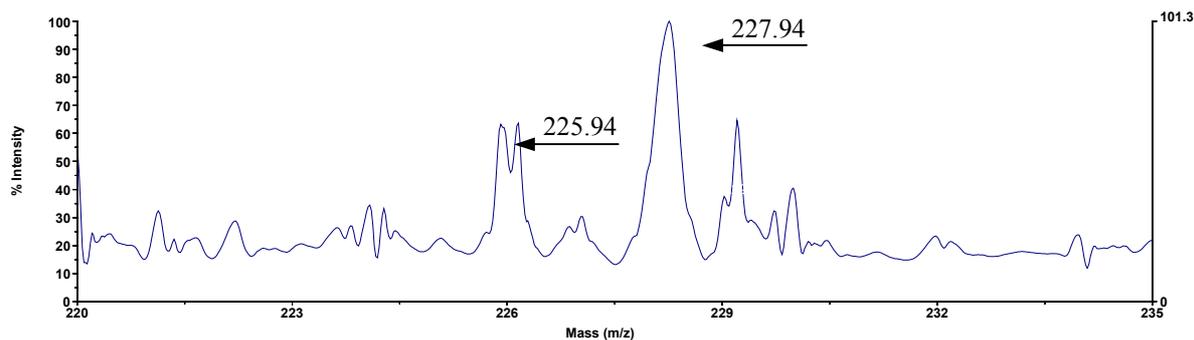


Abb. 10: Massenspektrum von 3-Benzoylbenzoesäure (**91**) mit schwachen $[M-H]^- = 225.94$ und $[M+2H-H]^- = 227.94$ Signalen (Monomer und Photoreduktionsprodukt analog zu **98**)

Zum einen kann es ein weiteres Wasserstoffatom abstrahieren, dabei entsteht das Photoreduktionsprodukt. Zum anderen kann es mit einem weiteren Hydroxydibenzylradikal zum Dimer weiterreagieren. Außerdem könnte es mit einem Radikal im Polymergerüst rekombinieren. Die Eigenschaft, in guter Ausbeute in die CH-Bindungen eines peptidischen Backbones zu insertieren, wird im Photoaffinitätslabeling ausgenutzt.^[129] Im Massenspektrum von 3-Benzoylbenzoesäure (**91**) ist ein sehr schwaches Signal bei 227.94 $[M+2H-H]^-$ zu sehen (Abb. 10). Es könnte vom Photoreduktionsprodukt 3-(Hydroxyphenylmethyl)benzoesäure stammen und damit Beleg für diese Hypothese sein. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Radikale dimerisieren, ist aufgrund der hohen „Verdünnung“ durch das Harz und die geringe Menge an freigesetztem Material sehr niedrig (etwa 10^{-15} mol reichen aus, um im Massendetektor nachgewiesen werden zu können^[130]).

Ebenso bekannt und äußerst vielfältig ist die Photoreaktivität von Nitrogruppen, wie sie auch im *o*-Nitroveratrylsystem ausgenutzt wird. Ausser der Norrish Typ II-Reaktion sind beispielsweise auch Typ I-Reaktionen bekannt, in denen die Nitrogruppe homolytisch vom Kohlenstoffgerüst gespalten wird.^[128]

Bei der Anknüpfung von Fmoc-geschützten Aminosäuren stellte sich heraus, dass geschützte Aminosäuren nicht detektiert werden konnten. Diese Beobachtung wurde auch von Siuzdak und Mitarbeitern gemacht^[56], die sie darauf zurückführten, dass keine Protonierungsstellen vorhanden waren, um das Molekül zu ionisieren. Allerdings werden in dieser Methode negative Ionen detektiert, daher spielt das Vorhandensein von Protonierungsstellen keine Rolle. Trotzdem können Fmoc-geschützte Aminosäuren nicht nachgewiesen werden. Mangelnde Ionisierung spielt also wahrscheinlich nur zum Teil eine Rolle.

Die Laserintensitäten liegen deutlich höher als üblich in der MALDI-TOF Spektrometrie (ca. 2800 bis 3000 Einheiten). Das birgt die Gefahr von Bindungsbrüchen durch überschüssige Energie. In der Tat scheint beispielsweise 5-Bromvaleriansäure (**92**) zu fragmentieren. Ein $[M-H]^-$ Peak kann nicht gefunden werden. Allerdings deuten zwei etwa gleich große Signale

bei $m/z = 79.7$ und 81.7 auf Bromidionen hin, die im Isotopenverhältnis von 100:98 vorkommen (Abb. 10).

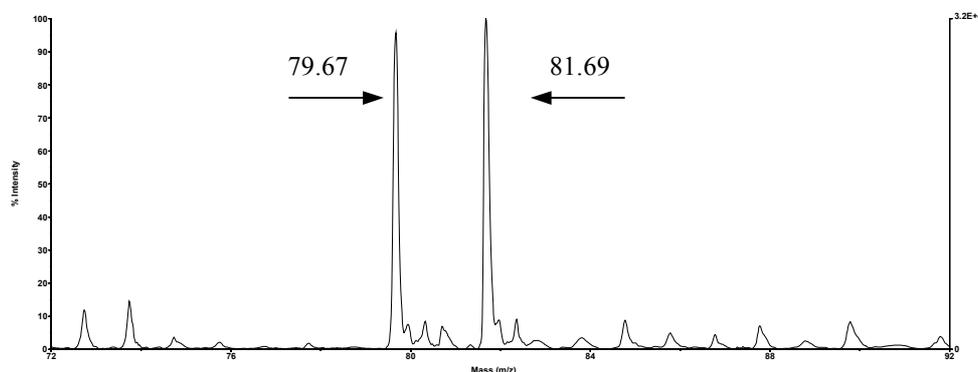


Abb. 10: Massenspektrum von 5-Bromvaleriansäure (**92**) an Phenacyl-PS-Harz

Heterozyklen wie 2-Benzofurancarbonsäure (**93**) oder 2-Aminothiazol-5-carbonsäure (**94**) zeigen eine Vielzahl an verschiedenen Photoreaktionen, z. B. kommt es relativ häufig zum homolytischen Bindungsbruch zwischen einem Heteroatom (z. B. Schwefel) und dem benachbarten Kohlenstoffatom.^[128] Das so entstandene Biradikal kann auf sehr unterschiedliche Weise weiterreagieren.

Im Falle von Propiolsäure (**94**) scheint das recht geringe m/z -Verhältnis von 69.0 Grund dafür zu sein, dass es nicht mehr eindeutig im Massenspektrum zu erkennen ist. Das Hintergrundrauschen von harzeigenen Massenpeaks ist so stark, dass nur in Ausnahmefällen Molekulargewichte von unter 120 nachgewiesen werden können.

Insgesamt liegen die detektierten Massen leicht über den erwarteten m/z -Verhältnissen. Da der TOF-Detektor die Zeit misst, die ein Ion für die Wegstrecke zum Detektor braucht, hat der Durchmesser der Polymerkügelchen (100- 200 mesh) einen Einfluss auf die gefundene Masse. Das m/z -Verhältnis wird über folgende Formel errechnet.

$$t = s \cdot \left(\frac{m}{(2KE) \cdot z} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{oder} \quad \frac{m}{z} = 2KE \frac{t^2}{s^2}$$

Dabei sind s die Wegstrecke zum Detektor und KE die kinetische Energie der Ionen. Da der Abstand von der Trägerplatte zum Detektor und die Beschleunigungs-Spannung konstant sind, kann über t das m/z -Verhältnis bestimmt werden. Ist s jedoch kürzer als durch Geräte-Parameter festgelegt, wird das gefundene m/z -Verhältnis über dem tatsächlichen Wert liegen.

Die verzögerte Extraktion kann diese Unterschiede nur zum Teil nivellieren, so dass es zu leichten Ungenauigkeiten kommt. Die gefundenen Massen weichen von den erwarteten jedoch nicht so stark ab, dass eine Umsetzung nicht mehr beobachtet werden könnte. Sogar

eine Massendifferenz von $\Delta M=2$ konnte bei der Oxidation von 6-Hydroxyhexansäure **101** zu 6-Oxohexansäure **102** eindeutig nachgewiesen werden (s. Schema 31).

Eine Kalibration mit Hilfe von zugefügter Matrix (DHB) gelang nicht, wahrscheinlich weil die Carboxylationen protoniert wurden. Der Versuch, 2,5-Dihydroxybenzoesäure **74** an Linker **5** oder **6** mit der Probe zu vermischen und anschließend zu kalibrieren, verlief unbefriedigend, da **74** teilweise deutlich intensivere Signale als der Analyt liefert, so dass das Produktsignal unterdrückt wird. Überdies wurden auch nach der Kalibrierung Ungenauigkeiten festgestellt, da sowohl Analyt als auch die Kalibriermischung nicht immer aus einer Ebene, sondern auf unterschiedlichen Ebenen abgelöst werden, so dass der Weg zum Detektor nicht einheitlich ist.

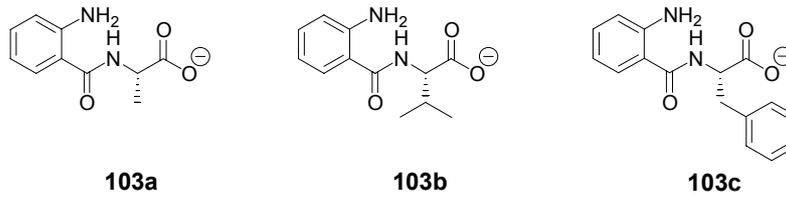
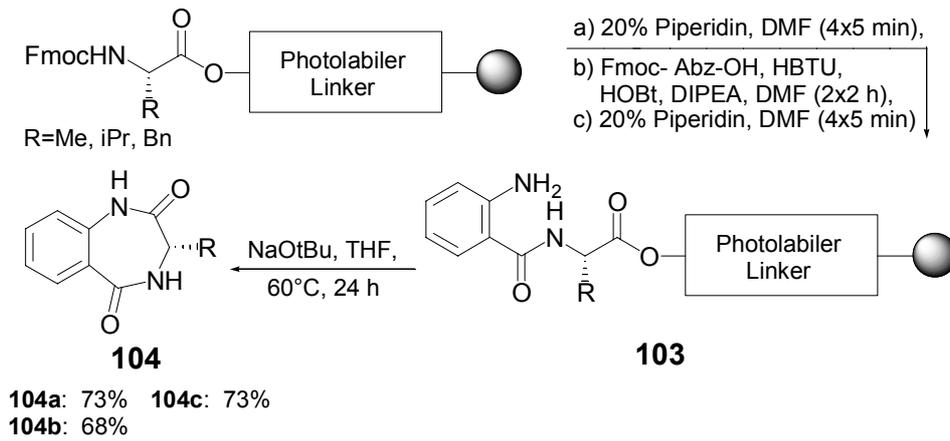
Aus diesen Untersuchungen ergeben sich folgende Erkenntnisse über die Limitierungen dieser Methode: Die massenspektrometrische Reaktionskontrolle von Festphasenreaktionen ist geeignet für Moleküle, die bei Einstrahlung mit einer Wellenlänge $\lambda=337$ nm keine photochemischen Reaktionen eingehen. Darüber hinaus gibt es nur noch die Limitierung durch das Massen-Ladungsverhältnis m/z , das über 120 liegen sollte. In Einzelfällen sind wie erwähnt jedoch auch Massenpeaks von bis zu 71.1 ($[M-H]^-$ von Acrylsäure (**70**)) nachweisbar.

3.2.3 Reaktionskontrolle durch MS-SPOS

1,4-Benzodiazepin-2,5-dione

Das Prinzip der Reaktionskontrolle von Festphasenreaktionen wurde anschließend an einer Reihe verschiedener Verbindungs- und Reaktionsklassen demonstriert. Die Gruppe der Benzodiazepine stellt eine Klasse privilegierter Strukturen dar, weil sie Aktivitäten gegen eine große Bandbreite biologischer Targets vorweisen.^[131] Daher wurden in letzter Zeit verschiedene Synthesestrategien sowohl in Lösung als auch an der festen Phase entwickelt.^[132-137] Um die Leistungsfähigkeit der MS-SPOS-Methode zu demonstrieren, wurde die Syntheseroute von Mayer et al. gewählt.^[138]

Dafür wurde sowohl *o*-Nitroveratryl PS Harz **5** als auch bromiertes Phenacylharz **6** mit Fmoc-Alanin, Fmoc-Valin und Fmoc-Phenylalanin beladen. Die anfängliche Beladung wurde mittels der Fmoc-Methode^[98] ermittelt. Für Linker **5** waren Doppelkupplungen notwendig, um einen zufriedenstellenden Beladungsgrad zu erreichen. Nach Entschützung wurde nun mit Standard-Peptidkupplungsmethoden (HBTU, HOBt) Fmoc-Anthranilsäure angeknüpft (Schema 28). Für beide Linkersysteme waren hier Doppelkupplungen notwendig, um ausreichende Beladungsgrade zu erreichen. Dieser Umstand findet seine Ursache wohl im großen sterischen Anspruch des Acyldonors.



Schema 28: Synthese von 1,4-Benzodiazepin-2,5-dionen **104 a-c** und Struktur der Vorläufer **103a-c**, die im Massenspektrometer nachgewiesen werden konnten

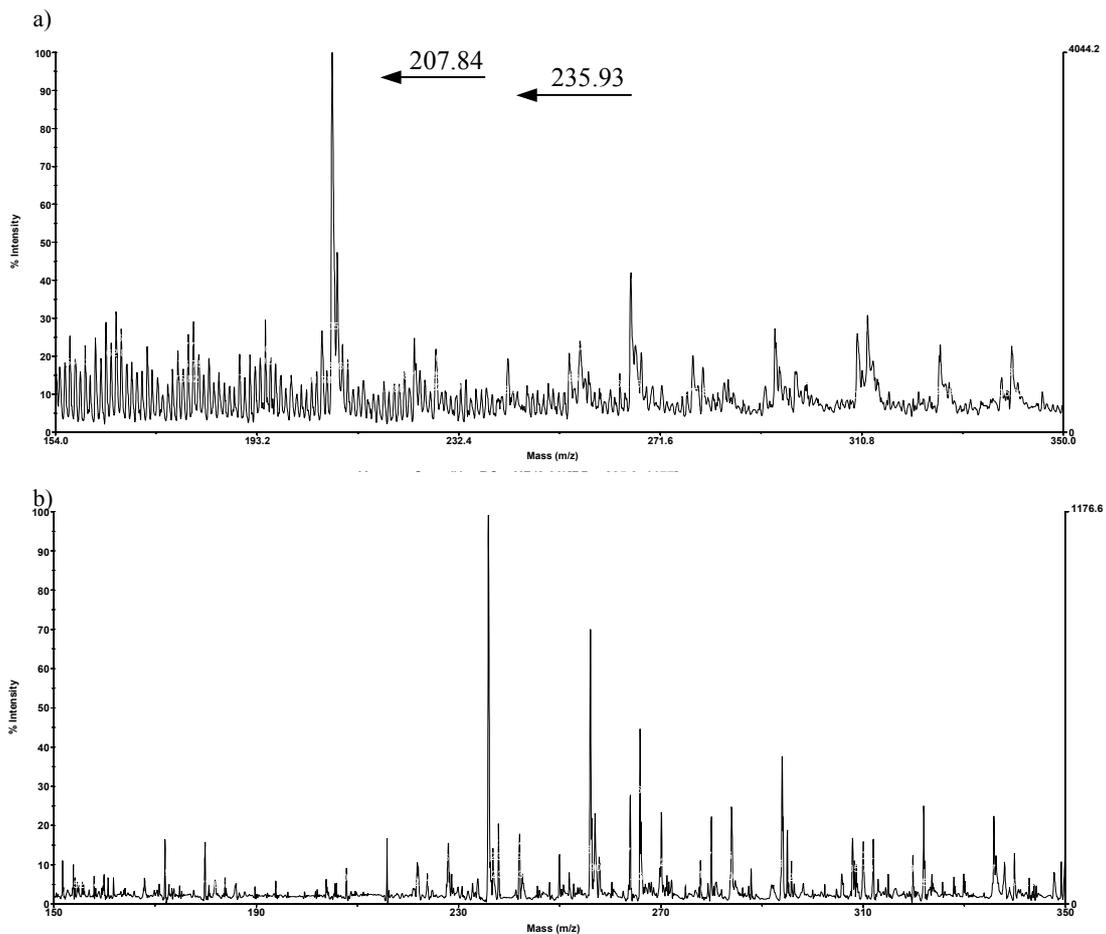


Abb. 11: a) Massenspektrum von **103a** an *o*-Nitroveratryl PS Harz; b) Massenspektrum von **103b** an *o*-Nitroveratryl PS Harz (Signale bei 256, 266 und 284 stammen von Verunreinigungen mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure auf der MALDI-Trägerplatte)

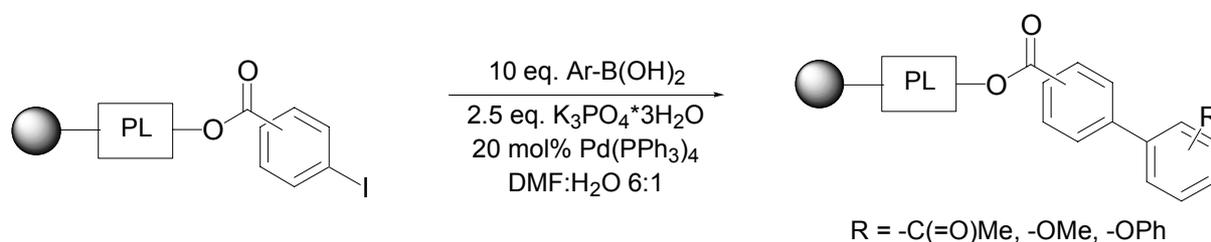
Nach Entschützung konnten die Vorläuferstrukturen für die Benzodiazepinsynthese massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Abb. 11). Die zyklischen Analoga wurden im Massenspektrometer nicht beobachtet. Die Strukturen wurden mit Natrium-*tert*-butanolat in THF bei 60 °C zyklisiert und gleichzeitig abgespalten.

Während bei der Nachweisbarkeit der Vorläuferstrukturen kein Unterschied zwischen beiden Linkersystemen festzustellen war, fielen die Ausbeuten für die Kupplung von Fmoc-Anthranilsäure wie auch für die Zyklisierung am Phenacyllinker **1** deutlich geringer aus. Auch hier liegt die Ursache wahrscheinlich im sterischen Anspruch des Phenacyllinkers. Für die Synthese am *o*-Nitroveratryllinker waren die Ausbeuten im wesentlichen vergleichbar mit denen von Mayer.^[138]

Biphenyle

Ein wichtiger Bestandteil des organischen Syntheserepertoires sind die verschiedenen Möglichkeiten zur CC-Bindungsknüpfung. Palladium-vermittelte Kreuzkupplungsreaktionen stellen daher eine sehr wichtige Erweiterung der Möglichkeiten zur CC-Verknüpfung dar. Da die Biphenyleinheit als privilegierte Struktur in der Entwicklung von niedermolekularen Proteinliganden identifiziert wurde^[79-81], fiel die Wahl auf die Suzuki-Kupplung als Repräsentant dieser Gruppe von Reaktionen.

Bei der Suzuki-CC-Verknüpfung reagiert ein halogenierter Aromat mit einer meist ebenfalls aromatischen Boronsäure. Jüngste Methodenentwicklungen haben diese Reaktion in Lösung auf Olefine und zum Teil sogar auf sp^3 -hybridisierte Reaktionszentren ausgedehnt. Für diese Untersuchungen wurde der Fokus auf Reaktionen von 3- und 4-Iodbenzoesäure mit aromatischen Boronsäuren gelegt. Dabei wurden Reaktionsbedingungen angewendet, die zuvor in unserer Gruppe entwickelt worden waren.^[82, 83] Das Harz wurde mit dem zehnfachen Überschuss an Boronsäure, 2.5 eq Trikaliumphosphat Hydrat und 20 mol% Tetrakis(triphenylphosphin)-Palladium in DMF:H₂O 6:1 bei 80 °C umgesetzt.

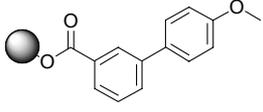
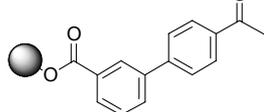
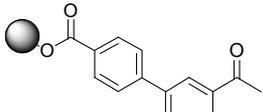
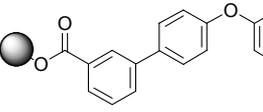
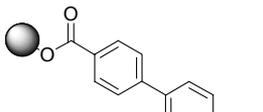
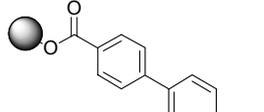
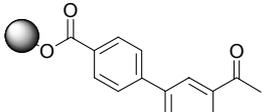
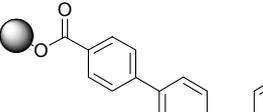


Schema 29: Suzuki Kreuzkupplungsreaktion von Iodbenzoesäure, mit Arylboronsäuren

Die Pd-vermittelten Kreuzkupplungsreaktionen wurden sowohl an Linker **5** wie auch an Linker **6** durchgeführt. Allerdings ließ sich nur der Phenacyllinker **6** im MALDI wie auch präparativ (sei es photolytisch oder chemisch) wieder spalten. Es ist denkbar, dass der

o-Nitroveratryllinker **5** selbst mit Palladium reagiert^[139] und daher anschließend nicht mehr photolytisch spaltbar ist.

Tabelle 3: Biaryl-Strukturen, die an Linker **6** aufgebaut wurden

Struktur	MW	Struktur	MW
 105a	228.24	 105b	240.25
 105c	240.25	 105d	290.31
 106a	228.24	 106b	240.25
 106c	240.25	 106d	290.31

Nach Aufarbeitung wurde das Harz im MALDI-TOF Massenspektrometer untersucht. Anschließend wurden die Biarylprodukte zum Teil photolytisch und zum Teil nukleophil abgespalten, um die Reaktionsprodukte eingehender zu analysieren. Die Ausbeuten bei der photolytischen Abspaltung konnten dabei wesentlich verbessert werden, wenn das Lösungsmittel (THF mit 1% Ethanolamin) zuvor mit Argon am Ultraschallbad entgast wurde. Vermutlich ist dies auf die unterdrückte Bildung von reaktivem Singulett-Sauerstoff durch Lichteinstrahlung zurückzuführen.

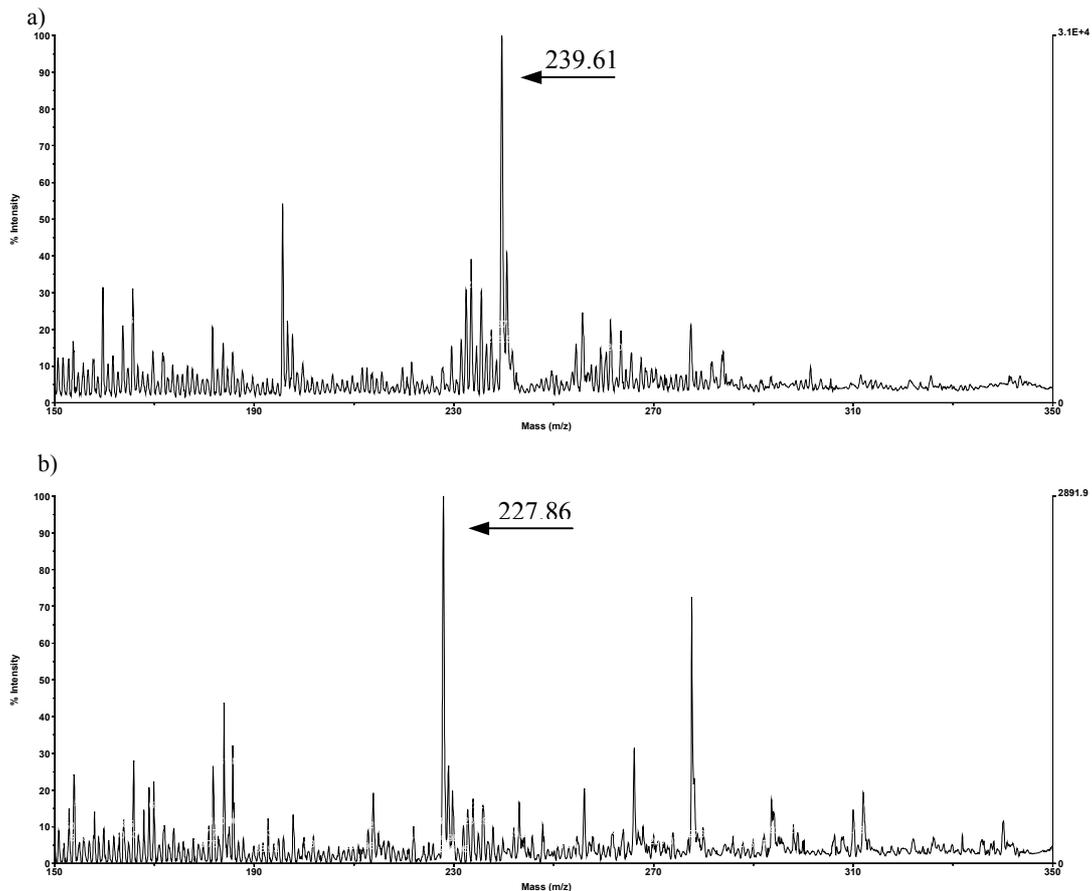


Abb. 12: a) Massenspektrum von **106c** an Phenacyl PS Harz; b) Massenspektrum von **105a** an Phenacyl PS Harz.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Acetophenon-Derivate **105b** und **c** sowie **106b** und **c** durchaus detektierbar sind, obwohl sie aromatische Ketone sind und damit ähnliche Reaktivitäten aufweisen sollten wie Benzophenon. Wahrscheinlich ist in diesem Fall die Überlappung des Absorptionsmaximums λ_{\max} mit der Emissionwellenlänge von $\lambda = 337$ nm nicht ausreichend, um das Molekül anzuregen.

Ebenso unproblematisch ist die Detektion von Biphenylcarbonsäuren mit Methoxy-substituenten zu den Biarylstrukturen **105a** und **106a**. Die Reaktionsprodukte **105d** und **106d** der Umsetzung von Iodbenzoesäure mit 4-Phenoxyphenylboronsäure hingegen ist nicht im MALDI zu erkennen, nach photolytischer Abspaltung jedoch ist der $[M-H]^-$ Produktpeak eindeutig im LCMS nachweisbar. Wahrscheinlich bewirkt die Laserintensität, die nötig ist, um den Linker zu spalten, eine Fragmentierung des Produkts.

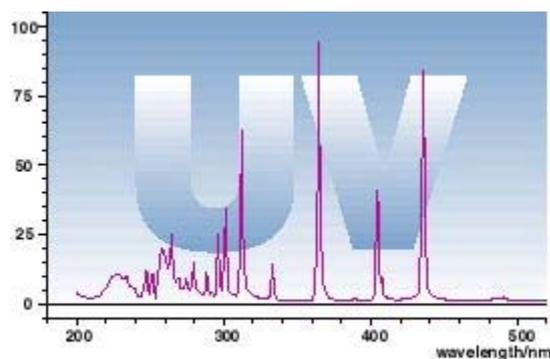


Abb. 13: Emissionsspektrum einer Quecksilberdampfampe (Quelle: www.primarc.com)

Die Photolyse der Linker erfolgt in einem Photoreaktor aus Borosilikat-Glas mit einer Quecksilberdampfampe. Quecksilberdampflampen weisen drei Emissionsmaxima auf (s. Abb. 13). Dabei durchdringen jedoch nur Wellenlängen oberhalb von ca. 290-300 nm das Borosilikatglas, so dass kein Filter verwendet werden muss. Die Abspaltungen wurden in 1% Ethanolamin in Tetrahydrofuran durchgeführt, das zuvor mit Argon am Ultraschallbad entgast wurde. Die Photolyse von Phenacyllinker **6** erfolgte über Nacht. Die zur Trockene eingedampfte Abspalllösung zeigt Verunreinigungen durch Ethanolamin und Salze, die jedoch problemlos durch eine Vorreinigung mit Sepac-Kartuschen abgetrennt werden können. In keinem Fall können in der LCMS-Analyse Massensignale (z. B. Iodbenzoesäure oder Benzoesäure) detektiert werden, die zuvor nicht direkt am Harz detektiert wurden.

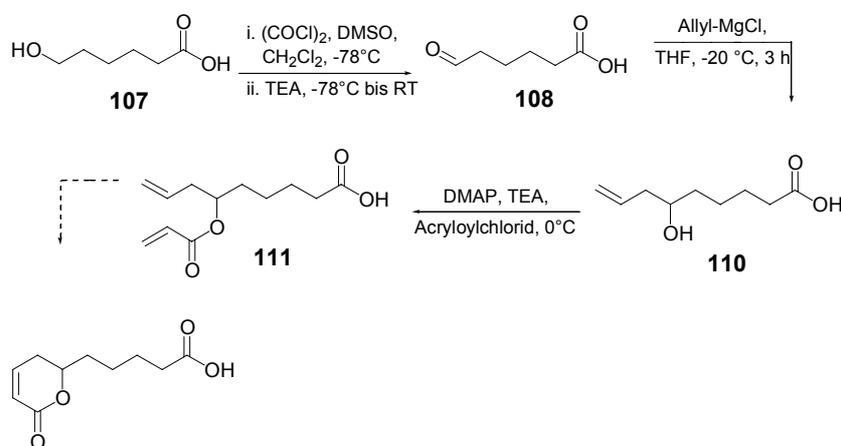
Alternativ wurde Phenacyllinker **6** auch durch Behandlung mit 5% Hydrazin-Hydrat in Dimethylformamid nukleophil gespalten. Dabei greift das Hydrazin die Estergruppe an, über die das Substrat an das Harz gebunden ist, und spaltet so das Produkt als Hydrazid ab. Diese chemische Spaltung des Linkers erlaubt eine von der Photolyse unabhängige Untersuchung der Reaktionsprodukte und somit die genauere Charakterisierung der festphasengebundenen Verbindung. Damit ist es möglich festzustellen, ob die Reaktion selbst oder aber die photolytische Abspaltung und folgende Detektion im Massenspektrometer die Ursache der Probleme sind.

Insgesamt zeigt der Phenacyllinker **6** eine größere Anwendungsbreite, d. h. eine bessere Kompatibilität mit verschiedenen Reaktionsbedingungen als der *o*-Nitroveratryllinker **5**. Insbesondere die Nitrogruppe im System **5** schränkt die Anzahl an Reaktionen ein, die am Linker durchgeführt werden können. Der Phenacyllinker hingegen sollte vor allem stark reduktiven Bedingungen, die die Acylgruppe reduzieren, und nukleophilen Reagenzien (Hydrazin etc.) gegenüber empfindlich sein. In bestimmten Fällen, wie beispielsweise der Benzodiazepinsynthese, kann hingegen der *o*-Nitroveratryllinker dem Phenacyllinker überlegen sein.

Vorläufer zur Ringschlussmetathese

In den letzten Jahren hat sich die Olefinmetathese zu einer äußerst leistungsfähigen Synthesemethode entwickelt, die schon breite Anwendung in der Naturstoffsynthese gefunden hat.^[140] Auch an der festen Phase stellt vor allem die Ringschlussmetathese häufig einen Schlüsselschritt in der Reaktionsfolge zur Herstellung der Zielmoleküle dar.^[7] Zur weiteren Untersuchung der Anwendbarkeit der massenspektrometrischen Reaktionskontrolle MS-SPOS an fester Phase sollte nun eine Olefin-Metathesereaktion überwacht werden. Zu diesem Zweck wurde der Vorläufer parallel in Lösung und an der festen Phase aufgebaut.

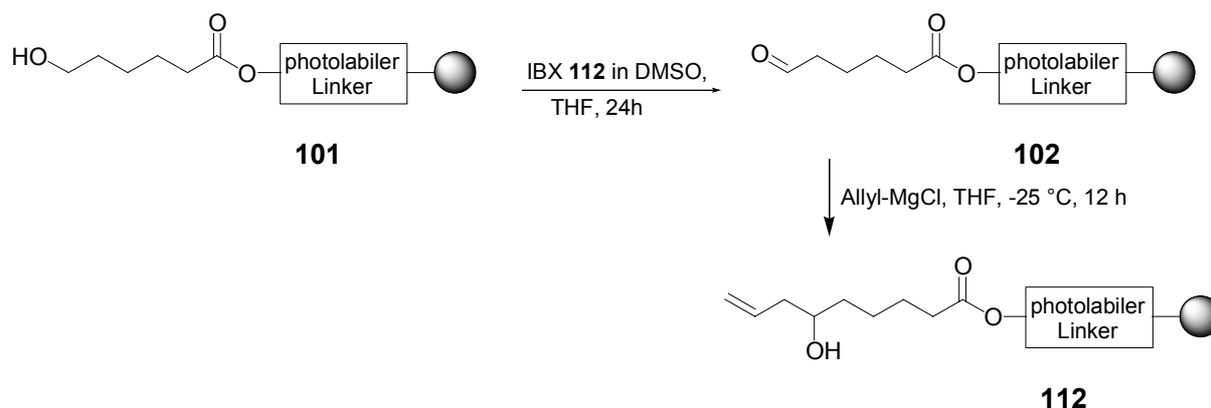
In Lösung wurde zunächst 6-Hydroxycapronsäure (**107**) in einer Swern-Oxidation zur entsprechenden 6-Oxocapronsäure (**108**) oxidiert. In einem Testansatz wurde auch IBX **109** verwendet, allerdings konnte eine Verunreinigung durch Iodosobenzoesäure nicht ohne weiteres entfernt werden. Das aus der Swern-Oxidation erhaltene Reaktionsprodukt **108** wurde in einem Milliliter Wasser pro Milligramm erwarteten Aldehyds aufgenommen und gefriergetrocknet, um das überschüssige Dimethylsulfoxid weitgehend zu entfernen. Die Trocknung wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Anschließend wurde ohne weitere Aufreinigung eine Grignard-Reaktion mit 6-Oxohexansäure (**108**) und zwei Äquivalenten Allylmagnesiumchlorid bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Tetrahydrofuran durchgeführt. Das Carboxylat-Anion bildet ein dynamisches Zwei-Phasen-System, so dass die Reaktion abläuft, obwohl das gebildete Salz aus der Lösung ausfällt. Dabei führen tiefere Temperaturen zu schlechteren Ausbeuten, wahrscheinlich aufgrund einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Niederschlag und Lösung des Carboxylats. Höhere Temperaturen hingegen führen zu einer schlechteren Unterscheidung zwischen Aldehyd und Carbonsäure, es kommt zu Produktgemischen. Das Produkt kann in 46% Ausbeute nach Aufreinigung durch Flashchromatographie isoliert werden.



Schema 30: Syntheseweg von 6-Hydroxy-8-nonenecarbonsäure (**110**) in Lösung

Um ein Vorläuferprodukt für die Ringschlussmetathese und somit einen Zugang zu α,β -ungesättigten Lactonen zu haben, wurde nun 6-Hydroxy-non-8-encarbonsäure (**110**) mit Acrylsäurechlorid in Anwesenheit von Triethylamin und DMAP verestert. Nach Aufreinigung durch Flashchromatographie wird das Produkt in 49% Ausbeute erhalten. Das Produkt weist allerdings eine inhärente Labilität auf, die es schwierig macht, Massenspektren des intakten Moleküls zu erhalten. Weder im MALDI- noch im FAB-Massenspektrometer war dies möglich, es konnten lediglich signifikante Fragmentpeaks zugeordnet werden. Auch im EI-Spektrum kann kein Molekülsignal beobachtet werden. Lediglich Electron-Spray-Ionisierung liefert ein Massenspektrum des intakten Moleküls. Diese Tatsache deutet auf Schwierigkeiten hin, den festphasengebundenen Vorläufer der Ringschluss-Metathese im MALDI-TOF Spektrometer zu detektieren.

An der Festphase wurde zunächst 6-Hydroxycapronsäure **101** über den Bromphenacyllinker **6** an Polystyrolharz gebunden. Das Ausgangsprodukt für die Reaktionssequenz konnte im MALDI-Massenspektrometer vom Harz abgespalten und nachgewiesen werden. Anschließend wurde **101** mit dem hypervalenten Iodreagenz IBX^[141, 142] **109** in einem Gemisch aus Dimethylsulfoxid und THF zu 6-Oxocapronsäure **102** oxidiert. Das Reaktionsprodukt konnte ebenfalls an fester Phase nachgewiesen werden. Darauf wurde es mit Allylmagnesiumchlorid zu 6-Hydroxy-8-nonencarbonsäure **112** umgesetzt. Auch in diesem Fall konnte der entsprechende $[M-H]^-$ Peak detektiert werden. Die Reaktionssequenz wurde nur am Phenacyllinker **6** vollzogen, weil es sehr wahrscheinlich zu Nebenreaktionen zwischen Grignardreagenzien und Nitrogruppen kommen würde.^[86, 143, 144] Natürlich weist auch die Carbonylgruppe im Phenacyllinker eine gewisse Reaktivität gegenüber Grignardreagenzien auf, jedoch können Aldehyd- und Ketofunktion über die Reaktionstemperatur differenziert werden.



Schema 31: Syntheseweg von 6-Hydroxy-8-nonencarbonsäure (**112**) an Phenacyl-PS-Harz

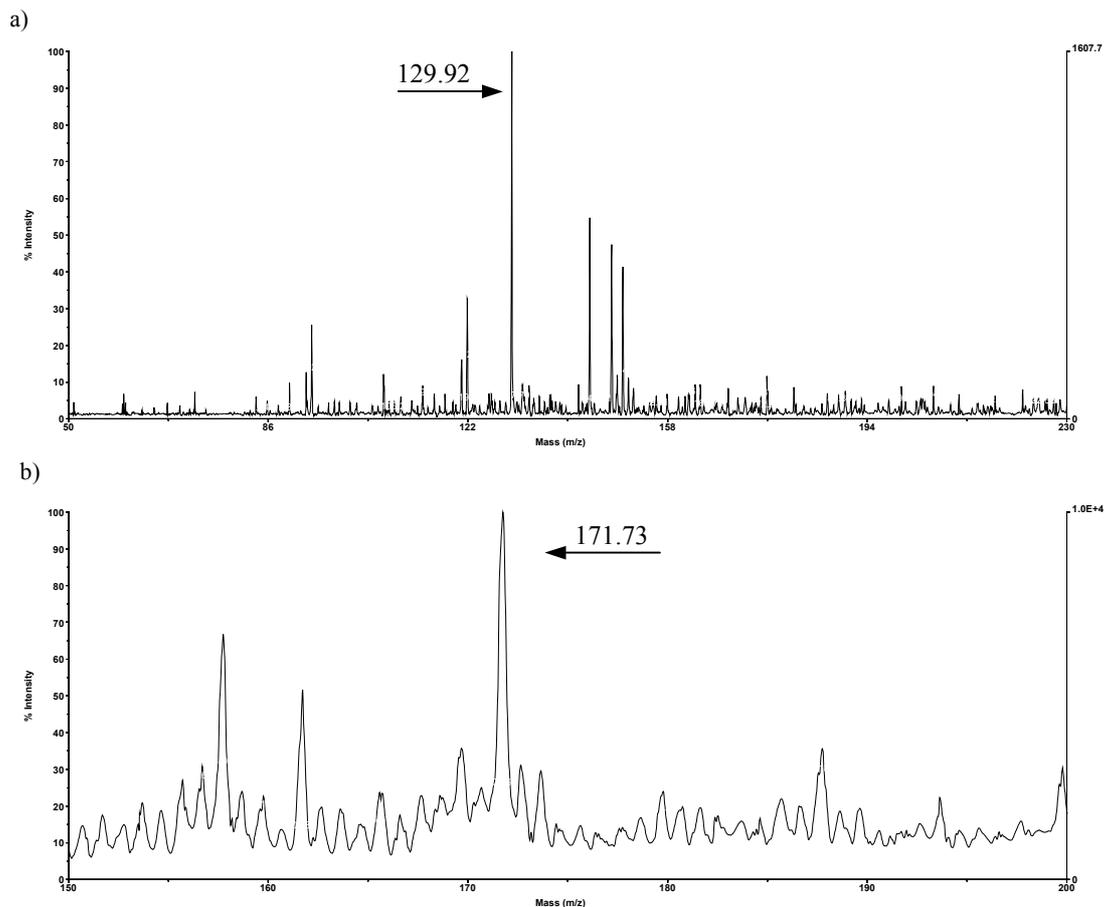


Abb. 14: a) Massenspektrum von 6-Oxohexansäure an Phenacyl PS Harz **102**; b) Massenspektrum von 6-Hydroxy-8-nonensäure an Phenacyl PS Harz **112**

Die nun folgende Umsetzung der Hydroxyfunktion von 6-Hydroxynon-8-encarbonsäure (**112**) wurde ähnlich wie in Lösung mit Acryloylchlorid in Gegenwart von TEA und katalytischen Mengen DMAP vorgenommen. Im Massenspektrum, das nach Aufarbeitung des Reaktionsgemischs aufgenommen wurde, konnte die Molekülmasse des Produktes nicht detektiert werden. Hingegen zeigen sich auch keine signifikanten Massenfragmente oder das Molekülsignal des Ausgangsmaterials. Mit Hilfe des Methylrot-Tests^[145] konnten keine freien OH-Gruppen mehr am Harz festgestellt werden, was auf eine Umsetzung hindeutet. Eine photolytische Abspaltung des Reaktionsproduktes gelang ebenfalls nicht und eine nukleophile würde zwangsläufig das Produktmolekül zerstören.

Da schon die Charakterisierung des Zyklisierungsvorläufers in Lösung angedeutet hatte, wie schwierig die massenspektrometrische Analyse sein würde, wurden die Anstrengungen an diesem Punkt abgebrochen. Wenn das Ausgangsmaterial der Ringschlussmetathese nicht detektierbar ist, wird in jedem Fall die Reaktionskontrolle durch MS-SPOS schwierig. Eine robustere Ausgangsstruktur (z. B. ohne Acrylsäureeinheit und Allylalkohol) wäre für grundsätzlichere Untersuchungen in dieser Hinsicht erfolgversprechend.

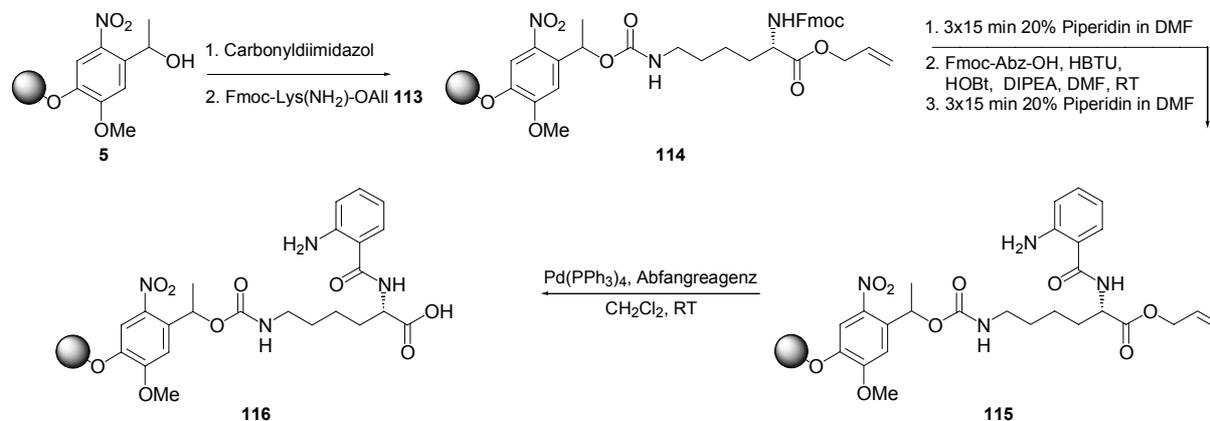
3.2.4 Versuche zur Ausweitung des Prinzips auf andere funktionelle Gruppen

Das Prinzip von MS-SPOS wurde an festphasengebundenen Carbonsäuren entwickelt und für diese Substrate überprüft. Da anfangs die Peptidsynthese an der festen Phase (SPPS) die Entwicklung von neuen Synthesemethoden und Linkerstrategien bestimmt hat, sind auch heute noch vor allem Ankergruppen für Carbonsäuren in der Festphasensynthese gebräuchlich. Erst in letzter Zeit hat die Organische Synthese am polymeren Träger (SPOS) an Momentum gewonnen und es werden mehr und mehr Linker auch für andere funktionelle Gruppen entwickelt. Im Bereich der photolabilen Linker sind es jedoch nach wie vor hauptsächlich solche, die Carbonsäuren freisetzen (vide infra). Die zusätzliche Anforderung an den Linker, bei der emittierten Wellenlänge des MALDI Lasers von 337 nm spaltbar zu sein, beschränkt die geeigneten Ankergruppen auf die bereits verwendeten Linker für Carbonsäuren und den ‚traceless‘ Thiohydroxamsäure Linker **12** von Routledge et al.^[52], der allerdings nicht kommerziell erhältlich und nur nach fünfstufiger Synthese erhalten werden kann. Der Vorteil der bisher immobilisierten Carbonsäuren ist unter anderem der, dass ein negativ geladenes Substrat abgespalten wird, das direkt im TOF-Massendetektor analysiert werden kann. Der ‚traceless‘ Linker **12** setzt ungeladene Alkylgruppen frei, so dass das Substrat eine ionisierbare Gruppe oder ein „Ionisierungstag“ aufweisen muss.

Für einige orientierende Versuche wurde auf die schon etablierten photolabilen Linker **5** und **6** zurückgegriffen und daher der *o*-Nitroveratryllinker **5** als Analogon zur *o*-Nitroveratryloxy-carbonyl-(Nvoc-)Schutzgruppe als Urethan zu einer Ankergruppe für Amine derivatisiert.

Die Voraktivierung der freien ϵ -Aminogruppe von Fmoc-Lysinallylester **113** mit einem Äquivalent Carbonyldiimidazol in Methylenchlorid und anschließender Zugabe zu *o*-Nitroveratryl-PS-Harz **5** schlug fehl. Die quantitative Fmoc-Bestimmung zeigte keinerlei Umsetzung, der Methylrot-Test auf freie Hydroxygruppen verlief positiv. Hingegen gelang die Kupplung ans Harz, nachdem die Hydroxyfunktion mit fünf Äquivalenten Carbonyldiimidazol in DMF über Nacht vorbehandelt worden war. Kurz vor Zugabe von Fmoc-Lysinallylester **113** wird das überschüssige Kupplungsreagenz mit vier Äquivalenten Methanol abgefangen. Die Reaktion wird erneut über Nacht geführt. Die Beladung wurde anschließend durch die quantitative Fmoc-Analyse als 0.18 mmol/g bestimmt, das ergibt eine Ausbeute von 30% bezogen auf die vom Hersteller angegebene Anfangsbeladung. Anschließend wurde an den entschützten Lysinallylester Fmoc-Anthranilsäure gekuppelt. Nach Entschützung wurde das Harz **115** auf der MALDI-Platte mit Säure bzw. Base versetzt, um eine Ionisierung zu erreichen. Es konnte kein Produkt detektiert werden. Da sehr ähnliche Produkte im Verlaufe der Benzodiazepinsynthese im Massenspektrometer detektierbar waren, wurde der Allylester abgespalten, ein Unterschied zu den Benzodiazepindion-Vorläufern, die über die Säurefunktion an das Harz gebunden waren. In der Palladium-vermittelten Allylsplaltung wurde als Fänger Dimethylamin-Boran-Komplex verwendet, der vor allem für

das Entfernen von Alloc-Schutzgruppen in der Festphasenpeptidsynthese optimiert wurde.^[146, 147]



Schema 33: Festphasensynthese von 2-Aminobenzoyllysine **113**

Nach Aufarbeitung der Reaktionsmischung wurde das Harz wiederum mit Säure und Base behandelt, zusätzlich auch neutral auf die Trägerplatte aufgetragen. Im Massenspektrometer werden im positiven Ionenmodus aus der neutralen und aus der mit Säure behandelten Probe Signale erhalten, die um zwölf Einheiten die erwartete Molekülmasse übertreffen. Wahrscheinlich ist das auf die Bildung eines Boran-Komplexes mit dem erwarteten Produkt zurückzuführen. Die β -Aminogruppe und der Carbonylsauerstoff der Anthranilsäure können mit Bor einen Sechsring ausbilden, der scheinbar so stabil ist, dass weder Waschen mit Dimethylformamid/Wasser-Gemischen noch Methanol den Komplex zerstören konnte. Die photolytische Abspaltung vom Harz in Tetrahydrofuran mit 1% Ethanolamin liefert ein Produkt mit der gleichen Masse (ESI und MALDI), die auch in der direkten Analyse des Harzes erhalten wurde. Der $[M+H]^+$ Peak wurde trotz Ethanolamin auch in diesem Fall nicht gefunden. Ethanolamin wird häufig eingesetzt, um Borkomplexe zu zerstören, da es sehr stabile Fünfring-Chelatkomplexe ausbildet. Wahrscheinlich ist in diesem Fall der Sechsringkomplex jedoch stabiler.

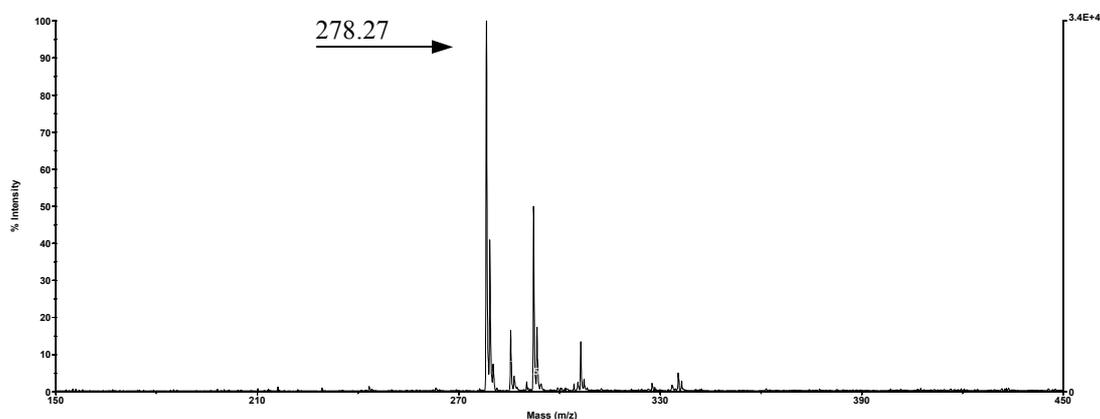


Abb. 15: Massenspektrum des Borankomplexes von **116b** an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Der Dimethylamin-Boran-Komplex **116b** wurde speziell im Hinblick auf die Festphasensynthese von Peptiden als Fänger etabliert. Obwohl Strukturen mit freiem *N*-Terminus durch die Alloc-Spaltung generiert wurden, wurde ein solcher Komplex aus Boran und peptidischer Struktur nicht beobachtet. Zum einen wird bei der Spaltung der Carbamatstruktur nicht in einem Schritt das freie Amin, sondern das korrespondierende Boran-Carbamat gebildet.^[146] Somit steht die Aminogruppe nicht unmittelbar als Komplexligand zur Verfügung. Das Boran-Carbamat zerfällt erst bei der Aufarbeitung in Anwesenheit von Spuren von Wasser oder ähnlichem (beispielsweise auch durch Kieselgel). Zum anderen wurden in den ursprünglichen Untersuchungen nur Strukturen aus α -Aminosäuren aufgebaut, die also Fünfring-Boran-Komplexe ausbilden könnten. Die durch die β -Aminosäure ausgebildete Sechsring-Struktur könnte auch eine größere Stabilität aufweisen als diese Fünfring-Strukturen.

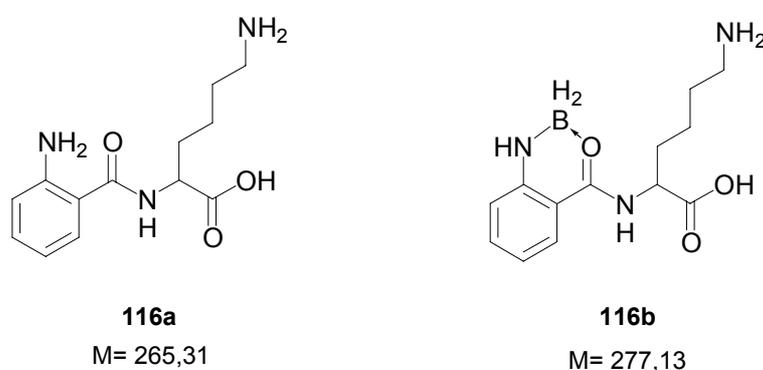


Abb. 16: 2-Aminobenzoyllysine **116a** und 2-Aminobenzoyllysine-Boran **116b**

Die Wiederholung des Experimentes unter Verwendung anderer Allylfänger (*N*-Methylanilin, Morpholin) blieb erfolglos. Der Boran-Komplex wurde im positiven Ionenmodus detektiert, die Spaltprodukte mit anderen Fängern konnten weder im positiven noch im negativen Ionenmodus detektiert werden. Eventuell ist die Ionisierung eine Erklärung für diese Beobachtung. Es ist möglich, dass der Boran-Komplex, da er eine positive Ladung birgt, die Ionisierung des Produktes vereinfacht und so im Massenspektrometer wesentlich intensivere Signale gibt als die unkomplexierten peptidartigen Produkte.

In einem anderem Ansatz sollte, ähnlich wie in der Arbeit von Carrasco et al.^[57], ein doppeltes Linkersystem („dual handle“) untersucht werden. Die Verknüpfung eines photolabilen Linkers mit einem chemisch spaltbaren Linker, der seinerseits mit anderen funktionellen Gruppen (beispielsweise mit Alkoholen zu Ethern oder mit Aminen zu sekundären Aminen) derivatisiert werden, könnte eine größere Anwendungsbreite eröffnen. Durch photolytische Spaltung im Massenspektrometer würde so das Addukt aus chemisch spaltbarem Linker und Substrat freigesetzt. Das negativ geladene Carboxylation löst das Problem der Ionisierung und macht anders als im „dual handle“ von Carrasco et al. die

Verwendung einer Ionisierungssequenz überflüssig. Das freie Substrat kann durch Spaltung des anderen Linkers erhalten werden, eine Photolyse wird so unnötig.

Erste Untersuchungen zeigten, dass 4-Hydroxymethylphenoxyessigsäure (HMPA **26**), ein in der Festphasensynthese sehr gebräuchlicher Linker^[78], als Cäsiumsalz an Bromphenacyllinker **6** gebunden werden konnte und anschließend ein deutliches Massensignal im negativen Ionenmodus lieferte.

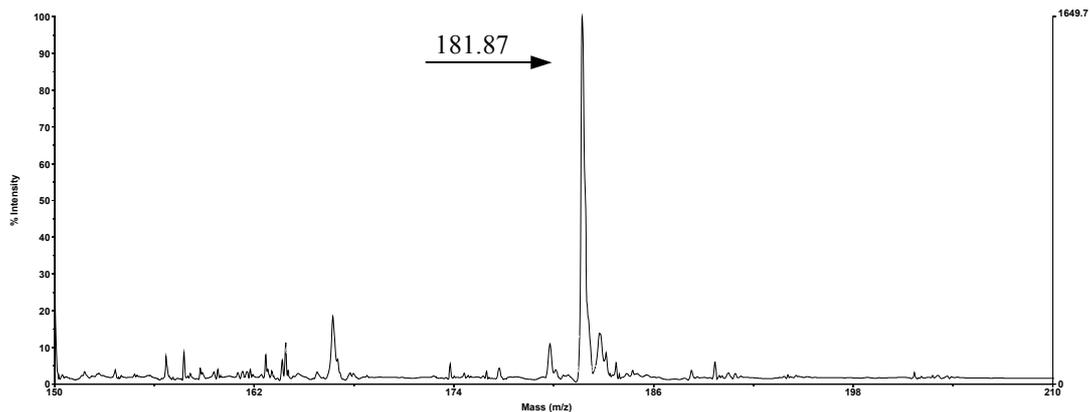


Abb. 17: 4-Hydroxymethylphenoxyessigsäure (**26**) an Phenacyl PS Harz

Durch diese anfänglichen Ergebnisse ermutigt, wurde die Synthese eines Konstruktes aus HMPA Linker **26** und Alkohol bzw. Amin begonnen, das anschließend an das photolabile PS Harz geknüpft werden sollte. Versuche, über eine Mitsunobu-Reaktion, eine Williamson-Ethersynthese oder eine Folge aus Appelbromierung und Substitution mit einem Amin die Hydroxyfunktionalität von **26** zu derivatisieren, blieben jedoch erfolglos. Die Empfänglichkeit von 4-Hydroxymethylphenylessigsäure (**26**) und ihrer Derivate für nukleophile Angriffe erschwert eine weitergehende Funktionalisierung. Ein robusteres Linkersystem als HMPA wäre für die Verfolgung der „dual handle“ Strategie besser geeignet.

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten Strategien entwickelt werden, um Verbindungen an fester Phase aufzubauen, die spezifisch die Funktion von onkogenen Ras-Proteinen manipulieren können. Als Orientierungspunkt wurde DABP-GTP **3a** gewählt, da es die Hydrolyse von GTP zu GDP initiiert und den Konformationswechsel von der aktiven in die inaktive Form herbeiführt.^[33] DABP-GTP **3a** selbst eignet sich indes nicht zur Leitstruktur, da es eine zwanzigfach verminderte Affinität zu Ras im Vergleich zu GTP aufweist und GTP in hohen intrazellulären Konzentrationen von ca. 0.35 mM auftritt.

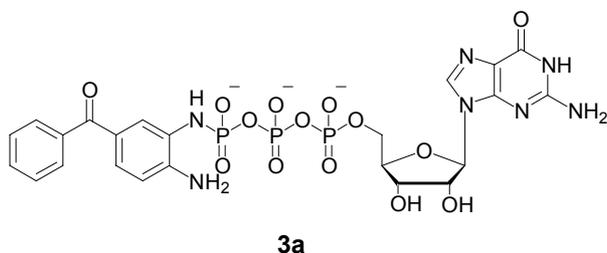
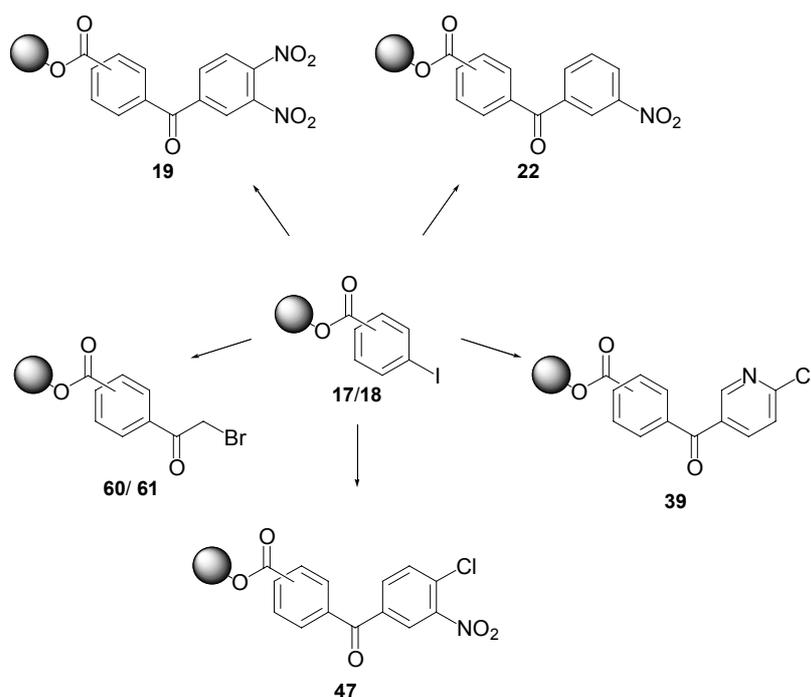


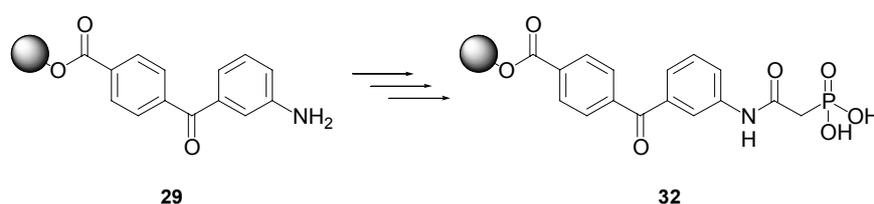
Abb. 18: Das Addukt aus 3,4-Diaminobenzophenon und GTP, DABP-GTP **3a**, das durch onkogenes Ras hydrolysiert wird.

Die Benzophenon-Grundstruktur wurde ausgehend von 3- bzw. 4-Iodbenzoesäure an Wang-Polystyrol-Harz **17** und **18** aufgebaut. Durch einen Iod-Magnesiumbromid-Austausch mit *iso*-Propylmagnesiumbromid wurde das festphasengebundene Grignard-Reagenz generiert, eine Transmetallierung mit Kupfercyanid und Lithiumchlorid lieferte das entsprechende Cuprat, das durch die entsprechenden Säurechloride acyliert wurde (s. Schema 37).^[70] Als Acyldonoren wurden sowohl die aromatischen Säuren 3,4-Dinitrobenzoesäure, 3-Nitrobenzoesäure, 6-Chlornicotinsäure und 4-Chlor-3-nitrobenzoesäure wie auch die nicht-aromatische Bromessigsäure verwendet. Durch die Transmetallierung ist die Umsetzung mit Nitroverbindungen trotz ihrer Unverträglichkeit mit Grignard-Reagenzien möglich. Mit dieser Reaktion ist eine Vielfalt aromatischer Ketone zugänglich. Bei der Synthese von GTP-Addukten vermeidet Verwendung von 3-Nitrobenzoesäure anstelle von 3,4-Dinitrobenzoesäure die Aminogruppe an Position 4 und somit die Spaltung von GTP. So kann in den biologischen Untersuchungen zwischen Bindungsaffinität und Hydrolyseaktivität unterschieden werden.



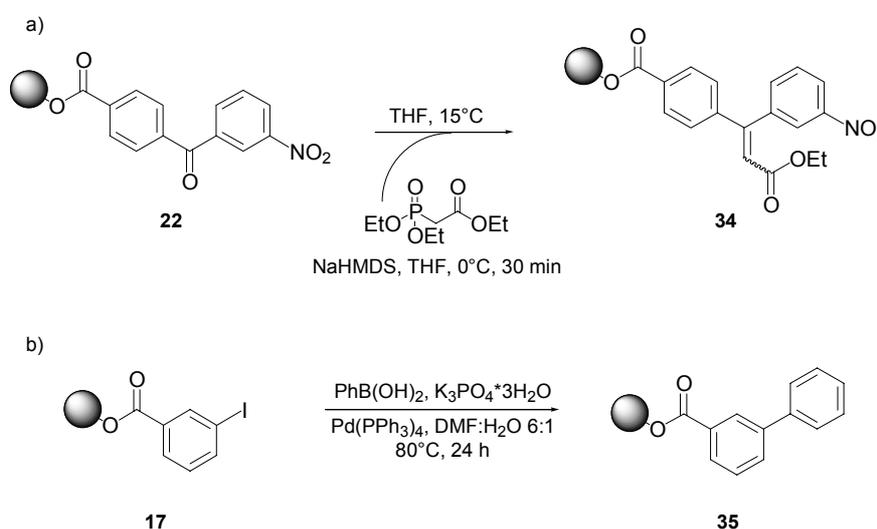
Schema 37: Übersicht über die wichtigsten Produkte der Acylierung von 3- bzw. 4-Iodbenzoesäure. Das Produkt aus Iod-Magnesiumbromid-Austausch und Cuprierung wurde jeweils mit dem entsprechenden Säurehalogenid umgesetzt.

Der Syntheseweg zu 4-(3'-Aminobenzoyl)-benzoesäure **23** wurde sowohl an Polystyrol als auch an PEGA-Harz vollzogen.^[77] Dafür wurde Aminomethyl-PEGA-Harz mit 4-Hydroxymethylphenoxyessigsäure (**26**) funktionalisiert, einem säureempfindlichen Linker.^[78] Nach der Verknüpfung von 4-Iodbenzoesäure wurde die Acylierungssequenz wie an Wang-PS-Harz durchgeführt, die Anzahl der Äquivalente wurde jedoch verdoppelt. Die nitrosubstituierte Säure wurde mit 2 M $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in NMP zu 4-(3'-Aminobenzoyl)-benzoesäure reduziert und die freie Aminogruppe mit Diethylphosphonoacetylchlorid in Gegenwart von DMAP acyliert (s. Schema 38). Die Phosphonsäure wurde mit Trimethylsilylbromid entschützt und kann nun mit einem Nukleotid (z. B. GMP) gekuppelt werden (s. Lit.^[67]). Damit ist der kritische Schritt beim Aufbau der Benzophenonstruktur auch an PEGA-Harz etabliert. Der Aufbau der Grundstruktur, ihre Verknüpfung mit einem geschützten Phosphonessigsäure-Derivat und darauffolgende Entschützung liefert einen guten Ausgangspunkt für die Synthese von Guanin-Nukleotid-Addukten.



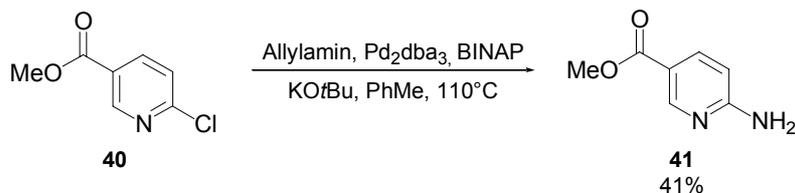
Schema 38: Synthese von 4-[3-(2-Phosphonoacetylamino)-benzoyl]-benzoesäure an HMPA-PEGA-Harz **32**

Da 3,4-Diaminobenzophenon einen negativen Bindungsbeitrag leistet, muss die Grundstruktur entsprechend variiert werden, um eine Bindung an die Proteinoberfläche zu erreichen. Unter Umständen können neu eingeführte Substituenten oder Konformationsänderungen hierzu einen Beitrag leisten. Aus einer Reihe denkbarer Derivatisierungen der Benzophenon-Grundstruktur wurde hierzu die Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion ausgewählt, um die Carbonylgruppe zu olefinieren. An einer exemplarischen Reaktion mit Diethoxyphosphoryl-essigsäureethylester wurden die Reaktionsbedingungen optimiert (s. Schema 39a). Die Synthese einer Biphenylstruktur bedeutet eine formale Verkürzung der Benzophenon-Struktur um die verbrückende Carbonylbrücke. In einem orientierenden Experiment wurde 3-Iodbenzoesäure mit Phenylboronsäure umgesetzt, damit ist auch der Weg zu Biphenyl-derivaten eröffnet (s. Schema 39b).



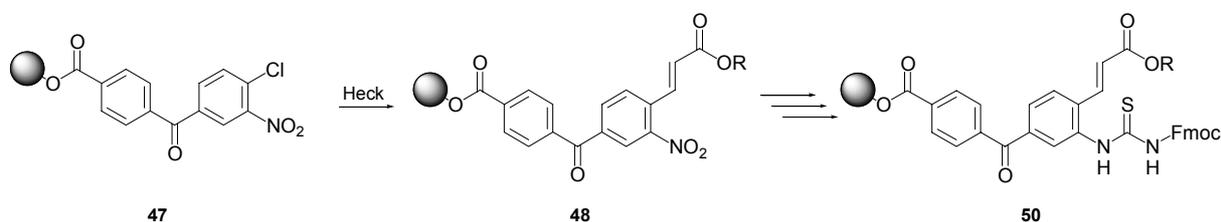
Schema 39: a) Olefinierung von 4-(3-Nitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz **22**; b) Suzuki-Kupplung von 3-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz **17**

Auf der Suche nach möglichen nukleophilen Gruppen, die das γ -Phosphat angreifen können, wurde zunächst die 6-Aminonicotinoylgruppe untersucht. In Lösung wurde vorab (6-Aminonicotinoyl)-benzol (**36**) ausgehend von 6-Chlornicotinoylchlorid (**37**) und Benzol synthetisiert.^[84] Da die hier verwendeten Bedingungen zur Aminierung (Druck, kein Lösungsmittel) nicht direkt auf die Festphase zu übertragen waren, wurde die Pd-katalysierte Aminierung mit Allylamin am Modellsystem (6-Chlornicotinsäuremethylester (**40**)) untersucht. Die Aminierung und Entschützung erfolgten in einem Schritt und 6-Aminonicotinsäuremethylester (**41**) kann nach Aufreinigung in 41% Ausbeute isoliert werden (s. Schema 40). Da jedoch die zyklische Amidgruppe nicht nukleophil genug zu sein scheint, um die Spaltung von GTP herbeizuführen, wurde die Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Festphase eingestellt.^[96]

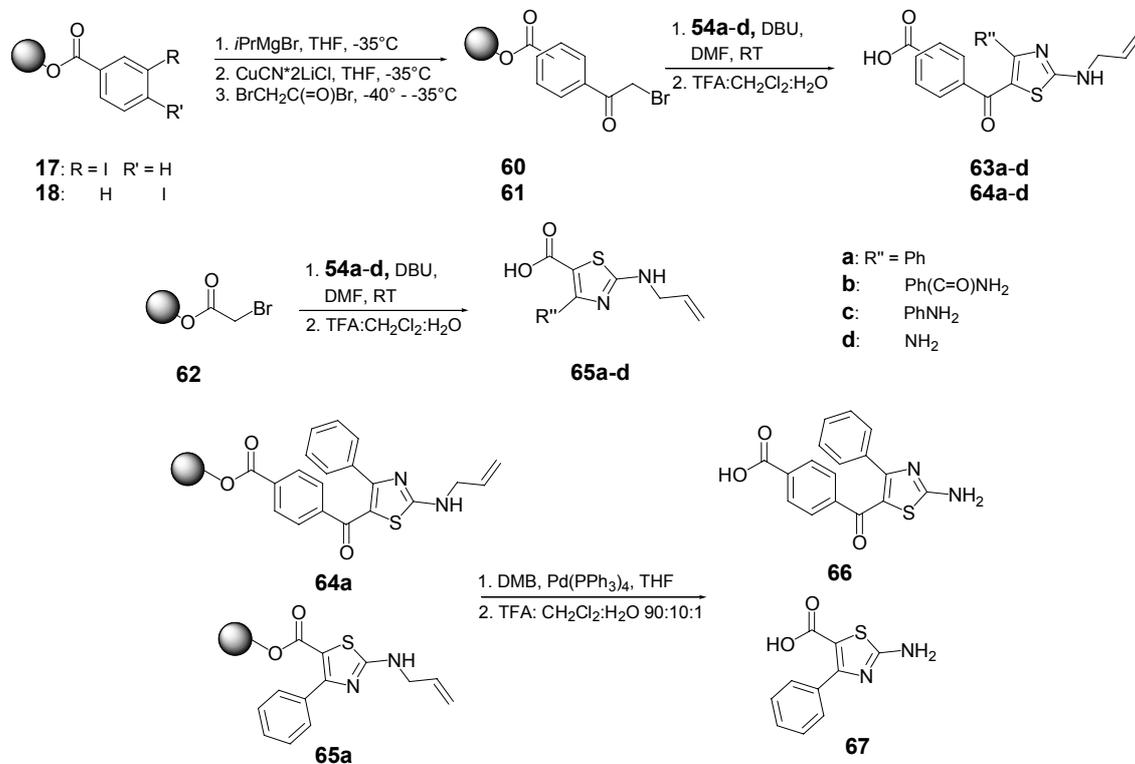


Schema 40: Pd-Aminierung von 6-Chlornicotinsäuremethylester (**40**)

Ein 2-Aminobenzothiazinfragment kann als zyklischer Isothioharnstoff interpretiert werden und sollte daher eine höhere Nukleophilie als die Aminopyridyl-Substruktur aufweisen. Über vier Stufen konnte ein Zyklisierungsvorläufer synthetisiert werden, der bei der sauren Abspaltung durch eine intramolekulare 1,4-Addition das geschützte 2-Aminobenzothiazin-derivat liefern sollte (s. Schema 41).^[97] Das Produkt konnte zwar im Massenspektrometer nachgewiesen, nicht aber isoliert werden.



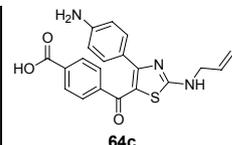
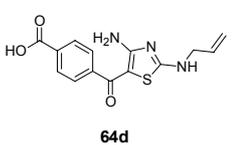
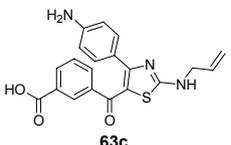
Schema 41: Synthese des Zyklisierungsvorläufers an Wang-PS-Harz **50**



Schema 42: Synthese von 2-Aminothiazolylderivaten **63-67**

Auch eine 2-Aminothiazol-Struktur kann als zyklischer Isothioharnstoff gedeutet werden. Sie wurde aus einem festphasengebundenen α -Bromketon und einem Thioharnstoffderivat aufgebaut.^[109] Im Gegensatz zur klassischen Hantzsch-Synthese jedoch bleibt die Carbonyleinheit des α -Bromketons und somit die Grundstruktur des aromatischen Ketons erhalten. Die Allylschutzgruppe wurde in zwei orientierenden Experimenten von 3-(2-Allylamino-4-phenylthiazolyl-5-carbonyl)-benzoesäure (**63a**) und 2-Allylamino-4-phenylthiazolyl-5-carbonsäure (**65a**) Pd-katalysiert mit *N,N'*-Dimethylbarbitursäure als Abfangreagenz abgespalten. Damit ist die Synthese einer Bibliothek von 2-Aminothiazolylderivaten möglich (s. Schema 42). Die besondere Affinität von 2-Aminothiazolylderivaten zu Kinasen^[106, 108] war Anlass, vor allem die allylgeschützten Strukturen auf ihre inhibierenden Eigenschaften von Rezeptor-Tyrosinkinasen RTKs zu untersuchen. Aus verschiedenen Untersuchungen war schon bekannt, das *N*-substituierte Aminothiazole bessere Bindungseigenschaften an Kinasen aufweisen als die entsprechenden, unsubstituierten Verbindungen. Von zwölf synthetisierten Verbindungen (s. Kap. 3.1.6, Abb. 8) zeigten drei niedrige IC₅₀-Werte für Rezeptor-Tyrosinkinasen, die vor allem in der Angiogenese und bei Brustkrebs eine große Rolle spielen (s. Tab. 4). Die Allylaminthiazolstrukturen **63c**, **64c** und **d** können somit als Leitstrukturen für die Entwicklung von Tyrosinkinaseinhibitoren dienen.

Tabelle 4: IC₅₀ [μ M] für verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen (Ralph Mazitschek)

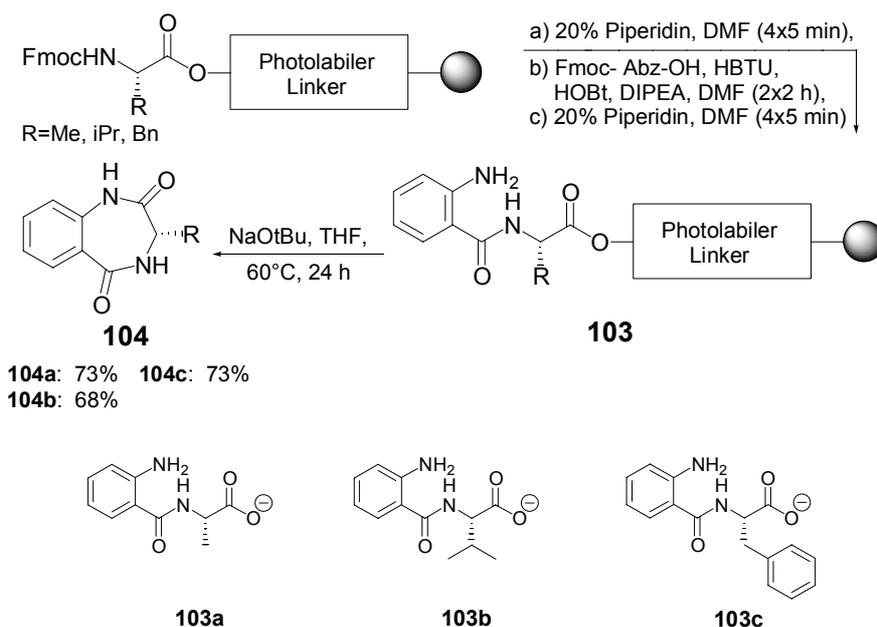
	 64c	 64d	 63c
VEGFR3	8	27	13
Tie2	2.4	9	6
FGFR1	10	33	9
EGFR	5	25	9
Her-2/ neu	9	42	19
IGF1R	5	14	6

Neben der IR- und NMR-Spektroskopie ist die Massenspektrometrie ein häufig verwendetes Mittel zur Charakterisierung chemischer Verbindungen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, Reaktionen am polymeren Träger massenspektrometrisch zu überwachen. Das Prinzip der direkten massenspektrometrischen Charakterisierung von festphasengebundenen Verbindungen wurde durch die Verwendung photochemisch spaltbarer Linker in einem MALDI-TOF-Spektrometer realisiert. Handelsübliche MALDI-TOF-

Spektrometer sind mit einem Laser der Emissionswellenlänge $\lambda_{em} = 337$ nm ausgestattet. Als Linker wurden daher die beiden kommerziell erhältlichen photolabilen Ankersysteme **5** und **6** an PS-Harz ausgewählt, die durch Licht der Wellenlänge 350 nm bzw. 365 nm gespalten werden können. Im Gegensatz zu vorhergehenden Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen^[56, 57] konnte in dieser Arbeit erstmals eine Ionisierung ohne Verwendung von Matrix erreicht werden. Damit sind auch Verbindungen mit Molekulargewichten <300 ohne störende Matrixpeaks eindeutig massenspektrometrisch detektierbar.

Zunächst wurden beide Linkersysteme mit verschiedenen organischen Säuren verknüpft und das Harz daraufhin im Massenspektrometer untersucht. Der weitaus größere Teil der Säuren konnte im Massenspektrometer detektiert werden (s. Kap.3.2.2, Tab. 2). In allen Fällen zeigte sich der Phenacylester **6** dem *o*-Nitroveratrylester **5** überlegen.

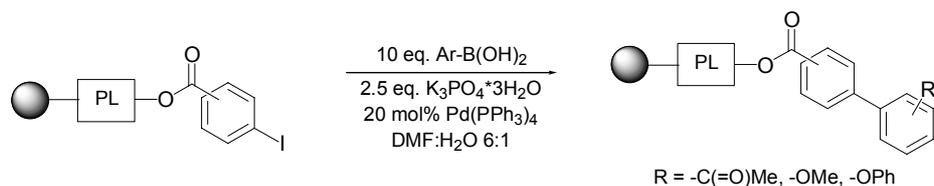
Alle Verbindungen, die nicht mit dieser Methode charakterisiert werden können (s. Kap. 3.2.2, Abb. 9), absorbieren im Bereich von 337 nm und geraten so in einen Anregungszustand, von dem aus sie Photoreaktionen eingehen können, wie sie z. B. für Benzophenon und Nitroverbindungen bekannt sind.



Schema 43: Synthese von 1,4-Benzodiazepin-2,5-dionen **104** und Strukturen der massenspektrometrisch detektierten Zwischenprodukte **103a-c**

Die Anwendbarkeit dieser direkten, matrix-freien massenspektrometrischen Reaktionskontrolle MS-SPOS auf Synthesen an fester Phase wurde an mehreren Beispielen demonstriert. In einem ersten Beispiel wurden 1,4-Benzodiazepine, eine Verbindungsklasse privilegierter Strukturen^[131], nach der Methode von Mayer et al. synthetisiert (s. Schema 43).^[138] Die Zyklisierungsvorläufer **103a-c** konnten im MALDI-TOF-Spektrometer detektiert werden. In diesem Fall erwiesen sich Linker **5** und **6** als gleichermaßen geeignet, die

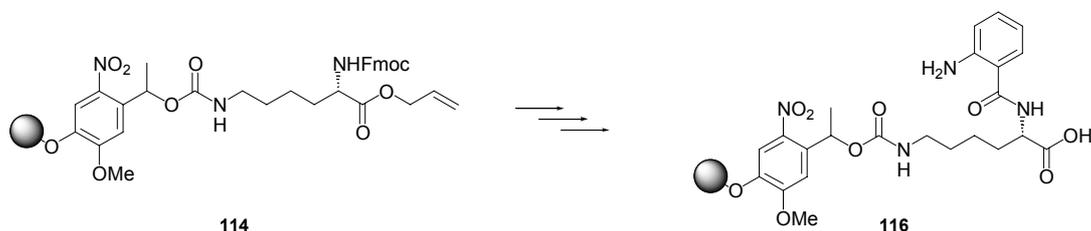
chemischen Ausbeuten der Zyklisierung lagen jedoch im Fall des *o*-Nitroveratrylesters **5** deutlich höher.



Schema 44: Suzuki Reaktion mit Iodbenzoesäure und Boronsäuren (PL= Photolabiler Linker)

In einem weiteren Beispiel wurden Biarylstrukturen mit Hilfe der Pd-vermittelten Suzuki Kupplung an den photolabilen Linkern **5** und **6** aufgebaut (Schema 44). Biphenylstrukturen gehören zu den strukturellen Untereinheiten, die sehr häufig in biologisch aktiven Molekülen aufgefunden werden^[79-81], und Pd⁰-katalysierte Umsetzungen gehören zu den häufigsten Reaktionen in der organischen Festphasensynthese.^[148] Bei Verwendung des Phenacyllinkers **6** konnten starke Produktsignale (**105** bis **106**) im Massenspektrometer verzeichnet werden. Die Produkte wurden entweder mit einer Quecksilberdampf-Lampe oder mit Hydrazin in DMF gespalten und analysiert. Weiterhin wurde eine zweistufige Synthesesequenz aus einer Oxidation und einer Grignard-Reaktion an der Festphase untersucht (s. Kap. 3.2.3, Schema 31). Sowohl Zwischenprodukt **102** als auch Produkt **112** konnten zweifelsfrei nachgewiesen werden.

Im Rahmen einer kleinen Reihe orientierender Experimente wurde 2-Aminobenzoyl-lysinallylester **115** über die freie ε-Aminogruppe als Urethan an Nitroveratryllinker **5** geknüpft (s. Schema 45). Nach Pd⁰-katalysierter Allylsplaltung mit BH₃*NHMe₂ als Abfangreagenz konnte der Boran-Komplex **116b** im positiven Ionenmodus nachgewiesen werden. Damit konnte die Anwendbarkeit von MS-SPOS von festphasengebundenen Carbonsäuren auf Amine ausgedehnt werden.



Schema 45: Synthese von 2-Aminobenzoyllysin **116** an *o*-Nitroveratryllinker **5** PS Harz

4.2 Ausblick

Die Synthese von 4-[3-(2-Phosphonoacetyl-amino)-benzoyl]-benzoesäure an PEGA-Harz eröffnet den Zugang zu Guanin-Nukleotid-Addukten., die anschließend auf ihre Bindungsaffinität zu Ras im Vergleich zu DABP-GTP **3a** und GTP untersucht werden können. Eine Adaption des On-Bead-Assays für GTP-modifizierte Tripeptide wäre geeignet, um die synthetisierten Strukturen biologisch zu evaluieren.^[67] Die Synthese und Evaluierung von Substanzbibliotheken an PEGA-Harz, z. B. Biaryl-derivate oder Produkte der Horner-Wadsworth-Emmons-Olefinierung, wäre so ohne Abspaltung möglich. Ausgehend von den erhaltenen Informationen zum Bindungsverhalten könnten in einem interaktiven Prozess nichtpeptidische Strukturen entworfen werden, die auch ohne Nukleotidmodifikation an die Proteinoberfläche von Ras in der Nähe der GTP-Bindungstasche binden.

Die Synthese und biologische Evaluierung geschützter und ungeschützter Aminothiazol-Derivate kann ausgehend von der entwickelten Festphasensynthesestrategie durchgeführt werden. Die biologische Evaluierung könnte mit Zelltests beginnen, die die Wirksamkeit der Kinaseinhibitoren in Zellen und im Vergleich zu anderen Kinaseinhibitoren untersuchen. Ein Zelldifferentiationstest, der die Ausdifferenzierung von Nervenzellen in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren wie FGF und IGF untersucht, würde genaueren Aufschluss über die *in vivo* Aktivität der gefundenen Kinaseinhibitoren geben.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass MS-SPOS auf eine Vielzahl von Verbindungsklassen und diverse organische Reaktionen anwendbar ist. Daher sollte diese Methode in der Synthese von Verbindungsbibliotheken an fester Phase zur Reaktionskontrolle und Charakterisierung einzelner Verbindungen geeignet sein. Da für eine massenspektrometrische Analyse im MALDI-TOF-Spektrometer sehr geringe Mengen Analyt benötigt werden (ca. 10^{-15} mol^[149]), sollte ein einziges Harzkügelchen prinzipiell für eine eindeutige Identifizierung der Verbindung ausreichen. Weiterführende Experimente sollten sich zum einen mit der Untersuchung der Nachweisempfindlichkeit beschäftigen. Zum anderen könnte die Verwendung größerer Harzkügelchen für diesen Nachweis von Vorteil sein. So könnte mit der gegebenen räumlichen Auflösung des Lasers tatsächlich ein einzelnes Bead bestrahlt werden.

Neben der Möglichkeit, eine photolabile Ankergruppe zu verwenden, die im Massenspektrometer gespalten werden kann, ist es auch denkbar, ein Molekül, das üblicherweise als MALDI Matrix verwendet wird, zu modifizieren und an den polymeren Träger zu knüpfen. Ähnlich wie im Beispiel von Carrasco et al.^[57] könnte dann ein

analytisches Konstrukt aus eben dieser Matrix, einem chemisch spaltbaren Linker und dem entsprechenden Substrat durch Laser Desorption freigesetzt werden.

Orientierende Versuche zu diesem Thema wurden von Hutchens et al. unternommen.^[150] In ihrer Arbeit wurde α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure, eine als Matrix gebräuchliche Verbindung, über die Hydroxyfunktion kovalent an ein lösliches Polymer (Poly(1-octadien-*co*-maleinsäureanhydrid) POMA) gebunden. Anschließend wurde ein Glykoproteinfragment gekuppelt. Das Polymer wurde als Film auf einem Träger ausgefällt und anschließend im MALDI-TOF-Spektrometer untersucht. Dabei wurde die Masse des Addukts aus α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure und Proteinfragment im Spektrometer nachgewiesen, außerdem wurden auch weit weniger intensive Massensignale des Fragments ohne sowie mit zwei Molekülen α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure gefunden.

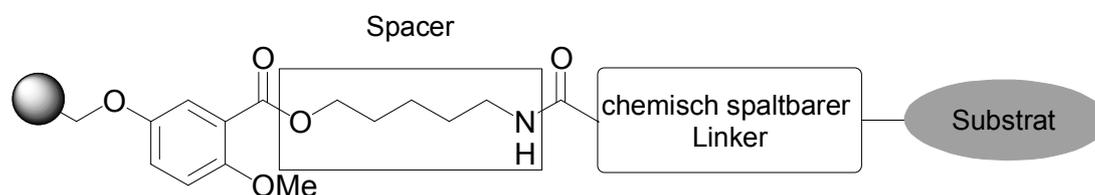


Abb. 20: Möglicher Aufbau eines analytischen Konstrukts zur Laser Desorption von der festen Phase mit 5-Hydroxy-2-methoxybenzoesäure **127** als energieabsorbierendem Molekül

Da neben reiner 2,5-Dihydroxybenzoesäure (**77**) auch 2,5-Dimethoxybenzoesäure als sogenannte „Supermatrix“ in der MALDI-MS-Spektrometrie verwendet wird, sollte es möglich sein, 5-Hydroxy-2-methoxybenzoesäure anstelle von α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure zu verwenden (wie in Lit.^[150]). Sie könnte dann über die Hydroxyfunktion an den polymeren Träger gebunden und anschließend über einen Spacer mit einem Substrat bzw. einem chemisch spaltbaren Linker verknüpft werden (Abb. 20).

Sollte sich die Vermutung als richtig erweisen, dass im Massenspektrometer das Konstrukt aus 5-Hydroxy-2-Methoxybenzoesäure, Spacer und Substrat sowohl abgespalten als auch detektiert werden kann, wäre dies ein einfacher Weg zur Reaktionsüberwachung an fester Phase.

5 Experimenteller Teil

5.1 Messgeräte und Hilfsmittel

Die ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren wurden auf folgenden Geräten aufgenommen:

Bruker AC 250	250 MHz, ^1H -NMR
Bruker AM400	400 MHz, ^1H -NMR; 100.6 MHz, ^{13}C -NMR
Varian Mercury 400	400 MHz, ^1H -NMR; 100.6 MHz, ^{13}C -NMR

Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan (TMS, $\delta = 0$ ppm) als internen Standard. Die Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dubletts, t = Triplett, m = Multiplett, br = breites Signal.

Die 70 eV EI- und die FAB-Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT MS 70 Spektrometer gemessen. Angegeben sind die m/z Werte.

Die MALDI-Spektren wurden mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix an einem Voyager DE Pro MALDI-TOF Spektrometer aufgenommen, das mit einem LeCroy Digitizer und einem internen Laser ausgestattet ist.

Die MS-SPOS Spektren wurden am gleichen Gerät aufgenommen, üblicherweise mit Laserintensitäten zwischen 2700 und 3000 Einheiten. Die Spektren wurden im linearen Operationsmodus und mit verzögerter Extraktion aufgenommen, meist im negativen Ionen-Modus. Die übrigen Einstellungen waren: *Optimized Laser Rate Type*, *Bin size*: 0.5 ns, *Vertical scale* 1000 mV mit *full input bandwidth*, *Accelerating Voltage*: 20 000 V, *Grid voltage* 95% und *guide wire voltage* 0.05%.

Die Elementaranalysen wurden mit einem Verbrennungsautomaten CHN-Rapid der Fa. Heraeus gemessen.

Die UV/VIS-Spektren wurden auf einem Cary 100 Spektrometer der Fa. Varian gemessen.

Die FT-IR-Spektren wurden mit den Spektrometern IFS 88 und Vektor 22 der Fa. Bruker aufgenommen. Die Intensitäten der Absorptionsbanden werden wie folgt abgekürzt: s = stark, m = mittel, w = schwach, br = breite Absorptionsbande.

Die GCMS-Messungen wurden mit einem Gaschromatograph 6890 gekoppelt mit einem Massendetektor 5973 von Hewlett-Packard ausgestattet mit einer Kapillarsäule HP-5TA (0.33

μm , 25m x 0.2 mm ID) durchgeführt. Das Temperaturprogramm hielt 3 min 80 °C und heizte anschließend über 17 min auf 240 °C.

Für die analytische HPL-Chromatographie wurde eine analytische HPLC-Anlage 1100 Series der Fa. Agilent eingesetzt. Der verwendete Gradient begann bei 10% Acetonitril und steigerte sich in 15 min auf 90% Acetonitril. Nach 3 min wurde der Anteil auf 100% erhöht und die Säule 5 min gespült. Anschließend wurde die Säule 2 min lang mit 10% Acetonitril konditioniert. Zu jeder Zeit wurde ein Anteil von 0.1% TFA v/v in Wasser am Lösungsmittelgemisch gehalten.

Die präparative HPL-Chromatographie wurde an einer Varian Pro Star Anlage mit einem Varian Detektor Modell 340 und einer präparativen HPLC-Anlage Agilent 1100 Series durchgeführt.

Das verwendete Säulenmaterial (C4, C18, C18PPN) ist jeweils angegeben.

Die HPLC-MS-Messungen wurden mit einer HPLC-Anlage 1100 Series von Hewlett-Packard und einem Finnigan LCQ ESI-Spektrometer durchgeführt. Das verwendete Säulenmaterial ist jeweils angegeben.

Die Schmelzpunkte wurden mit einer Schmelzpunktmessapparatur Büchi 530 oder 540 gemessen und sind unkorrigiert.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden beschichtete Aluminiumplatten mit Kieselgel 60_{F254} der Firma Merck verwendet. Laufmittel und R_f -Werte sind bei den Substanzen angegeben.

Die Substanzen wurden wie folgt detektiert:

- Reagenz A: 12 g Molybdätophosphorsäure in 250 ml Ethanol
- Reagenz B: 0.5%ige Lösung von KMnO_4 in Wasser
- Reagenz C: 300 mg Ninhydrin, 3 ml Essigsäure und 997 ml Ethanol
- UV-Licht (254 nm)

Die Flashchromatographie^[151] erfolgte mit Flash-Kieselgel (Korngröße 40-64 μm) der Fa. Merck in geschlossenen Säulen mit einem Überdruck von 0.5 bis 1.0 bar. Dabei wurde das 70-100fache des Gewichts des Rohprodukts an Trennmittel eingesetzt.

Alle Chemikalien wurden bei den Firmen Acros, Aldrich, Avocado, Biosolve, Fluka und Lancaster erworben. Die polymeren Träger wurden von den Firmen Novabiochem und Advanced Chemtech bezogen. Mit Ausnahme von DMF, DMA und NMP wurden alle verwendeten Lösungsmittel vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf absolutiert.^[152] Absolutes DMF wurde von der Fa. Fluka erworben.

5.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV1: Beladung von Wang-PS-Harz mit Iodbenzoesäure

Eine Lösung von 10 Äquivalenten Iodbenzoesäure in 20 ml DMF wird auf 0 °C gekühlt. Nach Zusatz von 5 Äquivalenten *N,N'*-Di-*iso*-propylcarbodiimid wird die Reaktionsmischung bei 0 °C gerührt. Nach 20 min wird die Reaktionsmischung mit 0.5 Äquivalenten DMAP zu einer Suspension von 1 Äquivalent Wang-PS-Harz in 4 ml DMF gegeben.

Die Suspension wird über Nacht im Wasserbad bei 50 °C geschüttelt. Anschließend wird das Harz zweimal mit je 5 ml DMF, dreimal mit je 5 ml CH₂Cl₂ und anschließend mit je 5 ml MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen. Das Harz wird am HV über Nacht getrocknet.

AAV2: Abspaltung von Wang-PS-Harz

Die Abspaltung vom Wang Linker erfolgt mit 90% TFA in CH₂Cl₂. Das Harz wird dreimal in Abspalllösung suspendiert und 5 min durchmischt. Die überstehende Lösung wird filtriert und in MeOH aufgenommen. Anschließend wird das Harz noch einmal in Abspalllösung suspendiert und 30 min am Orbitalschüttler durchmischt. Das Harz wird dreimal mit je 5 ml CH₂Cl₂ und nacheinander mit je 5 ml MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen. Das Filtrat wird mit Toluol versetzt und zur Trockene eingengt.

AAV3: Herstellung von Arylketonen an der festen Phase

a) Magnesiumbromid-Iod-Austausch und Herstellung des Ketons

Aus 25 Äquivalenten Magnesiumspänen und 25 Äquivalenten 2-Brompropan in wasserfreiem THF wird eine 0.7 M Lösung von *iso*-Propylmagnesiumbromid hergestellt. Eine Suspension von 1 Äquivalent Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz in wenig wasserfreiem THF wird im *iso*-Propanolbad auf -35 °C gekühlt (Kryostat). Die *iso*-Propylmagnesiumbromid-Lösung wird zum Harz gegeben und das Gemisch bei -35 °C durch vorsichtiges Rühren durchmischt. Nach 2 h werden 25 Äquivalente 1 M CuCN*2LiCl in wasserfreiem THF zugegeben und das Gemisch auf -40 °C gekühlt. Nach weiteren 5 min wird eine Lösung von 30 Äquivalente Säurechlorid in wenig wasserfreiem THF zugegeben, die Reaktionsmischung auf -35 °C aufgetaut und bei dieser Temperatur vorsichtig gerührt. Durch Zugabe von MeOH wird die Reaktion nach 2 h abgefangen. Das Harz wird zweimal mit je 5 ml DMF, dreimal mit je 5 ml CH₂Cl₂ und abwechselnd mit je 5 ml MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen. Anschließend wird das Harz am HV getrocknet.

b) Herstellung des Säurechlorids

Eine Suspension aus 30 Äquivalente der entsprechenden Säure in CH_2Cl_2 wird mit 3 Tropfen DMF und 31.5 Äquivalente Oxalylchlorid versetzt. Das Gemisch wird eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und das überstehende Lösungsmittel anschließend abdestilliert. Der Rückstand wird in wenig THF gelöst.

AAV4: Heck Olefinierung von 4-Chlor-3-nitrobenzoesäurederivaten

Eine Suspension von 1 Äquivalent festphasengebundenem 4-Chlor-3-nitrobenzoylderivat in DMA wird mit 1 Äquivalent Tetrabutylammoniumbromid und 3 Äquivalent Natriumacetat 20 min im Ultraschallbad mit Argon entgast. Dazu werden 0.05 Äquivalente Palladium(II)acetat und 12 Äquivalente Acrylat gegeben. Das Gemisch wird 24 h vorsichtig bei 100 °C gerührt. Anschließend wird das Harz mit 5 ml DMF, zweimal mit je 5 ml DMF:H₂O 6:1, zweimal mit je 5 ml DMF, dreimal mit je 5 ml CH_2Cl_2 und nacheinander mit je 5 ml MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen. Das Produkt wird am HV getrocknet.

AAV5: Reduktion von festphasengebundenen Nitroaromaten

Der festphasengebundene Nitroaromat wird in 2 M $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in NMP oder DMF suspendiert und über Nacht im Wasserbad bei 50 °C geschüttelt. Anschließend wird das Harz zweimal mit je 5 ml DMF, dreimal mit je 5 ml CH_2Cl_2 und nacheinander mit je 5 ml MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen. Das Harz wird am HV über Nacht getrocknet.

AAV6: Herstellung von Allylthioharnstoffen

Eine 0.2 M Lösung von 1 Äquivalente Amidinhydrochlorid bzw. Thioureidoniumchlorid in DMF wird auf 0 °C (Eisbad) gekühlt. Nacheinander werden zur Lösung 1.05 Äquivalente Allylisothiocyanat und 1.05 Äquivalente DBU gegeben. Das Eisbad wird entfernt und das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels DC. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 N Salzsäure abgefangen und die Reaktionsmischung in EtOAc/Eiswasser aufgenommen. Die wässrige Phase wird dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wird dreimal mit EtOAc rückextrahiert. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, zur Trockene eingengt, das verbleibende DMF wird am HV abdestilliert und der Rückstand am HV getrocknet.

AAV7: Herstellung von Allylaminothiazolylderivaten

Eine Suspension von 1 Äquivalent α -Bromcarbonylderivat an Wang-PS-Harz in wenig DMF wird mit 5 Äquivalenten 0.2 M 1-Allyl-3-iminomethylthioharnstoff in DMF versetzt. Dazu werden 5 Äquivalent DBU gegeben. Die Suspension wird über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Harz wird dreimal mit je 5 ml DMF, dreimal mit je 5 ml CH_2Cl_2 und nacheinander mit je 5 ml MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen. Die festphasengebundenen Allylaminothiazolylderivate werden über Nacht am HV getrocknet.

AAV8: Beladung von bromiertem Phenacyl PS- Harz

Eine 0.5 M Lösung von 3 Äquivalent Säure, 0.3 Äquivalent Cäsiumiodid und 3 Äquivalent DIPEA in wasserfreiem DMF wird zu einer Suspension von 1 Äquivalent bromiertem Phenacyl PS Harz gegeben und das Gemisch über Nacht geschüttelt. Anschließend wird das Harz zweimal mit je 5 ml DMF, dreimal mit je 5 ml CH_2Cl_2 und nacheinander mit je 5 ml MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen. Die immobilisierte Säure wird am HV getrocknet.

AAV9: Beladung von Hydroxyethyl Photolinker PS Harz

Eine Lösung von 5 Äquivalent Säure in einem Gemisch von Dichlormethan und Tetrahydrofuran wird nacheinander mit 3.75 Äquivalenten Methylimidazol und 5 Äquivalenten MSNT versetzt. Nach einigen Minuten wird das Reaktionsgemisch zu 1 Äquivalent *o*-Nitroveratryl PS Harz gegeben, das zuvor zweimal mit CH_2Cl_2 gewaschen wurde, und das Gemisch bei Raumtemperatur 2 h geschüttelt. Das Harz wird dreimal mit je 5 ml CH_2Cl_2 , dreimal mit je 5 ml DMF und nacheinander mit je 5 ml CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen. Das Produkt wird am HV getrocknet.

AAV10: Suzuki-Kupplung von Iodbenzoesäure

Eine Suspension aus 1 Äquivalent festphasengebundener Iodbenzoesäure, 2.5 Äquivalenten $\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ und 10 Äquivalenten Boronsäure in DMF:H₂O 6:1 wird 20 min am Ultraschallbad mit Argon entgast. Nach Zugabe von 0.05 Äquivalenten Tetrakis(triphenylphosphin)palladium wird das Gemisch 24 h bei 80 °C vorsichtig gerührt. Anschließend wird das Heizbad entfernt und das Harz mit 5 ml DMF, zweimal mit je 5 ml DMF:H₂O 6:1, zweimal mit je 5 ml DMF, dreimal mit je 5 ml CH_2Cl_2 und nacheinander mit je 5 ml MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen. Das Produkt wird am HV getrocknet.

5.3 Colorimetrische Verfahren zur Reaktionskontrolle

Bestimmung der Beladung durch die Fmoc- Methode^[98]

Eine Suspension von 1.50 mg Harz in 3.00 ml 20% Piperidin in DMF wird 15 min bei RT geschüttelt. Anschließend werden zweimal je 1.00 ml der überstehenden Lösung mit weiteren 2.00 ml 20% Piperidin in DMF verdünnt. Im UV-Spektrometer wird in einer 1.00 cm Küvette die Absorption bei 301 nm gemessen. Mit einem Extinktionsfaktor ϵ von 780 errechnet sich die Konzentration des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes wie folgt:

$$c_v = \frac{A_1 \cdot 10^3}{\epsilon \cdot d} = \frac{A_1 \cdot 10^3}{7800}$$

Mit dem Gesamtvolumen $V = 9$ ml und der eingewogenen Masse m des Harzes ergibt sich dann die Beladung:

$$c_b = \frac{c_v \cdot V}{m} = \frac{A_1 \cdot 10^3 \cdot 9}{7800 \cdot m}$$

Kaiser Test^[36]

Einige Harzkügelchen werden in einem Reagenzglas mit je 2 Tropfen 5% (w/v) Ninhydrin in Ethanol, 80% (w/v) Phenol in Ethanol und 20 μ M KCN in 2% H₂O in Pyridin versetzt. Die Suspension wird ca. 10 bis 20 s erhitzt (Heatgun). Eine blau-violette Färbung der Harzkügelchen zeigt freie Aminogruppen an.

Colorimetrischer Nachweis von freien OH-Gruppen am polymeren Träger^[145]

In einem Spritzenreaktor werden einige Harzkügelchen (ca. 2 mg) in 0.2 ml 10% TEA in CH₂Cl₂ suspendiert. Dazu werden 100 μ l Diphenyldichlorsilan gegeben und das Reaktionsgemisch 10 min bei RT geschüttelt. Die überstehende Lösung wird abfiltriert und das Harz zweimal mit je 1 ml 10% TEA in CH₂Cl₂ gewaschen. Anschließend wird das Harz in 300 μ l 0.75% (w/V) Methylrot in DMF suspendiert und 10 min bei RT geschüttelt. Das Harz wird mehrmals mit DMF und CH₂Cl₂ gewaschen, bis die überstehende Lösung farblos bleibt. Bleibt das Harz nach der Wäsche gelborange/ rot gefärbt, befinden sich freie Hydroxylgruppen am polymeren Träger.

Bestimmung der Beladung von Aldehyd-Harzen (DNPH-Methode)^[7]

Zunächst werden 100 ml Maßlösung aus 100 mg (505 μmol) 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) in THF hergestellt. Die Absorption A_0 bei 350 nm der zehnfach verdünnten Maßlösung wird in einer 1 mm Quarz-Küvette gemessen.

Eine Suspension von ca. 20 mg festphasengebundenem Aldehyd mit 10 ml Maßlösung wird mit 5 Tropfen TFA 2 h bei RT geschüttelt. Wiederum wird ein Teil der überstehenden Lösung auf das zehnfache verdünnt und die UV-Absorption A_1 bei 350 nm in einer 1 mm Küvette gemessen.

Die Beladung errechnet sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes wie folgt:

$$c_1 = c_0 \cdot \frac{A_1}{A_0}$$

und damit gilt mit $V=1000$, $m=20.0$ mg und $c_0=504.7$ nmol/ml:

$$c_B = \frac{V \cdot c_0}{m} \cdot \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) = 2.524 \cdot \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right)$$

5.4 Versuche zu Kapitel 3.1

5.4.1 Versuche zu Kapitel 3.1.2

3-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz 17

Die Herstellung erfolgt nach **AAV1** mit 2.00 g (2.40 mmol) Wang-PS-Harz, 6.09 g (24.06 mol, 10.0 eq) 3-Iodbenzoesäure, 1.86 ml (12.012 mmol, 5.0 eq) DIC, 147.3 mg (1.206 mmol, 0.5 eq) DMAP und 20 ml DMF.

Isol. Mat.: 3.39 g weißes Harz

IR[cm⁻¹]: 3100-2800 (s, br), 1944 (m), 1876 (m), 1802 (m), 1742 (s), 1602 (s), 1565 (s), 1495 (s), 1455 (s), 1375 (s), 1291 (s), 1177 (s), 1120 (s), 905 (s), 823 (s), 708 (s), 674 (m), 646 (w), 635 (w).

4-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz 18

Die Herstellung erfolgt nach **AAV1** mit 2.38 g (2.86 mmol) Wang-PS-Harz, 6.95 g (27.2 mmol, 9.5 eq) 4-Iodbenzoesäure, 2.2 ml (14.2 mmol, 5.0 eq) DIC, 177.7 mg (1.45 mmol, 0.5 eq) DMAP und 50 ml DMF.

Isol. Mat.: 3.55 g weißes Harz

IR[cm⁻¹]: 3100-2800 (s, br), 1930 (m), 1873 (m), 1799 (s), 1726 (s), 1585 (s), 1479 (s), 1392 (s), 1277 (s), 1178 (s), 1110 (s), 1027 (s), 964 (s), 827 (s), 709 (m), 681 (m), 626 (w).

3-(3',4'-Dinitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 19b

Gemäß **AAV3a** wird eine *iso*-Propylmagnesiumbromid-Lösung aus 632 mg (26.0 mmol, 28 eq) Magnesiumspänen und 2.44 ml (26.0 mmol, 28 eq) 2-Brompropan in 37 ml wasserfreiem THF bereitet. Eine Suspension von 1.00 g (943 µmol) 3-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz **17** in 7 ml wasserfreiem THF wird bei -35 °C mit der *iso*-Propylmagnesiumbromid-Lösung versetzt. Nach Zusatz von 26 ml (26 mmol, 28 eq) 1 M CuCN*2LiCl in wasserfreiem THF wird das nach **AAV3b** aus 6.63 g (31.3 mmol, 33 eq) 3,4-Dinitrobenzoesäure und 2.87 ml (32.9 mmol, 35 eq) Oxalylchlorid in 25 ml CH₂Cl₂ hergestellte Säurechlorid in 3 ml wasserfreiem THF zum Harz gegeben.

Isol. Mat.: 918 mg gelbbraunes Harz
Beladung: 0.55 mmol/g (laut Elementaranalyse)
IR[cm⁻¹]: starke Bande bei 1735 (C=O) und 1556 (NO₂);
3100-2800 (s, br), 1944 (m), 1879 (m), 1802 (m), 1735 (s), 1617 (s), 1556 (s),
1516 (s), 1456 (s), 1373 (s), 1178 (m), 1116 (m), 1029 (m), 927 (m), 847 (m),
770 (m), 707 (m), 621 (w).

Die Abspaltung erfolgt gemäß **AAV2** von 197 mg Harz und insgesamt 10 ml TFA: CH₂Cl₂: DMS 90:10:1.

Isol. Mat. (roh): 100 mg gelbbraunes Öl
LCMS(C18): R_t 15.13 min, 315.0 [M-H]⁻, 85% (215 nm)

4-(3',4'-Dinitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 19a

Gemäß **AAV3a** wird eine *iso*-Propylmagnesiumbromid-Lösung aus 412 mg (16.9 mmol, 28 eq) Magnesiumspänen, 1.59 ml (16.9 mmol, 28 eq) 2-Brompropan in 24 ml wasserfreiem THF bereitet. Eine Suspension von 650 mg (611 µmol) 4-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz **18** in 5 ml wasserfreiem THF wird bei -35 °C mit der *iso*-Propylmagnesiumbromid-Lösung versetzt. Nach Zusatz von 17 ml (17 mmol, 28 eq) 1 M CuCN*2LiCl in wasserfreiem THF wird das nach **AAV3b** aus 4.32 g (20.34 mmol, 33 eq) 3,4-Dinitrobenzoesäure und 1.81 ml (21.4 mmol, 35 eq) Oxalylchlorid in 30 ml CH₂Cl₂ hergestellte Säurechlorid in 3 ml wasserfreiem THF zum Harz gegeben.

Isol. Mat.: 481 mg orangebraunes Harz
Beladung: 0.46 mmol/g (laut Elementaranalyse)
IR[cm⁻¹]: starke Bande bei 1733 (C=O) und 1556 (NO₂);
3100-2800 (s, br), 1943 (m), 1875 (m), 1801 (m), 1733 (s), 1603 (s), 1556 (s),
1506 (s), 1456 (s), 1374 (s), 1177 (m), 1113 (m), 1028 (m), 907 (m), 822 (m),
708 (m).

Die Abspaltung erfolgt nach **AAV2** von 102 mg Harz mit insgesamt 8 ml TFA: CH₂Cl₂: TIPS 90:10:1.

Isol. Mat.(Rohprodukt): 9.6 mg gelbes Öl
LCMS(C18): R_t 15.03 min, 315.0 [M-H]⁻, 88%

¹H-NMR[400 MHz, CD₃OD] (Rohprodukt): δ = 7.99 (d, J= 8.3 Hz, 2H, arom. H), 8.43 (d, J=8.3 Hz, 2H, arom. H), 8.61 (s, 1H, arom. H), 8.89 (br, 1H, arom. H), 9.10 (br, 1H, arom. H).

3-(3'-Nitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 22b

Gemäß AAV3a wird eine *iso*-Propylmagnesiumbromid-Lösung aus 608 mg (25.0 mmol, 27 eq) Magnesiumspänen, 2.35 ml (25.0 mmol, 27 eq) 2-Brompropan in 35 ml wasserfreiem THF bereitet. Eine Suspension von 1.00 g (942 μmol) 3-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz 17 in 7 ml wasserfreiem THF wird bei -35 °C mit der *iso*-Propylmagnesiumbromid-Lösung versetzt. Nach Zusatz von 25 ml (25 mmol, 27 eq) 1 M CuCN*2LiCl in wasserfreiem THF wird das nach AAV3b aus 5.02 g (30.0 mmol, 32 eq) 3-Nitrobenzoesäure und 2.71 ml (31.9 mmol, 34 eq) Oxalylchlorid in 35 ml CH₂Cl₂ hergestellte Säurechlorid in 7 ml wasserfreiem THF zum Harz gegeben.

Isol. Mat.: 941 mg hellgelbes Harz

Beladung: 0.45 mmol/g (lt. Elementaranalyse)

IR[cm⁻¹]: starke Bande bei 1746 (C=O) und 1507 (NO₂);
3100-2800 (br, s), 1945 (m), 1875 (m), 1746 (s), 1604 (s), 1507 (s), 1376 (s),
1177 (s), 909 (m), 822 (m), 709 (m), 636 (m).

4-(3'-Nitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 22a

Gemäß AAV3a wird eine *iso*-Propylmagnesiumbromid-Lösung aus 609.1 mg (25.06 mmol, 27 eq) Magnesiumspänen, 2.35 ml (25.03 mmol, 27 eq) 2-Brompropan in 35 ml wasserfreiem THF bereitet. Eine Suspension von 1.00 g (943 μmol) 4-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz in 5 ml wasserfreiem THF wird bei -35 °C mit der *iso*-Propylmagnesiumbromid-Lösung versetzt. Nach Zusatz von 25 ml (25 mmol, 27 eq) 1 M CuCN*2LiCl in wasserfreiem THF wird das nach AAV3b aus 5.02 g (30.1 mmol, 32 eq) 3,4-Dinitrobenzoesäure und 2.71 ml (31.9 mmol, 34 eq) Oxalylchlorid in 30 ml CH₂Cl₂ hergestellte Säurechlorid in 3 ml wasserfreiem THF zum Harz gegeben.

Isol. Mat.: 783 mg gelbes Harz

Beladung: 0.48 mmol/g (lt. Elementaranalyse)

IR[cm⁻¹]: starke Bande bei 1738 (C=O) und 1507 (NO₂);
3100-2800 (br,s), 1944 (m), 1877 (m), 1738 (s), 1612 (s), 1507 (s), 1376 (s),
1176 (s), 953 (m), 823 (m).

3-(3',4'-Diaminobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 20b

Gemäß **AAV5** wird eine Suspension von 432 mg (194 μmol) 3-(3',4'-Dinitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz in 10 ml 2 M $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in NMP umgesetzt.

Isol. Mat.: 415 mg schwach gelbes Harz

IR[cm^{-1}]: deutliche Absorptionsbande um 3365 cm^{-1} (NH_2 -Gruppen), fehlende Bande bei ca. 1545 cm^{-1} (Nitrogruppen);
3500-3200 (s, br), 3100-2800 (s, br), 1944 (m), 1876 (m), 1802 (m), 1731 (s),
1603 (s), 1504 (s), 1456 (s), 1378 (m), 1112 (m), 906 (m), 821 (m), 605 (w).

4-(3',4'-Diaminobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 20a

Gemäß **AAV5** wird eine Suspension von 480 mg (223 μmol) 4-(3',4'-Dinitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz in 5 ml 2 M $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in NMP umgesetzt.

Isol. Mat.: 460 mg orangefarbenes Harz

IR[cm^{-1}]: deutliche Absorptionsbande um 3367 cm^{-1} (NH_2 -Gruppen), fehlende Bande bei ca. 1545 cm^{-1} (Nitrogruppen);
3550-3200 (s, br), 3100-2800 (s, br), 1944 (m), 1876 (m), 1802 (m), 1735 (s),
1617 (s), 1509 (s), 1456 (s), 1375 (m), 1116 (m), 821 (w), 768 (w).

Die Abspaltung erfolgt gemäß **AAV2** von 134 mg Harz mit insgesamt 10 ml TFA: CH_2Cl_2 9:1 und 1% TIPS. Das braune, zähflüssige Rohprodukt wird mittels Sepac-Kartuschen und präparativer HPLC (C18) aufgereinigt.

Isol. Mat.: 1.2 mg (4.7 μmol , 8%) schwach gelber Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_3OD]: $\delta = 7.00$ (d, $J = 8.6 \text{ Hz}$, 1H, arom. H), 7.23 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H, arom. H), 7.45 (s, 1H, arom. H), 7.85 (d, $J = 14.1 \text{ Hz}$, 2H, arom. H), 8.18 (d, $J = 13.2 \text{ Hz}$, 2H, arom. H).

FAB-MS (3-NBA): 257.2 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$

3-(3'-Aminobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 24

Gemäß **AAV5** wird eine Suspension von 359 mg (165 μmol) 3-(3'-Nitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz in 6.5 ml 2 M $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in NMP umgesetzt.

Isol. Mat.: 347 mg beigefarbenes Harz

IR[cm⁻¹): scharfe Absorptionsbanden bei 3740 und 3378 cm⁻¹ (NH₂-Gruppe), fehlende Bande bei ca. 1535 cm⁻¹ (Nitrogruppe);
3470 (s), 3378 (s), 3100-2800 (s, br), 1945 (m), 1875 (m), 1803 (m), 1738 (s), 1604 (s), 1494 (s), 1456 (s), 1375 (s), 1321 (s), 1244 (s), 1176 (s), 1107 (m), 1030 (m), 960 (m), 907 (m), 823 (m), 768 (m).

4-(3'-Aminobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 23

Gemäß **AAV5** wird eine Suspension von 179 mg (82.4 μmol) 4-(3'-Nitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz in 5 ml 2 M SnCl₂*2H₂O in NMP umgesetzt.

Isol. Mat.: 166 mg gelbes Harz

IR[cm⁻¹): scharfe Absorptionsbanden bei 3469 und 3377 cm⁻¹ (NH₂-Gruppe), fehlende Bande bei ca. 1535 cm⁻¹ (Nitrogruppe);
3469 (s), 3378 (s), 3100-2800 (s, br), 1944 (m), 1877 (m), 1734 (s), 1612 (s), 1516 (s), 1116 (s), 829 (m), 708 (m).

5.4.2 Versuche zu Kapitel 3.1.3

3-[3'-(N-Diethylphosphonoacetyl)-aminobenzoyl]-benzoesäure an Wang-PS-Harz

Eine Lösung von 366 mg (1.83 mmol, 10.8 eq) Diethylphosphonoessigsäure in 3 ml wasserfreiem CH₂Cl₂ und 3 Tropfen DMF wird mit 0.17 ml (1.98 mmol, 11.8 eq) Oxalylchlorid versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei RT gerührt, bis die Gasentwicklung aufgehört hat.

Gleichzeitig werden 360 mg (168 μmol) 3-(3'-Aminobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz in 2 ml CH₂Cl₂ vorgequellert. Das Säurechlorid wird zusammen mit 4.9 mg (40 μmol, 0.2 eq) DMAP zum Harz gegeben. Das Gemisch wird über Nacht geschüttelt. Darauf wird das Harz nacheinander mit je 3 ml CH₂Cl₂, zweimal mit DMF, dreimal mit CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen und am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 298 mg beigefarbenes Harz

IR[cm⁻¹): keine deutliche NH₂-Absorptionsbande mehr;
3100-2800 (s, br), 1944 (m), 1876 (m), 1803 (m), 1731 (s), 1609 (s), 1493 (s), 1452 (s), 1374 (s), 1241 (s), 1176 (s), 1109 (s), 1029 (s), 964 (s), 907 (s), 825 (s), 767 (s), 707 (s), 670 (s), 633 (m).

Die Abspaltung erfolgt gemäß **AAV2** mit insgesamt 12 ml TFA: CH₂Cl₂: Wasser 90:10:1.

Isol. Mat. (Rohprodukt): 60.3 mg gelbes Öl

HPLC(C18): R_t 8.49 min, 61% (215 nm)

LCMS(C18): R_t 9.49 min, 420.1 [M+H]⁺/ 418.3 [M-H]⁻

4-(3-Nitrobenzoyl)-benzoesäure an HMPA PEGA-Harz 28

Eine Suspension von 1.11 g (66 µmol) Aminomethyl PEGA-Harz in wenig DMF wird mit einer voraktivierten Lösung von 65.0 mg (357 µmol, 5.4 eq) 4-Hydroxymethylphenoxyessigsäure, 70.7 mg (462 µmol, 7.0 eq) HOBt, 123.0 mg (324 µmol, 4.9 eq) HBTU und 56.5 µl (330 µmol, 5.0 eq) DIPEA in 2.5 ml DMF versetzt. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht am Orbitalschüttler durchmischt. Das Harz wird anschließend dreimal mit je 3 ml DMF und CH₂Cl₂ und danach mit MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen.

Kaiser Test: negativ

Methylrot-Test: positiv

Das Harz wird ohne weitere Behandlung weiter umgesetzt. Eine Lösung von 173 mg (682 µmol, 10.3 eq) 4-Iodbenzoesäure wird mit 51.1 µl (330 µmol, 5 eq) DIC bei 0 °C versetzt. Gleichzeitig wird das Harz je dreimal mit 3 ml wasserfreiem CH₂Cl₂ und DMF gewaschen. Nach 20 min wird die bereitete Anhydrid-Lösung mit 5.0 mg (40.9 µmol, 0.6 eq) DMAP zum Harz gegeben. Das Gemisch wird über Nacht bei 50 °C im Wasserbad geschüttelt. Das Harz wird je dreimal mit 3 ml DMF und CH₂Cl₂ und nacheinander mit MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen.

Methylrot-Test: negativ

Das Harz wird jeweils viermal mit je 5 ml wasserfreiem DMF und wasserfreiem THF gewaschen und in wenig wasserfreiem THF suspendiert. Die Suspension wird auf -35 °C gekühlt. Nach **AAV3a** wird eine 0.7 M *iso*-Propylmagnesiumbromid Lösung aus 80.4 mg (3.308 mmol, 50 eq) Magnesiumspänen und 0.31 ml (3.30 mmol, 50 eq) 2-Brompropan bereitet und zum Harz gegeben. Nach 2 h werden 3.3 ml (3.30 mmol, 50 eq) 1 M CuCN*2LiCl in wasserfreiem THF zugegeben und nach weiteren 5 min das zuvor gemäß **AAV3b** aus 671 mg (3.97 mmol, 60 eq) 3-Nitrobenzoesäure, 0.36 ml (4.19 mmol, 63.5 eq) Oxalylchlorid und wenigen Tropfen DMF in 10 ml CH₂Cl₂ hergestellte Säurechlorid in 6 ml wasserfreiem THF zugetropft. Nach weiteren 2 h wird die Reaktion mit 5 ml MeOH abgefangen und dreimal mit je 4 ml DMF und CH₂Cl₂ sowie nacheinander mit MeOH und

CH₂Cl₂ gewaschen. Nach **AAV2** wird das Produkt mit insgesamt 8 ml 90% TFA in CH₂Cl₂ abgespalten.

Isol. Mat. (Rohprodukt): 25.8 mg braunes Öl
LCMS(C18): r_t 6.81, 270.1 [M-H]⁻, 81% (210 nm)

4-[3-(2-Diethylphosphonoacetyl)-aminobenzoyl]-benzoesäure an HMPA PEGA-Harz 31

Nach **AAV5** wird eine Suspension von 1.07 g (62.1 μmol) 4-(3'-Nitrobenzoyl)-benzoesäure an HMPA PEGA-Harz in 3 ml 2 M SnCl₂·2H₂O in NMP umgesetzt. Nach der Aufarbeitung wird das Harz ohne weitere Charakterisierung acyliert. Dafür wird es dreimal mit je 3 ml wasserfreiem DMF und CH₂Cl₂ unter Argon gewaschen und in wenig wasserfreiem CH₂Cl₂ suspendiert. Gleichzeitig wird eine Lösung von 151.6 mg (757.5 μmol, 12 eq) Diethylphosphonoessigsäure in 3 ml wasserfreiem CH₂Cl₂ mit wenigen Tropfen DMF und 70 μl (815.1 μmol, 13 eq) Oxalylchlorid versetzt. Nachdem die Gasentwicklung aufgehört hat, wird das Reaktionsgemisch mit 4.2 mg (34.4 μmol, 0.5 eq) DMAP zur Harz-Suspension gegeben. Das Gemisch wird über Nacht bei RT am Orbitalschüttler durchmischt. Anschließend wird das Harz dreimal mit je 3 ml CH₂Cl₂, DMF, CH₂Cl₂ und dann mit MeOH, CH₂Cl₂ und DMF gewaschen.

³¹P-NMR[202.5 MHz, dmsd-d⁶]: δ= 21.46 (1P, -P(=O)(OEt)₂); außerdem ein schwaches Signal bei 23.32, wahrscheinlich auf Überacylierung des polymeren Trägers zurückzuführen.

4-[3-(2-Phosphonoacetylamino)benzoyl]-benzoesäure an HMPA PEGA-Harz 32

Eine Suspension von 408.9 mg (22.5 μmol) 4-[3-(2-Diethylphosphonoacetylamino)benzoyl]-benzoesäure an HMPA PEGA-Harz wird dreimal mit je 2.5 ml wasserfreiem DMF, dreimal mit je 2 ml wasserfreiem THF und dreimal mit je 2 ml wasserfreiem CH₂Cl₂ gewaschen. Das Harz wird in 3 ml wasserfreiem CH₂Cl₂ suspendiert und mit 0.1 ml (773 μmol, 35 eq) Trimethylsilylbromid versetzt. Das Gemisch wird 4 h bei RT durchmischt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 ml DMF:H₂O 1:1 abgefangen und das Harz mit 3 ml DMF:H₂O 1:1, jeweils dreimal mit je 3 ml DMF, THF:H₂O 5:1, THF und CH₂Cl₂ und dann mit MeOH und CH₂Cl₂ gewaschen.

³¹P-NMR[202.5 MHz, dmsd-d⁶]: δ= 15.32 (1P, -P(=O)(OH)₂)

5.4.3 Versuche zu Kapitel 3.1.4

Biphenyl-3-carbonsäure 35

Eine Suspension von 200 mg (188 μmol) 3-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz in 7 ml DMF:H₂O 6:1 wird mit 263 mg (2.16 mmol, 11 eq) Phenylboronsäure und 890 mg (4.19 mmol, 22 eq) Kaliumtriphosphat Monohydrat versetzt und 20 min mit Argon am Ultraschallbad entgast. Das Gemisch wird mit 4.8 mg (4.2 μmol , 0.02 eq) Pd(PPh₃)₄ versetzt und 24 h auf 80 °C erhitzt. Das Harz wird anschließend mit je 3 ml DMF:H₂O 1:1, zweimal mit DMF, CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂ und CyH gewaschen und am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 190 mg graues Harz

IR[cm⁻¹]: 3565 (m), 3100-2800 (s, br), 1945 (m), 1879 (m), 1803 (m), 1717 (s), 1614 (s), 1517 (m), 1456 (s), 1374 (s), 1307 (s), 1113 (m), 1047 (m), 906 (m), 832 (m), 762 (m), 706 (m), 616 (m).

Die Abspaltung erfolgt nach **AAV2** von 101 mg Harz mit insgesamt 9 ml TFA: CH₂Cl₂ 9:1. Das Rohprodukt wird mit Sepac-Kartuschen und präparativer HPLC augereinigt.

Isol. Mat.: 7.5 mg (37.9 μmol , 38% bezogen auf Herstellerangaben) weißer Feststoff

¹H-NMR[400 MHz, CD₃OD]: δ = 7.37 (t, J= 7.5 Hz, 1H, Phenyl), 7.46 (dd, J₁=J₂= 7.6 Hz, 2H, Phenyl), 7.54 (dd, J₁=J₂= 7.7 Hz, 1H, C(4)-H), 7.64 (d, J= 7.0 Hz, 2H, Phenyl), 7.83-7.85 (m, 1H, C(5)-H), 8.00 (dt, J₁= 7.9 Hz, J₂= 1.4 Hz, 1H, C(6)-H), 8.25 (dd, J₁=J₂= 1.7 Hz, 1H, C(2)-H).

LCMS (C18PPN): R_t= 20.25 min, 197.0 [M-H].

4-[2-Ethoxycarbonyl-1-(3-nitrophenyl)-vinyl]-benzoesäure an Wang-PS-Harz 34

Dreimal nacheinander werden 101 mg (46.6 μmol) 4-(3'-Nitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz in 2 ml Toluol suspendiert und das überstehende Lösungsmittel abdestilliert. Das Harz wird anschließend am HV über Nacht getrocknet.

Eine Lösung von 221 mg (949 μmol , 20 eq) Triethylphosphonsäureacetat in 2.5 ml wasserfreiem THF wird auf 0 °C gekühlt. Dazu werden 0.98 ml (980 μmol , 21 eq) 1 M NaHMDS in THF gegeben. Das Gemisch wird bei 0 °C 1 h gerührt. In der Zwischenzeit wird die 4-(3'-Nitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz unter Argon in wasserfreiem THF vorgequellert. Das Ylid wird bei 15 °C zum Harz gegeben und die Reaktion über Nacht bei 15 °C geführt.

Die Reaktion wird durch Zugabe von MeOH abgefangen und das Harz dreimal mit je 5 ml DMF, dreimal mit je 5 ml CH₂Cl₂ und einmal mit 5 ml MeOH gewaschen. Anschließend wird das Harz am HV über Nacht getrocknet.

Isol. Mat.: 88.9 mg braunes Harz

IR[cm⁻¹]: 3600-3200 (s, br), 3100-2800 (s, br), 2800-2650 (m), 1947 (m), 1877 (m), 1803 (m), 1733 (s), 1514 (s), 1108 (m), 836 (m).

Die Abspaltung erfolgt mit insgesamt 12 ml TFA:CH₂Cl₂:DMS 90:10:1 nach **AAV2**. Der Ethylester wird dabei zum Teil gespalten. Das Abspaltprodukt wird mit Sepac-Kartuschen und präparativer HPLC (C18) aufgereinigt. Dabei wird die freie Disäure isoliert.

Isol. Mat.: 2.7 mg (8.6 µmol, 21%) hellgelber Feststoff

¹H-NMR[400 MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: Es liegt ein 1:1 Gemisch aus cis/trans-Stereoisomeren vor; δ= 6.45 (s, 0.5H, R₂C=CH-COOH), 6.48 (s, 0.5H, R₂C=CH-COOH), 7.25-7.29 (m, 1H, arom. H), 7.49 (d, J= 7.9 Hz, 1H, arom. H), 7.52 (d, J= 14.6 Hz, 2H, arom. H), 7.80 (d, J= 8.2 Hz, 1H, arom. H), 7.97 (d, J= 6.6 Hz, 2H, arom. H), 8.15-8.17 (m, 1H, arom. H).

LCMS(C18PPN): R_t= 19.42 min, 312.2 [M-H]⁻.

5.4.4 Versuche zu Kapitel 3.1.5

5-Benzoyl-2-chlorpyridin^[84] 38

Eine Lösung von 1.12 g (6.36 mmol) 6-Chlornicotinoylchlorid Hydrochlorid in 30 ml Benzol p.a. werden unter Eiskühlung mit 2.13 g (16.00 mmol, 2.5 Äquivalenten) Aluminiumtrichlorid versetzt. Die Lösung wird unter Argon eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wird auf Eiswasser gegeben und mit 1 N Salzsäure angesäuert. Nach Zugabe von ca. 50 ml CH₂Cl₂ wird die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird nochmals mit ca. 50 ml CH₂Cl₂ extrahiert und die vereinigten organischen Phasen zweimal mit je 50 ml 1 N Natronlauge und einmal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden noch einmal mit 50 ml CH₂Cl₂ extrahiert, die vereinigten organischen Phasen dann über Na₂SO₄ getrocknet, das überstehende Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand am HV getrocknet. Das Produkt ist DC-rein, eine weitere Aufreinigung nicht notwendig.

Isol. Mat.: 900 mg (4.14 mmol, 65%) weißer Feststoff

GCMS: 217 [M]⁺

¹H-NMR[250 MHz, CDCl₃]: δ = 7.48-7.57 (m, 3H, Phenyl), 7.65-7.70 (m, 2H, Phenyl), 7.81 (d, J = 9.0 Hz, 1H, -C(5)-H), 8.11 (dd, J_1 = 8.9 Hz, J_2 = 3.5 Hz, 1H, -C(4)-H), 8.78 (d, J = 3.7 Hz, 1H, -C(2)-H).

Die Daten stimmen mit Lit.^[84] überein.

2-Amino-5-benzoylpyridin^[84] 36

Im 250 ml Glaseinsatz eines Autoklaven werden 125 mg (574 μ mol) 2-Chlor-5-benzoylpyridin vorgelegt und mit etwa 130 ml frisch kondensiertem Ammoniak versetzt. Der Autoklav wird sofort verschlossen und auf 100 °C erhitzt. Im Verlaufe der Reaktion steigt der Druck auf ca. 30 bar. Nach 24 h wird der Heizmantel entfernt und der Überdruck abgelassen. Der Rückstand wird in 50 ml 2.5 N Salzsäure aufgenommen und das Gemisch 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wird mit 50 ml EtOAc gewaschen und die organische Phase verworfen. Die wässrige Phase wird mit 1 N Natronlauge auf pH>11 gebracht und dreimal mit je 50 ml EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Das überstehende Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand am HV getrocknet. Eine weitere Reinigung des Produktes ist nicht notwendig.

Isol. Mat.: 58.0 mg (293 μ mol, 51%) gelblicher Feststoff

GCMS: 198 [M]⁺

¹H-NMR[250 MHz, CDCl₃]: δ = 4.92 (s, br, 2H, -NH₂), 6.58 (d, J =12.5 Hz, 1H, C(5)-H), 7.40-7.68 (m, 3H, Phenyl), 7.75 (d, J = 15 Hz, 2H, Phenyl), 8.02 (d, J = 12.5 Hz, 1H, C(4)-H), 8.56 (s, 1H, C(2)-H).

Die Daten stimmen mit Lit.^[84] überein.

6-Chlornicotinsäuremethylester 40

Eine Suspension von 1.00 g (6.35 mmol) 6-Chlornicotinsäure in 20 ml CH₂Cl₂ wird mit 42.1 mg (345 μ mol, 0.05 eq) DMAP, 1.3 ml (32.1 mmol, 5 eq) Methanol und 1.18 ml (7.62 mmol, 1.2 eq) DIC versetzt. Die Reaktion wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wird anschließend in 50 ml EtOAc und 50 ml 1 N Salzsäure aufgenommen, die organische Phase abgetrennt und verworfen. Die wässrige Phase wird mit ges. NaHCO₃-Lösung auf pH=7 eingestellt und dreimal mit je 50 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden nacheinander mit 50 ml ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-

Lösung gewaschen, die wässrige Phase mit zweimal 30 ml EtOAc rückextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Die Lösung wird mit ca. 1.5 g Kieselgel versetzt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert, der Rückstand wird durch Flashchromatographie (LM CyH:EtOAc 3:1) aufgereinigt.

Isol. Mat.: 878 mg (5.11 mmol, 81%) weißer Feststoff

Die spektroskopischen Daten stimmen mit Lit.^[153] überein.

6-Aminonicotinsäuremethylester 41

Zu einer Lösung von 85.6 mg (499 µmol) 6-Chlornicotinsäuremethylester in 4 ml wasserfreiem Toluol werden 0.05 ml (665 µmol, 1.3 eq) Allylamin sowie 0.70 ml (700 µmol, 1.4 eq) 1 M Kalium-*tert*-butoxid in THF und 58.0 mg (992 µmol, 2 eq) Natriumchlorid versetzt. Die Lösung wird 20 min mit Argon am Ultraschallbad entgast. Die entgaste Reaktionsmischung wird mit 90.8 mg (99.2 µmol, 0.2 eq) Pd₂dba₃*CHCl₃ und 156 mg (250 µmol, 0.5 eq) rac. BINAP versetzt. Das Gemisch wird zunächst 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 110 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach weiteren 2 h ist das Edukt vollständig umgesetzt (laut DC Kontrolle, LM H:EtOAc 2:1) und die Reaktion wird durch Zugabe von 5 ml ges. NaHCO₃-Lösung abgefangen. Nach Zugabe von je 20 ml EtOAc und 20 ml ges. NaHCO₃-Lösung wird die organische Phase abgetrennt und mit 20 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden zweimal mit je 30 ml EtOAc rückextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Das überstehende Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand am HV getrocknet. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie (LM H:EtOAc 1:1) gereinigt.

Isol. Mat.: 31.1 mg (204 µmol, 41%) weißer Feststoff

¹H-NMR[400 MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: δ = 3.99 (s, 3H, OCH₃), 6.74 (d, J=8.6 Hz, 1H, C(4)-H), 8.10 (d, J=8.6 Hz, 1H, C(3)-H), 8.79 (s, 1H, C(1)-H).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit Lit.^[154] überein.

3,4-Bis-*tert*-butylcarbonylaminobenzoessäure 15

Eine Lösung von 230 mg (1.51 mmol) 3,4-Diaminobenzoessäure in 3.5 ml wasserfreiem THF, 1.2 ml MeOH und 0.10 ml (583 µmol, 0.4 eq) DIPEA wird mit 750 mg (3.44 mmol, 2.2 eq) Di-*tert*-butyldicarbonat gegeben. Die Lösung wird unter Rückfluss erhitzt. Nach 3 h wird das Ölbad entfernt und das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wird in jeweils 50 ml

EtOAc und 10% Citronensäure_{aq} aufgenommen. Die wässrige Phase wird noch zweimal mit je 50 ml EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit je 50 ml 1N Salzsäure und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden mit 100 ml EtOAc rückextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand am HV getrocknet. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie (LM *n*-Hexan:EtOAc 3:1) aufgereinigt.

Isol. Mat.: 357 mg (1.01 mmol, 67%) weißer Feststoff

R_f: 0.60 (*n*-Hexan:EtOAc 2:1)

¹H-NMR[250 MHz, CD₃OD]: δ = 1.92 (s, 18H, -C(CH₃)₃), 7.85 (m, 2H, arom. H), 8.02 (s, 1H, arom. H).

3-(6'-Chlornicotinoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 39a

Gemäß **AAV3a** wird aus 316 mg (13.0 mmol, 29 eq) Magnesiumspänen, 1.23 ml (13.1 mmol, 29 eq) 2-Brompropan in 19 ml wasserfreiem THF eine *iso*-Propylmagnesiumbromid-Lösung bereitet. Eine Suspension von 472 mg (444 μmol) 3-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz **17** in 4 ml wasserfreiem THF wird bei -35 °C mit der *iso*-Propylmagnesiumbromid-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 13.1 ml (13.1 mmol, 29 eq) 1 M CuCN*2LiCl in wasserfreiem THF wird das nach **AAV3b** aus 2.43 g (15.4 mmol, 35 eq) 6-Chlornicotinsäure und 1.96 ml (23.2 mmol, 52 eq) Oxalylchlorid in 25 ml CH₂Cl₂ hergestellte Säurechlorid in 10 ml wasserfreiem THF zugetropft.

Isol. Mat.: 450 mg gelbliches Harz

Beladung: 0.71 mmol/ g (laut Elementaranalyse)

IR[cm⁻¹]: starke Bande bei 1747 (C=O);

3100-2800 (s, br), 1944 (m), 1875 (m), 1803 (m), 1745 (s), 1671 (s), 1614 (s), 1604 (s), 1557 (s), 1507 (s), 1456 (s), 1374 (s), 1315 (m), 1030 (m), 826 (m), 709 (m), 632 (w), 607 (w).

Die Abspaltung erfolgt gemäß **AAV2** von 184 mg Harz mit insgesamt 10 ml TFA:CH₂Cl₂:DMS 45:5:1. Das Rohprodukt wird mit Sepac Kartuschen und präparativer HPLC (C18) aufgereinigt.

Isol. Mat.: 7.3 mg (27.9 μmol, 21 % bezogen auf Herstellerangaben)

¹H-NMR[400 MHz, D₂O]: δ = 7.68 (d, J= 7.7 Hz, 1H, C(5')-H), 7.72 (d, J= 6.5 Hz, 1H, C(5)-H), 8.00 (d, J= 7.9 Hz, 1H, C(4)-H), 8.17 (dd, J₁= 2.5 Hz, J₂= 6.3 Hz, 1H,

C(6)-H), 8.22 (d, J= 7.5 Hz, 1H, C(4')-H), 8.25 (s, 1H, C(2)-H), 8.72 (d, J= 1.8 Hz, 1H, C(2')-H).

ESI-MS: 260.1 [M-H]⁻

MS (EI): 261 [M]⁺

HRMS (EI): für C₁₃H₈O₃NCl [M]⁺ ber.: 261.0193
gef.: 261.0187

4-(6'-Chlornicotinoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 39b

Gemäß **AAV3a** wird aus 190 mg (7.83 mmol, 28 eq) Magnesiumspänen, 0.74 ml (7.88 mmol, 28 eq) 2-Brompropan in 11.2 ml wasserfreiem THF eine *iso*-Propylmagnesiumbromid-Lösung bereitet. Eine Suspension von 301 mg (283 μmol) 3-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz in 2.5 ml wasserfreiem THF wird bei -35 °C mit der *iso*-Propylmagnesiumbromid-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 7.8 ml (7.8 mmol, 28 eq) 1 M CuCN*2LiCl in wasserfreiem THF wird das nach **AAV3b** aus 1.47 g (9.38 mmol, 33 eq) 6-Chlornicotinsäure und 1.56 ml (17.88 mmol, 63 eq) Oxalylchlorid in 15 ml CH₂Cl₂ hergestellte Säurechlorid in 6 ml wasserfreiem THF zugetropft.

Isol. Mat.: 269 mg gelbliches Harz

Beladung: 0.71 mmol/g (laut Elementaranalyse)

IR[cm⁻¹]: 3100-2800 (s, br), 1943 (m), 1872 (m), 1801 (m), 1733 (s), 1670 (s), 1611 (s), 1516 (s), 1457 (s), 1375 (s), 1260 (s), 1122 (s), 1018 (m), 926 (m), 831 (m), 764 (m), 707 (m).

3-(4'-Chlor-3'-nitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 47b

Gemäß **AAV3a** wird aus 608 mg (25.0 mmol, 27 eq) Magnesiumspänen, 2.35 ml (25.0 mmol, 27 eq) 2-Brompropan in 35 ml wasserfreiem THF eine *iso*-Propylmagnesiumbromid-Lösung bereitet. Eine Suspension von 1.00 g (948 μmol) 3-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz **17** in 7 ml wasserfreiem THF wird bei -35 °C mit der *iso*-Propylmagnesiumbromid-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 25 ml (25 mmol, 27 eq) 1 M CuCN*2 LiCl in wasserfreiem THF wird das aus 6.05 g (30.0 mmol, 32 eq) 4-Chlor-3-nitrobenzoesäure und 2.71 ml (31.93 mmol, 34 eq) Oxalylchlorid in 25 ml CH₂Cl₂ hergestellte Säurechlorid in 2 ml wasserfreiem THF zugetropft.

Isol. Mat.: 976 mg gelbes Harz

Beladung: 0.46 mmol/g (lt. Elementaranalyse)

IR[cm⁻¹]: starke Bande bei 1742 (C=O) und bei 1506 (NO₂);

3100-2800 (br,s), 1945 (m), 1877 (m), 1742 (s), 1604 (s), 1542 (s), 1506 (s), 1375 (s), 1178 (s), 908 (s), 823 (s), 708 (s), 634 (m).

Die Abspaltung von 200 mg Harz wird nach **AAV2** mit insgesamt 10 ml TFA:CH₂Cl₂:H₂O 90:10:1 durchgeführt. Das Rohprodukt wird mit Sepac Kartuschen und präparativer HPLC (C18) aufgereinigt.

Isol. Mat.: 8.6 mg (28.1 µmol, 17%) weißer Feststoff

¹H-NMR[400 MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: δ = 7.59 (dd, J₁=J₂= 7.9 Hz, 1H, C(5')-H), 7.67 (d, J= 8.4 Hz, 1H, C(5)-H), 7.90 (dd, J₁=2.0 Hz, J₂=8.3 Hz, 1H, C(4)-H), 7.93 (d, J= 7.6 Hz, 1H, C(6')-H), 8.24 (d, J= 1.9 Hz, 1H, C(6)-H), 8.28 (d, J= 7.8 Hz, 1H, C(2)-H), 8.35 (s, 1H, C(2')-H).

LCMS(C18): R_t 9.0 min, 304.1 [M-H]⁻

4-(4'-Chlor-3'-nitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 47a

Gemäß **AAV3a** wird aus 608 mg (25.0 mmol, 26 eq) Magnesiumspänen, 2.55 ml (25.0 mmol, 26 eq) 2-Brompropan in 35 ml wasserfreiem THF eine *iso*-Propylmagnesiumbromid-Lösung bereitet. Eine Suspension von 1.01 g (950 µmol) 4-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz in 6 ml wasserfreiem THF wird bei -35 °C mit der *iso*-Propylmagnesiumbromid-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 25 ml (25 mmol, 26 eq) 1 M CuCN*2LiCl in wasserfreiem THF wird das aus 6.05 g (30.01 mmol, 32 eq) 4-Chlor-3-nitrobenzoesäure und 2.71 ml (31.9 mmol, 34 eq) Oxalylchlorid in 30 ml CH₂Cl₂ hergestellte Säurechlorid in 6 ml wasserfreiem THF zugetropft.

Isol. Mat.: 788 mg gelbes Harz

Beladung: 0.45 mmol/g

IR[cm⁻¹]: starke Banden bei 1732 (C=O) und 1499 (NO₂);
3100-2850 (s, br), 1944 (m), 1877 (m), 1732 (s), 1607 (s), 1540 (s), 1499 (s), 1451 (s), 1376 (s), 1289 (s), 1243 (s), 1176 (s), 1114 (s), 1047 (m), 957 (s), 908 (s), 823 (s), 708 (s), 630 (w).

Die Abspaltung von 199 mg Harz erfolgt gemäß **AAV2** mit insgesamt 10 ml TFA:CH₂Cl₂:H₂O 90:10:1. Das Rohprodukt wird mit Sepac Kartuschen und präparativer HPLC (C18) aufgereinigt.

Isol. Mat.: 9.0 mg (29.4 µmol, 18%) weißer Feststoff

¹H-NMR[400 MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: δ = 7.71 (d, J= 8.3 Hz, 1H, C(5')-H), 7.75 (d, J=8.6 Hz, 2H, C(3)-H/ C(5)-H), 7.89 (dd, J₁=2.0 Hz, J₂= 8.4 Hz, 1H, C(6')-H), 8.13 (d, J= 8.5 Hz, 2H, C(2)-H/ C(6)-H), 8.22 (d, J= 1.9 Hz, 1H, C(2')-H).

LCMS: R_t 7.8 min, 304.1 [M-H]⁻

4-Chlor-3-nitrobenzoesäure an Wang-PS-Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV1** mit 520 mg (624 μmol) Wang-PS-Harz, 1.27 g (6.29 mmol, 10 eq) 4-Chlor-3-nitrobenzoesäure, 0.49 ml (3.16 mmol, 5.0 eq) DIC, 38.0 mg (311 μmol, 0.5 eq) DMAP und 10 ml DMF.

Isol. Mat.: 624.3 mg weißes Harz

IR[cm⁻¹]: 3100-2800 (s, br), 1944 (m), 1875 (m), 1803 (s), 1733 (s), 1604 (s), 1541 (s), 1508 (s), 1479 (s), 1455 (s), 1375 (s), 1244 (s), 1176 (s), 1154 (s), 1109 (s), 964 (s), 827 (m), 709 (m), 626 (w).

4-tert-Butyloxycarbonylvinyl-3-nitrobenzoesäure an Wang-PS-Harz

Eine Suspension von 201 mg (197 μmol) 4-Chlor-3-nitrobenzoesäure an Wang-PS-Harz in 4.5 ml DMA wird nach **AAV4** mit 49.1 mg (599 μmol, 3.0 eq) Natriumacetat, 66.6 mg (207 μmol, 1.05 eq) Tetrabutylammoniumbromid und 0.34 ml (2.36 mmol, 12.0 eq) *tert*-Butylacrylat umgesetzt.

Isol. Mat.: 190 mg schwarzes Harz

IR[cm⁻¹]: starke Bande bei 1731 (C=O) und schwache Bande bei 2650 (C=C); 3100-2850 (s, br), 2650 (w), 1943 (m), 1875 (m), 1805 (m), 1731 (s), 1614 (s), 1538 (s), 1506 (s), 1455 (s), 1372 (s), 1030 (m), 907 (m), 830 (m), 767 (m), 708 (m), 630 (w).

3-(4'-tert-Butyloxycarbonylvinylbenzoyl-3'-nitro)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 47b

Nach **AAV4** wird eine Suspension von 500 mg (250 μmol) 3-(4'-Chlor-3'-nitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz in 10 ml DMA mit 61.5 mg (750 μmol, 3 eq) NaOAc und 85.3 mg (246 μmol, 1 eq) Tetrabutylammoniumbromid sowie mit 0.44 ml (3.03 mmol, 12 eq) *tert*-Butylacrylat umgesetzt.

Isol. Mat.: 447 mg schwarzes Harz

IR[cm^{-1}]: zusätzliche Bande bei 1650, teilweise überlagert mit Bande bei 1734 (C=O); 3100-2800 (s, br), 1944 (m), 1876 (m), 1802 (m), 1734 (s), 1604 (s), 1541 (s), 1493 (s), 1452 (s), 1375 (s), 1175 (s), 1110 (s), 1029 (s), 908 (s), 824 (s), 766 (s), 707 (s), 624 (m).

Die Abspaltung von 201.5 mg Harz erfolgt gemäß **AAV2** mit insgesamt 10 ml TFA: CH_2Cl_2 : H_2O 90:10:1. Dabei wird auch der *tert*-Butylester gespalten. Das Rohprodukt wird mit Sepac-Kartuschen und präparativer HPLC (C18) gereinigt.

Isol. Mat.: 3.4 mg (10.0 μmol , 11%) gelber Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CDCl_3 , wenig CD_3OD]: δ = 7.28 (d, J = 8.8 Hz, 1H, -CH=CH-COOH), 7.62 (d, J = 8.2 Hz, 1H, -CH=CH-COOH), 7.95 (d, J = 8.0 Hz, 1H, arom. H), 8.09 (d, J = 8.7 Hz, 1H, arom. H), 8.15 (dd, J_1 = 8.0 Hz, J_2 = 1.1 Hz, 1H, arom. H), 8.28-8.30 (m, 1H, arom. H), 8.37 (s, 1H, arom. H), 8.50 (s, 1H, arom. H), 8.56 (d, J = 2.1 Hz, 1H, arom. H).

LCMS(C18): R_t 21.3 min, 340.1 [M-H] $^-$

4-(4'-*tert*-Butyloxycarbonylvinylbenzoyl-3'-nitro)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 47a

Nach **AAV4** wird eine Suspension von 500 mg (250 μmol) 4-(4'-Chlor-3'-nitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz in 6 ml DMA mit 61.5 mg (750 μmol , 3 eq) NaOAc und 80.6 mg (250 μmol , 1 eq) Tetrabutylammoniumbromid sowie mit 0.55 ml (3.79 mmol, 15 eq) *tert*-Butylacrylat und Palladiumacetat bei 100 °C umgesetzt.

Isol. Mat.: 497 mg dunkelbraunes Harz

IR[cm^{-1}]: zusätzliche Bande bei ca. 1650, die sich mit der bei 1734 teilweise überlagert (C=O); 3415 (m, br, H_2O), 3100-2800 (s, br), 1943 (m), 1876 (m), 1203 (m), 1734 (s), 1616 (s), 1539 (s), 1456 (s), 1379 (s), 1178 (s), 1115 (s), 1031 (s), 963 (m), 908 (m), 825 (s), 771 (m), 708 (m), 633 (w).

Die Abspaltung erfolgt von 200 mg Harz mit insgesamt 9 ml TFA: CH_2Cl_2 9:1 mit 0.1% Wasser gemäß **AAV2**. Das Rohprodukt wird mittels Sepac-Kartsuche und präparativer HPLC aufgereinigt.

Isol. Mat.: 6.4 mg (18.8 μmol , 21 %) gelber, amorpher Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CDCl_3]: δ = 7.24 (d, J = 8.6 Hz, 1H, HOOC-CH=CH-), 7.58 (d, J = 8.4 Hz, 1H, HOOC-CH=CH-), 7.79 (d, J = 8.6 Hz, 2H, C(3)-H/ C(5)-H), 7.79

(d, $J = 8.4$ Hz, 1H, C(5')-H), 8.06 (dd, $J_1 = 8.8$ Hz, $J_2 = 2.2$ Hz, 1H, C(6')-H), 8.13 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, C(2)-H/ C(6)-H), 8.51 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, C(2')-H).

LCMS(C18): R_t 20.8 min, 340.1 [M-H]⁻

3-(4'-Ethoxyoxycarbonylvinylbenzoyl-3'-nitro)-benzoesäure an Wang-PS-Harz

Nach AAV4 wird eine Suspension von 107 mg (53.4 μ mol) 3-(4'-Chlor-3'-nitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz in 5 ml DMA mit 13.6 mg (166 μ mol, 3 eq) NaOAc und 13.9 mg (74.1 μ mol, 1.4 eq) Tetrabutylammoniumbromid sowie mit 0.08 ml (735 μ mol, 14 eq) Ethylacrylat umgesetzt.

Isol. Mat.: 85.5 mg schwarzes Harz

IR[cm⁻¹]: zusätzliche Bande bei 1650, teilweise überlagert mit Bande bei 1734 (C=O); 3100-2800 (s, br), 1944 (m), 1874 (m), 1802 (m), 1736 (s), 1620 (s), 1540 (s), 1457 (s), 1375 (s), 1111 (s), 1031 (s), 908 (s), 825 (s), 769 (s), 708 (s), 624 (w).

Die Abspaltung erfolgt mit insgesamt 9 ml TFA: CH₂Cl₂ 9:1 mit 0.1% Wasser gemäß AAV2. Das Rohprodukt wird mittels Sepac-Kartusche und präparativer HPLC aufgereinigt.

Isol. Mat.: < 1 mg (< 7%) gelber Feststoff

LCMS: R_t 12.6 min, 368.1 [M-H]⁻

4-(4'-Ethoxyoxycarbonylvinylbenzoyl-3'-nitro)-benzoesäure an Wang-PS-Harz

Nach AAV4 wird eine Suspension von 72.6 mg (32.7 μ mol) 4-(4'-Chlor-3'-nitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz in 5 ml DMA mit 9.8 mg (120 μ mol, 4 eq) NaOAc und 10.6 mg (32.9 μ mol, 1 eq) Tetrabutylammoniumbromid sowie mit 0.05 ml (3.79 mmol, 15 eq) *tert*-Butylacrylat versetzt und Palladiumacetat bei 100 °C umgesetzt.

Isol. Mat.: 82.2 mg dunkelbraunes Harz

IR[cm⁻¹]: zusätzliche Bande bei ca. 1650, die sich mit der bei 1734 teilweise überlagert (C=O); 3100-2800 (s, br), 1944 (m), 1877 (m), 1803 (m), 1731 (s), 1617 (s), 1538 (s), 1454 (s), 1375 (s), 1114 (m), 1027 (s), 963 (m), 908 (m), 826 (m), 768 (m), 708 (m), 634 (w).

Die Abspaltung erfolgt mit insgesamt 9 ml TFA: CH₂Cl₂ 9:1 mit 0.1% Wasser gemäß **AAV2**. Das Rohprodukt wird mittels Sepac-Kartsuche und präparativer HPLC aufgereinigt.

Isol. Mat.: < 1 mg (< 7%) gelber Feststoff

LCMS: R_t 12.8 min, 368.1 [M-H]⁻

3-Amino-4-*tert*-butyloxycarbonylvinybenzoesäure an Wang-PS-Harz

Gemäß **AAV5** wird eine Suspension von 151 mg (134 µmol) 4-*tert*-Butyloxycarbonylviny-3-nitrobenzoesäure an Wang-PS-Harz in 5 ml 2 M SnCl₂*H₂O in NMP umgesetzt.

Isol. Mat.: 143 mg braunschwarzes Harz

IR[cm⁻¹]: scharfe Absorptionsbande um 3380 cm⁻¹ (NH₂-Gruppe), fehlende Bande bei ca. 1535 cm⁻¹ (Nitrogruppe);
3380 (s), 3100-2800 (s, br), 2800-2650 (br, m), 1943 (m), 1875 (m), 1804(m), 1738 (s), 1603 (s), 1509 (s), 1494 (s), 1452 (s), 1375 (s), 1298 (s), 1028 (m), 907 (m), 826 (m), 764 (m), 705 (m).

3-(3'-Amino-4'-*tert*-butyloxycarbonylvinybenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 49b

Gemäß **AAV5** wird eine Suspension von 393 mg (173 µmol) 3-(4'-*tert*-Butyloxycarbonylviny-3'-nitro-benzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz in 10 ml 2 M SnCl₂*2H₂O in NMP umgesetzt.

Isol. Mat.: 372 mg braunschwarzes Harz

IR[cm⁻¹]: scharfe Absorptionsbande um 3380 cm⁻¹ (NH₂-Gruppe), fehlende Bande bei ca. 1540 cm⁻¹ (Nitrogruppe);
3380 (s), 3100-2800 (s, br), 2800-2650 (br, m), 1944 (m), 1873 (m), 1804 (m), 1732 (s), 1612 (s), 1511 (s), 1453 (s), 1374 (s), 1315 (s), 1029 (m), 907 (m), 824 (m), 763 (m), 705 (m).

4-(3'-Amino-4'-*tert*-butyloxycarbonylvinybenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 49a

Gemäß **AAV5** wird eine Suspension von 400 mg (176 µmol) 4-(4'-*tert*-Butyloxycarbonylviny-3'-nitrobenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz in 10 ml 2 M SnCl₂*2H₂O in NMP umgesetzt.

Isol. Mat.: 373 mg braunschwarzes Harz

IR[cm^{-1}]: scharfe Absorptionsbande um 3380 cm^{-1} (NH_2 -Gruppe), fehlende Bande bei ca. 1540 cm^{-1} (Nitrogruppe);
3380 (s), 3100-2800 (s, br), 2800-2650 (br, m), 1944 (m), 1873 (m), 1804 (m), 1719 (s), 1604 (s), 1510 (s), 1452 (s), 1374 (s), 1276 (s), 1176 (s), 1101 (s), 1019 (m), 825 (m), 761 (m), 703 (m).

9-Fluorenylmethyloxycarbonylisothiocyanat (Fmoc-NCS) 51

Zu einer Suspension von 8.17 g (84.0 mmol, 2 eq) Kaliumrhodanid in 340 ml EtOAc unter Argon werden bei $0 \text{ }^\circ\text{C}$ 10.69 g (41.6 mmol) Chlorameisensäurefluorenylmethylester (Fmoc-Cl) in 100 ml EtOAc über 30 min zugetropft. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels GCMS. Nach 9 h wird über Celite und Kieselgel filtriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie (LM CyH:EtOAc 30:1) gereinigt.

Isol. Mat.: 8.83 g (31.4 mmol, 77%) gelbes, viskoses Öl

R_f: 0.37 (CyH:EtOAc 15:1)

¹H-NMR[400 MHz, CDCl_3]: $\delta = 4.21$ (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 1H, C(9)-H), 4.41 (d, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 7.30 (dd, $J_1 = J_2 = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, C(2)-H/ C(7)-H), 7.39 (dd, $J_1 = J_2 = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, C(3)-H/ C(6)-H), 7.54 (d, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, C(1)-H/ C(8)-H), 7.73 (d, $J = 7.5 \text{ Hz}$, 2H, C(4)-H/ C(5)-H).

¹³C-NMR[100.6 MHz, CDCl_3]: $\delta = 150.3$ (1C, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NCS}$), 147.3 (1C, $-\text{NCS}$), 142.7 (2C, quart., arom. C), 141.2 (2C, quart., arom. C), 128.0 (2C, arom. C), 127.2 (2C, arom. C), 125.0 (2C, arom. C), 120.1 (2C, arom. C), 70.6 (1C, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 46.2 (1C, C(9)).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit Lit.^[99] überein.

***N*-(2-*tert*-Butyloxycarbonylvinyl-5-oxycarbonylphenyl)-*N'*-fluorenylmethyloxycarbonylthioharnstoff an Wang-PS-Harz**

Eine Suspension von 43.5 mg (40.3 μmol) 3-Amino-4-*tert*-butyloxycarbonylvinylbenzoesäure an Wang-PS-Harz in 2 ml DMF wird mit 58.4 mg (208 μmol , 5.3 eq) 9-Fluorenylmethyloxycarbonylisothiocyanat und 1.2 mg (9.8 μmol , 0.24 eq) DMAP versetzt und über Nacht bei RT geschüttelt.

Das Harz wird je dreimal mit jeweils 3 ml DMF und CH_2Cl_2 und anschließend nacheinander mit MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen und am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 50.7 mg schwarzes Harz

Beladung^[98]: 0.44 mmol/g (Fmoc)

***N*-(2-*tert*-Butyloxycarbonylvinyl-4-(3'-oxycarbonylbenzoyl)-phenyl)-*N'*-fluorenylmethoxy-carbonyl-thioharnstoff an Wang-PS-Harz 50b**

Eine Suspension aus 372 mg (167 μ mol) 3-(3'-Amino-4'-*tert*-butyloxycarbonylvinylbenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz in 5 ml DMF wird mit 532 mg (1.89 mmol, 11.3 eq) 9-Fluorenylmethoxycarbonylisothiocyanat und 11.8 mg (22.1 μ mol, 0.6 eq) DMAP versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht geschüttelt. Das Harz wird nacheinander mit je 3 ml DMF (zweimal), CH₂Cl₂ (dreimal), MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen und am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 409.5 mg mittelbraunes Harz

Beladung^[98]: 0.36 mmol/g (Fmoc)

IR[cm⁻¹]: starke Absorptionsbande bei 2045 cm⁻¹ (Urethan);

3550-3200 (s), 3100-2800 (s, br), 2054 (s), 1944 (m), 1873 (m), 1737 (s), 1606 (s), 1511 (s), 829 (m), 763 (m), 703 (m).

***N*-(2-*tert*-Butyloxycarbonylvinyl-4-(4'-oxycarbonylbenzoyl)-phenyl)-*N'*-fluorenylmethoxy-carbonyl-thioharnstoff an Wang-PS-Harz 50a**

Eine Suspension aus 373 mg (168 μ mol) 4-(3'-Amino-4'-*tert*-butyloxycarbonylvinylbenzoyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz in 5 ml DMF wird mit 534 mg (1.90 mmol, 10.2 eq) 9-Fluorenylmethoxycarbonylisothiocyanat und 11.8 mg (96.6 μ mol, 0.6 eq) DMAP versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht geschüttelt. Das Harz wird nacheinander mit je 3 ml DMF (zweimal), CH₂Cl₂ (dreimal), MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen und am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 398 mg schwarzes Harz

Beladung^[98]: 0.31 mmol/g (Fmoc)

IR[cm⁻¹]: starke Absorptionsbande bei 2044 cm⁻¹ (Urethan);

3600-3200 (s), 3100-2800 (s, br), 2044 (s), 1946 (m), 1876 (m), 1723 (s), 1606 (s), 1511 (s), 1452 (s), 1275 (s), 1102 (s), 1026 (s), 909 (m), 826 (m), 761 (s), 703 (s).

5.4.5 Versuche zu Kapitel 3.1.6

***tert*-Butyldiphenylsilyloxyessigsäure-*tert*-butyldiphenylsilylester 57**

Zu einer Lösung von 1.02 g (13.5 mmol) Glykolsäure und 4.60 g (67.5 mmol, 5 eq) Imidazol in 20 ml wasserfreiem DMF werden unter Eiskühlung 8.76 ml (33.7 mmol, 2.5 eq) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid getropft. Das Eisbad wird entfernt und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Lösung wird in 100 ml Eiswasser und 100 ml CyH aufgenommen, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase nochmals mit 100 ml CyH extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 100 ml ges. NaHCO₃-Lösung und 100 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und am HV getrocknet. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie (LM CyH:EtOAc 4:1) gereinigt.

Isol. Mat.: 7.36 g (13.3 mmol, quant.) weißer amorpher Feststoff

R_f: 0.49 (LM CyH:EtOAc 4:1)

¹H-NMR[400 MHz, CDCl₃]: δ = 1.09 (s, 18H, 2 -C(CH₃)₃), 4.38 (s, 2H, -OCO-CH₂-O-), 7.35-7.46 (m, 12H, arom. H), 7.64-7.74 (m, 8H, arom. H).

¹³C-NMR [100.6 MHz, CDCl₃]: δ = 170.0 (1C, -COOR), 135.3 (8C, tert., arom. C), 132.2 (4C, quart., arom. C), 129.7 (4C, tert., arom. C), 127.7 (8C, tert., arom. C), 62.9 (1C, -CH₂-), 26.7 (6C, -CH₃), 19.2 (2C, -C(CH₃)₃).

4-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxyacetyl)benzoesäure an Wang-PS-Harz 59

Nach **AAV3** werden 502 mg (418 μmol) 4-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz **18** mit einer Grignard-Lösung aus 316 mg (13.0 mmol, 31 eq) Magnesiumspänen und 1.22 ml (13.0 mmol, 31 eq) 2-Brompropan in 19 ml wasserfreiem THF und mit 13 ml (13 mmol, 31 eq) 1 M CuCN*2LiCl in wasserfreiem THF versetzt. Das Säurechlorid wird nach **AAV3b** aus 7.36 g (13.3 mmol, 32 eq) *tert*-Butyldiphenylsilyloxyessigsäure-*tert*-butyldiphenylsilylester, 0.2 ml DMF und 1.20 ml (14.2 mmol, 34 eq) Oxalylchlorid in 25 ml CH₂Cl₂ bereitet.

Isol. Mat.: 286 mg schmutzig weißes Harz

IR [cm⁻¹] starke Bande bei 1732 (Carbonylbande);
3100-2800 (s, br), 1944 (m), 1876 (m), 1732 (s), 1602 (s), 1507 (s), 1456 (s), 1375 (s), 1281 (s), 1177 (s), 1116 (s), 907 (s), 823 (s), 716 (s), 634 (w).

4-(Hydroxyacetyl)benzoesäure an Wang-PS-Harz 56

Eine Suspension von 181 mg (100 μmol) 4-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxyacetyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz in 3.0 ml wasserfreiem THF wird mit 1.6 ml (1.6 mmol, 16 eq) 1 M Tetrabutylammoniumfluorid in THF versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht durchmischt.

Das Harz wird mit je 3 ml DMF:H₂O 5:1, zweimal mit DMF, CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂, MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen und anschließend am Hochvakuum getrocknet.

Isol. Mat.: 162 mg bräunliches Harz

IR [cm^{-1}]: OH-Bande bei ca. 3530 cm^{-1} ;

3530 (s, br); 3100-2800 (s, br), 1944 (m), 1876 (m), 1802 (m), 1732 (s), 1603 (s), 1506 (s), 1455 (s), 1374 (s), 1280 (m), 1177 (m), 1114 (ms), 907 (m), 825 (m), 714 (m), 634 (w).

3-Bromacetylbenzoesäure an Wang-PS-Harz 60

Die Herstellung erfolgt nach **AAV3a** mit 1.50 g (1.41 mmol) 3-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz **17**, die mit einer Grignard-Lösung aus 917 mg (37.7 mmol, 27 eq) Magnesiumspänen und 3.6 ml (38.3 mmol, 27 eq) 2-Brompropan in 54 ml wasserfreiem THF versetzt werden. Dazu werden 37.5 ml (37.5 mmol, 27 eq) 1 M CuCN*2LiCl in wasserfreiem THF gegeben. Zum festphasengebundenen Cuprat werden 4.0 ml (45.8 mmol, 32 eq) Bromacetylbromid gegeben.

Isol. Mat.: 1.42 g braunes Harz

IR [cm^{-1}]: 3455 (m), 3100-2800 (s, br), 1945 (m), 1877 (m), 1744 (s), 1606 (s), 1495 (s), 1458 (s), 1378 (s), 1313 (s), 1244 (m), 1177 (m), 1117 (m), 1033 (m), 958 (s), 908 (s), 825 (s), 710 (s), 631 (w).

4-Bromacetylbenzoesäure an Wang-PS-Harz 61

Die Herstellung erfolgt nach **AAV3a** mit 792 mg (744 μmol) 4-Iodbenzoesäure an Wang-PS-Harz mit einer Grignard-Lösung aus 482 mg (19.8 mmol, 27 eq) Magnesiumspänen, 1.9 ml (20.2 mmol, 27 eq) 2-Brompropan in 28.3 ml wasserfreiem THF und 19.8 ml (19.8 mmol, 27 eq) 1 M CuCN*2LiCl in wasserfreiem THF. Zum immobilisierten Cuprat werden 2.1 ml (24.0 mmol, 32 eq) Bromacetylbromid gegeben.

Isol. Mat.: 634 mg braungelbes Harz

IR[cm^{-1}]: 3457 (m), 3100-2800 (s, br), 1945 (m), 1877 (m), 1738 (s), 1605 (s), 1507 (s), 1454 (s), 1282 (s), 1115 (s), 826 (m), 710 (m), 633 (w).

Beladung von Wang-PS-Harz mit Bromessigsäure 62

Eine Suspension aus 2.00 g (2.40 mmol) Wang-PS-Harz wird mit 29.4 mg (241 μmol , 0.1 eq) DMAP und 1.05 ml (12.0 mmol, 5 eq) Bromacetylbromid versetzt und bei 50 °C über Nacht geschüttelt. Das Harz wird dreimal mit je 5 ml DMF, dreimal mit je 5 ml CH_2Cl_2 und nacheinander mit je 5 ml MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen.

Isol. Mat.: 2.10 g braunes Harz

IR[cm^{-1}]: 3458 (w), 3100-2800 (s, br), 1945 (m), 1876 (m), 1803 (m), 1752 (s), 1610 (s), 1509 (s), 1459 (s), 1376 (m), 1290 (m), 961 (m), 907 (m), 848 (m), 708 (m), 634 (w).

Benzylisothiouredoniumbromid

Zu einer Suspension von 789 mg (10.9 mmol) Thioharnstoff in 11 ml Ethanol p.a. werden 1.61 ml (13.1 mmol, 1.2 eq) Benzylbromid gegeben. Das Gemisch wird 90 min unter Rückfluss bei 65 °C gerührt. Das überstehende Lösungsmittel wird abdestilliert. Der Rückstand wird mehrfach mit kaltem Ether gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Eine weitere Reinigung ist nicht notwendig.

Isol. Mat.: 2.48 g (10.05 mmol, 92%) weißer, amorpher Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CD_3OD]: δ = 4.44 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 7.33-7.39 (m, 5H, Phenyl).

MALDI-TOF: 167.40 [M-Br] $^+$

Die Daten stimmen mit Lit.^[155] überein.

***p*-Chlorbenzylisothiouredoniumchlorid 52d**

Eine Suspension von 710 mg (9.33 mmol) Thioharnstoff und 1.67 g (10.4 mmol, 1.1 eq) *p*-Chlorbenzylchlorid in 13 ml EtOH wird unter Rückfluss auf 70 °C (Badtemperatur) erhitzt. Nach 10 h wird das Heizbad entfernt. Das Produkt fällt als weißer, feinblättriger Niederschlag aus. Die Fällung wird mit Cyclohexan vervollständigt. Der Niederschlag wird dreimal mit Cyclohexan und zweimal mit wenig kaltem Diethylether gewaschen.

Isol. Mat.: 1.97 g (8.24 mmol, 89%) feinblättriger weißer Niederschlag

¹H-NMR[400 MHz, dms_o-d⁶]: δ = 4.58 (s, 2H, (ClC₆H₄)–CH₂-), 7.42–7.46 (m, 4H, ClC₆H₄–CH₂-), 9.39 (s, br, 2H, -NH).

¹³C-NMR [100.6 MHz, dms_o-d⁶]: δ = 168.5 (1C, -S-C(=NH)-NH-), 134.3 (1C, quart., arom. C), 132.2 (1C, quart., arom. C), 130.5 (2C, arom. C), 128.4 (2C, arom. C), 33.1 (1C, -CH₂-S).

Smp.: 201 – 203 °C

MS (FAB, 3-NBA): 200.97 [M-Cl]⁺

HRMS (FAB, 3-NBA) für C₈H₁₀N₂ClS [M-Cl]⁺ ber.: 201.5494
gef.: 201.0280

1-Allyl-3-(benzylisothioureido)-thioharnstoff

Eine Lösung von 518 mg (2.10 mmol) Benzylisothiureidoniumbromid in 10 ml DMF wird bei 0 °C mit 239 µl (2.31 mmol, 1.1 eq) 94% Allylisothiocyanat und 377 µl (2.20 mmol, 1.05 eq) DIPEA versetzt. Die Reaktion wird auf Raumtemperatur aufgetaut und über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wird in je 80 ml EtOAc und 40 ml Eiswasser und 1 N Salzsäure aufgenommen. Die wässrige Phase wird nochmals mit 100 ml EtOAc extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit 100 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand am HV getrocknet. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie (CyH:EtOAc 4:1 mit 1% TEA) aufgereinigt.

Isol. Mat.: 332 mg (1.25 mmol, 60%) weißer, amorpher Feststoff

¹H-NMR[400 MHz, CD₃OD; Rotamere]: δ = 4.22-4.29 (m, 4H, (C₆H₄)–CH₂-, -CH₂-CH=CH₂), 5.10-5.27 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂), 5.76-5.91 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂), 7.29–7.35 (m, 5H, Phenyl).

Die übrigen Daten stimmen mit Lit.^[155] überein.

3-Allyl-1-[iminophenylmethyl]thioharnstoff 54a

Die Herstellung erfolgt nach **AAV6** mit 948 mg (6.01 mmol) Benzamidin Hydrochlorid in 30 ml wasserfreiem DMF, 0.66 ml (6.15 mmol, 1.02 eq) 95% Allylisothiocyanat und 0.95 ml (6.30 mmol, 1.05 eq) DBU. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels DC (LM CyH:EtOAc 3:1). Das Gemisch wird durch FC aufgereinigt (LM: CyH:EtOAc 3:1 mit 1% TEA).

Isol. Mat.: 1.23 g (5.62 mmol, 94%) weißer, amorpher Feststoff

R_f (CyH:EtOAc 3:1): 0.17

Smp.: 83 – 85 °C

¹H-NMR[400 MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: δ = 4.18 (s, 2H, -CH₂-CH=CH₂), 5.25 (d, J_{cis}=10.3 Hz, 1H, -CH=CH_{cis}H), 5.33 (d, J_{trans}=17.0 Hz, 1H, -CH=CH_{trans}H), 5.88 (m, 1H, CH₂-CH=CH₂), 7.46 (dd, J₁=7.8 Hz, J₂=6.8 Hz, 2H, arom. H), 7.63 (t, J=7.5 Hz, 1H, arom. H), 7.75 (d, J=7.6 Hz, 2H, arom. H).

¹³C-NMR [100.6 MHz, dms_o-d⁶]: δ = 162.9 (1C, -NH-C(=S)-NH-), 133.2 (1C, arom. C), 132.0 (1C, arom. C), 129.6 (1C, quart. arom. C), 128.4-128.1 (3C, arom. C), 127.1 (1C, -CH=CH₂), 116.9 (1C, -CH=CH₂), 45.9 (1C, -CH₂-CH=CH₂).

MS (FAB, 3-NBA): 220.05 [M+H⁺]

HRMS (FAB, 3-NBA) für C₁₁H₁₄N₃S [M+H⁺]: ber.: 220.0909
gef.: 220.0925

4-[(3-Allylthioureido)-iminomethyl]-benzamid 54b

Die Herstellung erfolgt nach **AAV6** mit 1.21 g (6.02 mmol) 97% 4-Amidinobenzamid Hydrochlorid in 30 ml DMF, 0.66 ml (6.15 mmol, 1.02 eq) 95% Allylisothiocyanat und 0.95 ml (6.30 mmol, 1.05 eq) DBU. Erst bei Zugabe von DBU bildet sich eine klare Lösung. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels DC (LM CyH: EtOAc 1:1). Der Rückstand wird mittels FC aufgereinigt (LM CyH:EtOAc 1:1 mit 1% TEA).

Isol. Mat.: 1.14 g (4.33 mmol, 72%) gelber, feinkristalliner Feststoff

Smp.: 166 °C

R_f: 0.03

¹H-NMR[400 MHz, dms_o-d⁶]: Gemisch von Rotameren, δ= 4.00-4.13 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂), 5.03-5.22 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂), 5.82-5.94 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂), 7.49 (s, br, 1H, NH), 7.95-8.05 (m, 4H, arom. H), 8.08 (s, br, 1H, NH), 8.86 (s, br, 1H, NH), 9.23 (s, br, 1H, NH).

¹³C-NMR [100.6 MHz, dms_o-d⁶]: Gemisch von Rotameren, δ= 189.4 (0.5C, -NH-C(=S)-NH-), 187.4 (0.5C, -NH-C(=S)-NH-), 166.8 (1C, -C(=O)-NH₂), 160.7 (0.5C, -C(=NH)-NH-), 159.5 (0.5C, -C(=NH)-NH-), 137.4 (0.5C, arom. C), 137.2 (0.5C, arom. C), 136.6 (0.5C, arom. C), 136.3 (0.5C, arom. C), 134.8 (0.5C, -CH=CH₂), 133.8 (0.5C, -CH=CH₂), 127.2 (2C, arom. C), 127.0 (2C, arom. C), 115.8 (0.5C, -CH=CH₂), 115.1 (0.5C, -CH=CH₂), 45.8 (0.5C, -CH₂-CH=CH₂), 45.7 (0.5C, -CH₂-CH=CH₂).

MS (FAB, 3-NBA): 263.05 [M+H⁺]

HRMS (FAB, 3-NBA) für C₁₁H₁₅N₄OS [M+H⁺]: ber.: 263.0967
gef.: 263.0981

1-Allyl-3-[(4-aminophenyl)iminomethyl]thioharnstoff 54c

Die Herstellung erfolgt nach **AAV6** mit 1.81 g (8.42 mmol) 97% 4-Aminobenzamidin Dihydrochlorid in 42 ml wasserfreiem DMF, 0.92 ml (8.88 mmol, 1.05 eq) 95% Allylisothiocyanat und 2.58 ml (17.27 mmol, 2.05 eq) DBU. Erst nach Zugabe von DBU bildet sich eine dunkelbraune Lösung.

Die Reaktionskontrolle erfolgt über DC (LM CyH:EtOAc 2:1). Der braune, ölige Rückstand wird über FC aufgereinigt (LM CyH:EtOAc 2:1 mit 1% TEA).

Isol. Mat.: 965 mg (4.81 mmol, 57%) braungelber, amorpher Feststoff

R_f(LM CyH:EtOAc 2:1): 0.04

Smp.: 96 – 97 °C

¹H-NMR[400 MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: Gemisch von Rotameren, δ= 4.13-4.14 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂), 5.15-5.23 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂), 5.88-5.92 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂), 6.65 (d, J=8.6 Hz, 2H, *o*-CH), 7.58-7.73 (m, 2H, *m*-CH).

¹³C-NMR [100.6 MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: Gemisch von Rotameren, δ= 163.0 (1C, -NH-C(=S)-NH-), 150.5 (0.5C, -C(=NH)-NH-), 150.0 (0.5C, -C(=NH)-NH-), 133.5 (1C, quart., arom. C), 132.6 (1C, quart., arom. C), 128.8 (2C, arom. C), 128.3 (1C, arom. C), 128.1 (1C, arom. C), 116.4 (0.5C, -CH=CH₂), 116.0 (0.5C, -CH=CH₂), 113.9 (0.5C, -CH=CH₂), 113.7 (0.5C, -CH=CH₂), 46.3 (0.5C, -CH₂-CH=CH₂), 46.2 (0.5C, -CH₂-CH=CH₂).

MS (FAB, 3-NBA): 235.06 [M+H⁺]

HRMS (FAB, 3-NBA) für C₁₁H₁₅N₄S [M+H⁺]: ber.: 235.1018

gef.: 235.1003

1-Allyl-3-[(4'-chlorbenzyl)isothioureido]-thioharnstoff 54d

Die Herstellung erfolgt nach **AAV6** mit 1.43 g (6.01 mmol) *p*-Chlorbenzylisothioureidoniumchlorid in 30 ml wasserfreiem DMF, 0.62 ml (6.04 mmol, 1.00 eq) 95% Allylisothiocyanat und 0.96 ml (6.43 mmol, 1.07 eq) DBU. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC (LM CyH:EtOAc 2:1). Der Rückstand wird durch FC gereinigt (CyH:EtOAc 4:1 mit 1% TEA).

Isol. Mat.: 1.12 g (62%) weißer amorpher Feststoff

R_f (CyH:EtOAc 4:1): 0.41

¹H-NMR[400 MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: Gemisch von Rotameren; δ = 3.97-4.01 (m, 1H, -CHH-CH=CH₂), 4.19-4.25 (m, 3H, -CHH-CH=CH₂ und ClC₆H₄-CH₂-), 5.09-5.26 (m, 2H, -CH=CH₂), 5.74-5.78 (m, 0.5H, -CH=CH₂), 5.86-5.93 (m, 0.5 H, -CH=CH₂), 7.23 (d, J=11.6 Hz, 2H, *m*-CH), 7.26 (d, J=8.3 Hz, 2H, *o*-CH).

¹³C-NMR [100.6 MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: 1:1 Gemisch von Rotameren; δ = 187.6 (0.5C, -NH-C(=S)NH-), 185.9 (0.5 C, -NH-C(=S)NH-), 169.5 (0.5C, -S-C(=NH)-NH-), 162.3 (0.5C, -S-C(=NH)-NH-), 135.5 (1C, quart., arom. C), 134.9 (1C, quart., arom. C), 133.2 (0.5C, -CH=CH₂), 132.8 (0.5C, -CH=CH₂), 130.1 (2C, arom. C), 128.7 (2C, arom. C), 117.4 (0.5C, -CH=CH₂), 117.0 (0.5C, -CH=CH₂), 46.4 (0.5C, -CH₂-CH=CH₂), 46.3 (0.5C, -CH₂-CH=CH₂), 34.0 (0.5C, ClC₆H₄-CH₂-), 33.8 (0.5C, ClC₆H₄-CH₂-).

MS (FAB, 3-NBA): 299.91 [M+H]⁺

HRMS (FAB, 3-NBA) für C₁₂H₁₅N₃ClS₂ [M+H]⁺: ber.: 300.0397
gef.: 300.0390

2-Allylamino-4-phenylthiazol-5-carbonsäure an Wang-PS-Harz 65a

Die Herstellung erfolgt nach **AAV7** mit 300 mg (300 μmol) immobilisierter Bromessigsäure an Wang-PS-Harz, 672 mg (3.07 mmol, 10.2 eq) 3-Allyl-1-[iminophenylmethyl]thioharnstoff, 15.3 ml DMF und 0.45 ml (3.01 mmol, 10.0 eq) DBU.

Isol. Mat.: 253 mg rostbraunes Harz

IR[cm⁻¹]: 3579 (m), 3392 (s, br), 3100-2600 (s, br), 2337 (w), 1945 (m), 1876 (m), 1804 (m), 1711 (s), 1671 (s), 1611 (s), 1511 (s), 1453 (s), 1380 (s), 1329 (s), 1175 (m), 1071 (m), 1029 (m), 964 (m), 909 (m), 824 (m), 769 (m), 707 (m), 620 (w).

Die Abspaltung erfolgt nach **AAV2** mit TFA:CH₂Cl₂:H₂O 90:10:1. Das Rohprodukt wird mit Sepac Kartuschen und präparativer HPLC (C18) aufgereinigt.

Isol. Mat.: 4.9 mg (18.8 μmol, 8%) rotbrauner, amorpher Feststoff

¹H-NMR[400 MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: δ= 3.90 (d, J= 5.7 Hz, 2H, -CH₂-CH=CH₂), 5.28 (d, J_{cis}= 10.2 Hz, 1H, -CH=CH_{cis}H), 5.36 (d, J_{trans}= 16.8, 1H, -CH=CH_{trans}H), 5.79–5.84 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂), 7.35–7.42 (m, 3H, arom. H), 7.62– 7.64 (m, 2H, arom. H).

LCMS (C18PPN): R_t= 7.42 min, 261.1 [M+H]⁺, 283.3 [M+Na]⁺.

2-Allylamino-4-(4-carbamoylphenyl)-thiazol-5-carbonsäure an Wang-PS-Harz 65b

Die Herstellung erfolgt nach **AAV7** mit 301 mg (301 μmol) immobilisierter Bromessigsäure an Wang-PS-Harz, 798 mg (3.04 mmol, 10.1 eq) 4-[(3-Allylthioureido)-iminomethyl]-benzamid, 15.2 ml DMF und 0.45 ml (3.01 mmol, 10.0 eq) DBU.

Isol. Mat.: 249 mg dunkelbraunes Harz
IR[cm^{-1}]: 3577 (m), 3389 (s, br), 3100–2800 (s, br), 2800–2500 (m), 2337 (w), 1944 (m), 1875 (m), 1804 (m), 1742 (s), 1671 (s), 1612 (s), 1508 (s), 1454 (s), 1382 (s), 1244 (s), 1176 (s), 1112 (m), 1031 (m), 964 (m), 907 (m), 824 (m), 709 (m), 622 (w).

Die Abspaltung erfolgt nach **AAV2** mit TFA:CH₂Cl₂:H₂O 90:10:1. Die Aufreinigung erfolgt mittels Sepac Kartuschen und präparativer HPLC (C18PPN).

Isol. Mat.: 14.0 mg (46.2 μmol , 21%) gelber, amorpher Feststoff
¹H-NMR[400 MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: δ = 3.87- 3.90 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂), 5.17-5.35 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂), 5.82-5.84 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂), 7.70-8.13 (m, 4H, arom. H).
LCMS (C18PPN): R_t = 6.86 min, 326.3 [M+Na⁺].

2-Allylamino-4-(4-aminophenyl)-thiazol-5-carbonsäure an Wang-PS-Harz 65c

Die Herstellung erfolgt nach **AAV7** mit 267 mg (267 μmol) immobilisierter Bromessigsäure an Wang-PS-Harz, 319 mg (1.36 mmol, 5.1 eq) 1-Allyl-3-[(4-aminophenyl)iminomethyl]thioharnstoff, 6.7 ml DMF und 0.21 ml (3.01 mmol, 10.0 eq) DBU.

Isol. Mat.: 210 mg violette Harz
IR[cm^{-1}]: 3578 (m), 3467 (s), 3380 (s), 3220 (s), 3100–2800 (s, br), 2800–2500 (m), 2335 (w), 1945 (m), 1877 (m), 1804 (m), 1706 (s), 1671 (s), 1623 (s), 1565 (s), 1505 (s), 1382 (s), 1334 (s), 1178 (m), 1148 (m), 1069 (m), 1012 (m), 963 (m), 910 (m), 876 (m), 834 (m), 709 (m).

Die Abspaltung erfolgt nach **AAV2** mit TFA:CH₂Cl₂:H₂O 90:10:1. Das Rohprodukt wird mit Sepac Kartuschen und präparativer HPLC (C18) aufgereinigt.

Isol. Mat.: 1.1 mg (8.0 μmol , 4%) gelbbraunes Öl
LCMS (C18PPN): R_t = 5.73 min, 275.1 [M+H⁺].

2-Allylamino-4-aminothiazol-5-carbonsäure 65d

Die Herstellung erfolgt nach **AAV7** mit 301 mg (301 μmol) immobilisierter Bromessigsäure an Wang-PS-Harz, 265 mg (885 μmol , 2.9 eq) 1-Allyl-3-[(4'-chlorbenzyl)isothioureido]thioharnstoff und 0.14 ml (909 μmol , 3.0 eq) DBU.

Isol. Mat. : 263 mg rotes Harz
IR[cm^{-1}]: 3600-3200 (s, br), 3100-2600 (s, br), 2360 (m), 1946 (m), 1876 (m), 1802 (m), 1739 (s), 1709 (s), 1646 (s), 1611 (s), 1548 (s), 1511 (s), 1461 (s), 1372 (m), 1311 (m), 1179 (m), 1109 (m), 1043 (m), 968 (m), 833 (m), 749 (m), 702 (m).

Die Abspaltung erfolgt nach **AAV2** mit TFA:CH₂Cl₂:H₂O 90:10:1. Die Aufreinigung erfolgt mittels Sepac-Kartuschen und präparativer HPLC (C18PPN).

Isol. Mat.: 1.4 mg (7.0 μmol) roter, amorpher Feststoff
¹H-NMR[400 MHz, CD₃OD]: δ = 3.86- 3.88 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂), 5.12 (d, 1H, J_{cis} = 10.2 Hz, -CH₂-CH=CH_{cis}H_{trans}), 5.20 (d, 1H, J_{trans} = 17.2 Hz, -CH₂-CH=CH_{cis}H_{trans}), 5.82-5.86 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂).
LCMS (C18PPN): R_t 3.27 min, 200.1 [M+H]⁺.

3-(2-Allylamino-4-phenylthiazol-5-carbonyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 63a

Die Herstellung erfolgt nach **AAV7** mit 230 mg (230 μmol) 3-Bromacetylbenzoesäure an Wang-PS-Harz, 503 mg (2.29 mmol, 10.0 eq) 3-Allyl-1-[iminophenylmethyl]thioharnstoff, 11.5 ml DMF und 0.68 ml (4.55 mmol, 19.8 eq) DBU.

Isol. Mat.: 239 mg dunkelbraunes Harz
IR[cm^{-1}]: 3396 (m, br), 3100-2800 (br, s), 2800-2500 (m), 2337 (w), 1945 (m), 1874 (m), 1804 (m), 1730 (s), 1604 (s), 1502 (s), 1244 (s), 1178 (s), 1116 (m), 1030 (m), 960 (m), 907 (m), 823 (s), 709 (m), 621 (w).

Die Abspaltung erfolgt nach **AAV2** mit TFA:CH₂Cl₂:H₂O 90:10:1. Das Rohprodukt wird mit Sepac Kartuschen und präparativer HPLC (C18) aufgereinigt.

Isol. Mat.: 13.8 mg (37.9 μmol , 19%) rotbrauner, amorpher Feststoff
¹H-NMR[400 MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: δ = 3.89 (d, J =4.0 Hz, 2H, -CH₂-CH=CH₂), 5.20 (dd, J_{cis} = 10.2 Hz, J_2 =1.3 Hz, 1H, -CH₂-CH=CH_{cis}H), 5.30 (dd, J_{trans} = 17.2 Hz, J_2 =1.2 Hz, 1H, -CH₂-CH=CH_{trans}H), 5.80-5.86 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂), 6.91-7.11 (m, 5H, Phenyl), 7.21- 7.27 (m, 1H, arom. H), 7.47-7.60 (m, 1H, arom. H), 7.76-7.87 (m, 1H, arom. H), 7.89-8.09 (m, 1H, arom. H).
LCMS (C18PPN): R_t = 11.03 min, 365.3 [M+H]⁺.

4-(2-Allylamino-4-phenylthiazol-5-carbonyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 64a

Die Herstellung erfolgt nach **AAV7** mit 202 mg (162 μmol) 4-Bromacetylbenzoesäure an Wang-PS-Harz, 245 mg (1.12 mmol, 6.9 eq) 3-Allyl-1-[iminophenylmethyl]thioharnstoff, 4 ml DMF und 0.12 ml (803 μmol , 5.0 eq) DBU.

Isol. Mat.: 161 mg braunschwarzes Harz

IR[cm^{-1}]: 3416 (m), 3340 (m), 3100-2800 (s, br), 2800-2500 (m), 1945 (m), 1876 (m), 1804 (m), 1730 (s), 1503 (s), 1226 (m), 1177 (m), 1116 (m), 1028 (m), 906 (m), 818 (m), 711 (m), 660 (w), 620 (w).

Die Abspaltung erfolgt nach **AAV2** mit TFA: CH_2Cl_2 : H_2O 90:10:1. Das Rohprodukt wird mit Sepac Kartuschen und präparativer HPLC (C18) aufgereinigt.

Isol. Mat.: 2.2 mg (6.1 μmol , 5%) rotbrauner, amorpher Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CDCl_3 , wenig CD_3OD]: δ = 4.01 (d, J = 5.6 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.28 (dd, J_{cis} = 10.4 Hz, J_2 = 1.2 Hz, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_{\text{cis}}\text{H}_{\text{trans}}$), 5.39 (dd, J_{trans} = 17.1 Hz, J_2 = 1.2 Hz, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_{\text{cis}}\text{H}_{\text{trans}}$), 5.93-5.97 (m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 7.03-7.07 (m, 1H, arom. H), 7.41 (d, 2H, J =8.2 Hz, arom. H), 7.59 (d, 2H, 8.7 Hz, arom. H), 7.72 (d, J = 8.0 Hz, 2H, arom. H), 7.91 (d, J = 8.3 Hz, 2H, arom. H).

LCMS (C18PPN): R_t = 11.14 min, 365.3 [$\text{M}+\text{H}^+$].

3-[2-Allylamino-4-(4-carbamoylphenyl)thiazol-5-carbonyl]benzoesäure an Wang-PS-Harz 63b

Die Herstellung erfolgt nach **AAV7** mit 229 mg (230 μmol) 3-Bromacetylbenzoesäure an Wang-PS-Harz, 602 mg (2.30 mmol, 10.0 eq) 4-[(3-Allylthioureido)-iminomethyl]-benzamid, 11.5 ml DMF und 0.34 ml (2.28 mmol, 9.9 eq) DBU.

Isol. Mat.: 229 mg rotbraunes Harz

IR[cm^{-1}]: 3571 (m), 3361 (m, br), 3100-2600 (s), 2338 (w), 1945 (m), 1874 (m), 1804 (m), 1728 (s), 1615 (s), 1501 (s), 1460 (s), 1237 (m), 1175 (m), 1111 (m), 1029 (m), 957 (m), 905 (m), 820 (m), 712 (m), 626 (w).

Die Abspaltung erfolgt nach **AAV2** mit TFA: CH_2Cl_2 : H_2O 90:10:1. Das Rohprodukt wird mit Sepac Kartuschen und präparativer HPLC (C18) aufgereinigt.

Isol. Mat.: 13.9 mg (34.1 μmol , 19%) gelber, amorpher Feststoff

¹H-NMR[400 MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: δ= 3.94 (d, J= 5.4 Hz, 2H, -CH₂-CH=CH₂), 5.26 (d, J_{cis}= 10.6 Hz, 1H, -CH₂-CH=CH_{cis}H_{trans}), 5.35 (d, J_{trans}= 16.5 Hz, 1H, -CH₂-CH=CH_{cis}H_{trans}), 5.89-5.90 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂), 7.19-7.23 (m, 2H, arom. H), 7.44-7.50 (m, 2H, arom. H), 7.78-8.12 (m, 4H, arom. H).

LCMS (C18PPN): R_t= 8.75 min, 408.3 [M+H]⁺.

4-[2-Allylamino-4-(4-carbamoylphenyl)thiazol-5-carbonyl]benzoesäure an Wang-PS-Harz 64b

Die Herstellung erfolgt nach **AAV7** mit 204 mg (164 μmol) 4-Bromacetylbenzoesäure an Wang-PS-Harz, 216 mg (822 μmol, 5.0 eq) 4-[(3-Allylthioureido)-iminomethyl]-benzamid, 4.1 ml DMF und 0.12 ml (803 μmol, 4.9 eq) DBU.

Isol.Mat.: 182 mg dunkelviolettes Harz

IR[cm⁻¹]: 3335 (s), 3100-2800 (s), 2800-2500 (m), 1945 (m), 1876 (m), 1804 (m), 1732 (s), 1541 (s), 1506 (s), 1457 (s), 1227 (m), 1178 (m), 1118 (m), 1029 (m), 962 (m), 908 (m), 824 (m), 712 (m), 660 (w), 625 (w).

Die Abspaltung erfolgt nach **AAV2** mit TFA:CH₂Cl₂:H₂O 90:10:1. Das Rohprodukt wird mit Sepac Kartuschen und präparativer HPLC (C18) aufgereinigt.

Isol.Mat.: 1.3 mg (3.2 μmol, 2%) gelber, amorpher Feststoff

¹H-NMR[400 MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: δ= 3.87-3.90 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂), 5.23-5.30 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂), 5.78-5.83 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂), 7.20-7.22 (m, 2H, arom. H), 7.44-7.32 (m, 2H, arom. H), 7.61-7.64 (m, 2H, arom. H), 7.92-8.09 (m, 2H, arom. H).

LCMS (C18PPN): R_t= 8.82 min, 408.3 [M+H]⁺

3-(2-Allylamino-4-(4-aminophenyl)thiazol-5-carbonyl)benzoesäure an Wang-PS-Harz 63c

Die Herstellung erfolgt nach **AAV7** mit 251 mg (201 μmol) 3-Bromacetylbenzoesäure an Wang-PS-Harz, 239 mg (1.02 mmol, 5.1 eq) 1-Allyl-3-[(4-aminophenyl)iminomethyl]thioharnstoff, 5 ml DMF und 0.16 ml (1.07 mmol, 5.3 eq) DBU.

Isol.Mat.: 242 mg violettes Harz

IR[cm⁻¹]: 3352 (s, br), 3100-2800 (s, br), 2800-2500 (m), 1946 (m), 1875 (m), 1803 (m), 1721 (s), 1678 (s), 1656 (s), 1545 (s), 1526 (s), 1495 (s), 1113 (m), 1027 (m), 908 (m), 820 (m), 710 (m), 660 (w), 621 (w).

Die Abspaltung erfolgt nach **AAV2** mit TFA:CH₂Cl₂:H₂O 90:10:1. Das Rohprodukt wird mit Sepac Kartuschen und präparativer HPLC (C18) aufgereinigt.

Isol.Mat.: 9.5 mg (25.0 μmol, 12%) gelbbraunes Öl

¹H-NMR[400 MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: δ= 4.16- 4.19 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂), 5.19 (d, J_{cis}=10.1 Hz, 1H, -CH₂-CH=CH₂), 5.30 (d, J_{trans}=17.0 Hz, -CH₂-CH=CH₂), 5.77-5.82 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂), 6.92-7.34 (m, 4H, H₂N-C₆H₄-), 7.58-7.68 (m, 2H, arom. H), 7.88-8.03 (m, 2H, arom. H).

LCMS (C18PPN): R_t= 8.51 min, 380.3 [M+H⁺].

4-(2-Allylamino-4-(4-aminophenyl)thiazol-5-carbonyl)benzoesäure an Wang-PS-Harz 64c

Die Herstellung erfolgt nach **AAV7** mit 251 mg (201 μmol) 4-Bromacetylbenzoesäure an Wang-PS-Harz, 307 mg (1.310 mmol, 6.5 eq) 1-Allyl-3-[(4-aminophenyl)iminomethyl]thioharnstoff, 5 ml DMF und 0.16 ml (1.07 mmol, 5.3 eq) DBU.

Isol.Mat.: 238 mg dunkelviolettes Harz

IR[cm⁻¹]: 3370 (s, br), 3100-2800 (s, br), 2800-2600 (m), 1945 (m), 1877 (m), 1803 (m), 1719 (s), 1686 (s), 1517 (s), 1117 (m), 832 (w), 769 (w), 711 (w), 660 (w), 623 (w).

Die Abspaltung erfolgt nach **AAV2** mit insgesamt 8 ml TFA:CH₂Cl₂:H₂O 90:10:1. Das Rohprodukt wird mit Sepac Kartuschen und präparativer HPLC (C18) aufgereinigt.

Isol.Mat.: 4.9 mg (12.9 μmol, 7%) braunes Öl

¹H-NMR[400 MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: δ= 4.18-4.19 (m, 2H, -CH₂-CH=CH₂), 5.19 (d, J_{cis}= 10.1 Hz, 1H, -CH₂-CH=CH_{cis}H_{trans}), 5.30 (d, J_{trans}= 17.0 Hz, 1H, -CH₂-CH=CH_{cis}H_{trans}), 5.77-5.82 (m, 1H, -CH₂-CH=CH₂), 7.32-7.34 (m, 2H, arom. H), 7.65-7.68 (m, 2H, arom. H), 7.89-8.00 (m, 2H, arom. H), 8.02-8.04 (m, 2H, arom. H).

LCMS (C18PPN): R_t= 9.05 min, 380.3 [M+H⁺].

3-(2-Allylamino-4-aminothiazol-5-carbonyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 63d

Die Herstellung erfolgt nach **AAV7** mit 253 mg (202.5 μmol) 3-Bromacetylbenzoesäure an Wang-PS-Harz, 301 mg (1.00 mmol, 5.0 eq) 1-Allyl-3-[(4'-chlorbenzyl)isothioureido]-thioharnstoff, 5 ml DMF und 0.16 ml (1.07 mmol, 5.3 eq) DBU.

Isol. Mat.: 238 mg braungelbes Harz
IR[cm^{-1}]: 3416 (s), 3285 (s), 3100–2800 (s, br), 2800–2500 (m), 2338 (w), 2185 (s), 1946 (m), 1875 (m), 1804 (m), 1727 (s), 1693 (s), 1646 (s), 1611 (s), 1552 (s), 1534 (s), 1516 (s), 1467 (s), 1305 (m), 965 (m), 832 (m), 767 (m), 711 (m), 660 (w), 622 (w).

Die Abspaltung erfolgt nach **AAV2** mit TFA: CH_2Cl_2 : H_2O 90:10:1. Das Rohprodukt wird mit Sepac Kartuschen und präparativer HPLC (C18) aufgereinigt.

Isol. Mat.: 11.7 mg (38.6 μmol , 18%) gelber, amorpher Feststoff
 $^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CDCl_3 , wenig CD_3OD]: δ = 4.17 (d, 2H, J = 3.7Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.23–5.25 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.74–5.80 (m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 7.76–8.26 (m, 4H, arom. H).
LCMS (C18PPN): R_t = 8.50 min, 304.3 [$\text{M}+\text{H}^+$].

4-(2-Allylamino-4-aminothiazol-5-carbonyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 64d

Die Herstellung erfolgt nach **AAV7** mit 251 mg (201 μmol) 4-Bromacetylbenzoesäure an Wang-PS-Harz, 303 mg (1.01 mmol, 5.0 eq) 1-Allyl-3-[(4'-chlorbenzyl)isothioureido]-thioharnstoff, 5 ml DMF und 0.16 ml (1.07 mmol, 5.3 eq) DBU.

Isol. Mat.: 247 mg braunes Harz
IR[cm^{-1}]: 3406 (s, br), 3100–2800 (s, br), 2800–2500 (m), 2335 (w), 2292 (w), 2181 (w), 1945 (m), 1875 (m), 1804 (m), 1722 (s), 1688 (s), 1607 (s), 1547 (s), 1496 (s), 1177 (m), 1027 (m), 964 (m), 829 (m), 710 (m), 660 (w), 622 (w).

Die Abspaltung erfolgt nach **AAV2** mit TFA: CH_2Cl_2 : H_2O 90:10:1. Das Rohprodukt wird mit Sepac Kartuschen und präparativer HPLC (C18) aufgereinigt.

Isol. Mat.: 7.1 mg (23.4 μmol , 11%) braunes Öl
 $^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, CDCl_3 , wenig CD_3OD]: δ = 4.01 (d, J =5.6 Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.28 (dd, J_{cis} = 10.4 Hz, J_2 =1.2 Hz, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_{\text{cis}}\text{H}$), 5.39 (dd, J_{trans} = 17.1 Hz, J_2 =1.2 Hz, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_{\text{trans}}\text{H}$), 5.91–5.97 (m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 7.03–7.93 (m, 4H, arom. H).
LCMS (C18PPN): R_t = 8.20 min, 304.3 [$\text{M}+\text{H}^+$].

2-Amino-4-phenylthiazolyl-5-carbonsäure an Wang-PS-Harz 67

Eine Suspension aus 225 mg (219 μmol) 2-Allylamino-4-phenylthiazolyl-5-carbonsäure an Wang-PS-Harz in 5 ml wasserfreiem THF wird mit 252 mg (1.61 mmol, 7.4 eq) *N,N'*-Dimethylbarbitursäure und 5.2 mg (4.5 μmol , 0.02 eq) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ versetzt und über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Das Harz wird mit je 3 ml THF, THF: H_2O 9:1, DMF, DMF: H_2O 9:1, zweimal mit DMF und dreimal mit CH_2Cl_2 , sowie mit MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen und anschließend am HV getrocknet.

Isol.Mat.: 202 mg hellbraunes Harz

IR $[\text{cm}^{-1}]$: breite Absorptionsbande um 3448 cm^{-1} (NH_2)
3600-3200 (s, br), 3100-2800 (s, br), 1944 (m), 1874 (m), 1803 (m), 1738 (s), 1606 (s), 1545 (m), 1509 (s), 1458 (s), 1376 (s), 1244 (m), 1176 (m), 1111 (m), 1032 (m), 908 (m), 825 (m), 765 (m), 708 (m).

Die Abspaltung erfolgt gemäß **AAV2** mit insgesamt 8 ml TFA: CH_2Cl_2 : H_2O 90:10:1. Das Rohprodukt wird mit Hilfe von Sepac-Kartuschen und präparativer HPLC (C18) aufgereinigt.

Isol.Mat.: 2.8 mg (12.7 μmol) hellgelber, amorpher Feststoff

LCMS: R_t 5.17, 221.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 243.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

3-(2-Amino-4-phenylthiazolyl-5-carbonyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz 66

Eine Suspension aus 454 mg (404 μmol) 3-(2-Allylamino-4-phenylthiazolyl-5-carbonyl)-benzoesäure an Wang-PS-Harz in 5 ml wasserfreiem THF wird mit 262 mg (1.67 mmol, 4.1 eq) *N,N'*-Dimethylbarbitursäure und 5.5 mg (4.8 μmol , 0.01 eq) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ versetzt und über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Das Harz wird mit je 3 ml THF, THF: H_2O 9:1, DMF, DMF: H_2O 9:1, zweimal mit DMF und dreimal mit CH_2Cl_2 , sowie mit MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen und anschließend am HV getrocknet.

Isol.Mat.: 440 mg violettes Harz

IR $[\text{cm}^{-1}]$: breite Absorptionsbande um 3389 cm^{-1} (NH_2)
3600-3200 (m, br), 3100-2800 (s, br), 1944 (m), 1874 (m), 1800 (m), 1737 (s), 1604 (s), 1544 (s), 1510 (s), 1493 (s), 1454 (s), 1375 (s), 1242 (m), 1175 (m), 1109 (m), 1028 (m), 907 (m), 824 (m), 762 (m), 706 (m), 644 (w).

Die Abspaltung erfolgt gemäß **AAV2** mit insgesamt 8 ml TFA: CH_2Cl_2 : H_2O 90:10:1. Das Rohprodukt wird mit Hilfe von Sepac-Kartuschen und präparativer HPLC (C18) aufgereinigt. Die Abspaltung verlief unvollständig, es werden ca. 30% Edukt reisoliert.

Isol.Mat.: <1 mg hellgelber Feststoff

LCMS: R_t 8.73, 325.3 [M+H]⁺ (Edukt: r_t 11.14, 365.3 [M+H]⁺)

5.5 Versuche zu Kapitel 3.2

Probenvorbereitung zur massenspektrometrischen Bestimmung am Harz

Aus der Suspension in MeOH des Harzes im letzten Waschschrift werden mit einer Pipette einige Harzkügelchen entfernt und mit ca. der fünffachen Menge Wasser (bidest) versetzt. Nun kann die Probe mit einer Eppendorf Pipette (Messvolumen ca. 1.5 µl) auf den Träger aufgebracht werden. Die Platte wird in Dunkelheit getrocknet. Die Messungen erfolgen im negativen, linearen Modus. Die Laserintensitäten liegen üblicherweise zwischen 2700 und 3000.

Ist am Molekül eine freie basische Gruppe vorhanden (z. B. Aminogruppe), kann die Signalintensität im negativen Modus durch Zusatz von 1% NH₃ in Wasser erhöht werden.

5.5.2 Versuche zu Kapitel 3.2.2

Fmoc-Alanin an Phenacyl PS Harz

Die Beladung erfolgt nach **AAV8** mit 111mg (67 µmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 68.2 mg (207 µmol, 3.0 eq) Fmoc- Alanin, 7.1 mg (27 µmol, 0.4 eq) Cäsiumiodid und 30 µl (175 µmol, 2.6 eq) DIPEA.

Isol. Mat.: 108 mg weißes Harz

Beladung (Fmoc –Methode^[98]): 0.57 mmol/g (95%)

MS: -

Fmoc-Valin an Phenacyl PS Harz

Die Beladung erfolgt nach **AAV8** mit 102.4 mg (61.4 µmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 66.7 mg (196.5 µmol, 3.2 eq) Fmoc- Valin, 4.8 mg (27 µmol, 0.4 eq) Cäsiumiodid und 31.6 µl (184.6 µmol, 3.0 eq) DIPEA.

Isol. Mat.: 107 mg weißes Harz
Beladung (Fmoc –Methode^[98]): 0.42 mmol/g (73%)
MS: -

Fmoc-Phenylalanin an Phenacyl PS Harz

Die Beladung erfolgt nach **AAV8** mit 101 mg (60.8 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 73.1 mg (189 μmol , 3.1 eq) Fmoc- Phenylalanin, 6.6 mg (25.4 μmol , 0.4 eq) Cäsiumiodid und 31.2 μl (182.3 μmol , 3.0 eq) DIPEA.

Isol. Mat.: 106.5 mg weißes Harz
Beladung (Fmoc –Methode^[98]): 0.46 mmol/g (77%)
MS: -

3-Iodbenzoesäure 71 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 503 mg (302 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 226.2 mg (912 μmol , 3.0 eq) 3-Iodbenzoesäure, 24.3 mg (93.5 μmol , 0.3 eq) Cäsiumiodid und 156 μl (911.3 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 472 mg weißes Harz
MS: 247.6 [M-H]⁻

4-Iodbenzoesäure 72 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 795 mg (477 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 357 mg (1.44 mmol, 3.0 eq) 3-Iodbenzoesäure, 37.6 mg (127 μmol , 0.3 eq) Cäsiumiodid und 250 μl (1.460 mmol, 3.0 eq) DIPEA in 4 ml DMF.

Isol. Mat.: 762 mg weißes Harz
MS: 247.8 [M-H]⁻

Glykolsäure 55 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 27.1 mg (24.9 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 5.8 mg (76.3 μmol , 3.0 eq) Glykolsäure, 3.2 mg (12.3 μmol , 0.49 eq) Cäsiumiodid und 10 μl (58.4 μmol , 2.3 eq) DIPEA in 1.6 ml DMF.

Isol. Mat.: 6.4 mg weißes Harz

MS: 75.8 [M-H]⁻

3,4-Diaminobenzoesäure 89 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 47.7 mg (43.9 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 21.6 mg (139 μmol , 3.0 eq) 3,4-Diaminobenzoesäure, 3.5 mg (13.5 μmol , 0.3 eq) Cäsiumiodid und 20 μl (117 μmol , 2.7 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 26.8 mg weißes Harz

MS: -

4-Chlor-3-nitrobenzoesäure 90 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 34.4 mg (31.6 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 20.6 mg (102 μmol , 3.2 eq) 4-Chlor-3-nitrobenzoesäure, 5.5 mg (21.1 μmol , 0.7 eq) Cäsiumiodid und 20 μl (117 μmol , 3.7 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 15.5 mg weißes Harz

MS: -

6-Chlornicotinsäure 73 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 36.8 mg (33.9 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 17.0 mg (107 μmol , 3.2 eq) 6-Chlornicotinsäure, 4.6 mg (17.7 μmol , 0.5 eq) Cäsiumiodid und 20 μl (117 μmol , 3.5 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 15.5 mg weißes Harz

MS: 156.8 [M-H]⁻

3-Benzoylbenzoesäure 91 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 46.8 mg (43.1 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 30.0 mg (130 μmol , 3 eq) 3-Benzoylbenzoesäure, 4.4 mg (16.9 μmol , 0.4 eq) Cäsiumiodid und 20 μl (117 μmol , 2.7 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 25.2 mg weißes Harz

MS: -

2,5-Dihydroxybenzoesäure 73 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 49.8 mg (45.8 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 22.1 mg (143.4 μmol , 3.1 eq) 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 3.9 mg (15.0 μmol , 0.3 eq) Cäsiumiodid und 24.2 μl (141.4 μmol , 3.1 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 34.6 mg weißes Harz

MS: 153.8 [M-H]⁻

Sebacinsäure 75 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 76.4 mg (45.8 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 27.7 mg (137.0 μmol , 3.0 eq) Sebacinsäure, 4.1 mg (15.8 μmol , 0.3 eq) Cäsiumiodid und 23.5 μl (137.3 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 1 ml DMF.

Isol. Mat.: 55.3 mg weißes Harz

MS: 201.8 [M-H]⁻

5-Bromvaleriansäure 92 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 75.3 mg (45.2 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 24.9 mg (133 μmol , 3.0 eq) 97% 5-Bromvaleriansäure, 4.0 mg (15.4 μmol , 0.3 eq) Cäsiumiodid und 23.2 μl (141 μmol , 3.1 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 34.6 mg weißes Harz

MS: -

10-Undecensäure 76 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 85.0 mg (51.0 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 31.3 mg (133.4 μmol , 3.3 eq) 10-Undecensäure, 4.3 mg (16.6 μmol , 0.3 eq) Cäsiumiodid und 26.2 μl (153.0 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 43.9 mg weißes Harz

MS: 183.8 [M-H]⁻

4-Phenylzimtsäure 77 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 89.2 mg (53.5 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 36.0 mg (156 μmol , 2.9 eq) 97% 4-Phenylzimtsäure, 9.6 mg (37.0 μmol , 0.7 eq) Cäsiumiodid und 27.5 μl (161 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 61.0 mg weißes Harz

MS: 223.7 [M-H]⁻

2-Nitrozimtsäure 43 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 89.9 mg (53.9 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 33.8 mg (175 μmol , 3.2 eq) 2-Nitrozimtsäure, 5.3 mg (20.4 μmol , 0.4 eq) Cäsiumiodid und 27.7 μl (153 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 63.6 mg weißes Harz

MS: -

Adipinsäuremonomethylester 78 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 73.2 mg (43.9 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 23.8 mg (133 μmol , 3.3 eq) 97% Adipinsäuremonomethylester, 3.3 mg (12.7 μmol , 0.3 eq) Cäsiumiodid und 22.6 μl (132 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 49.7 mg weißes Harz

MS: 159.8 [M-H]⁻

2,4-Hexadiensäure 79 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 61.0 mg (36.6 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 14.0 mg (121 μmol , 3.3 eq) 2,4-Hexadiensäure, 4.1 mg (15.8 μmol , 0.4 eq) Cäsiumiodid und 18.8 μl (153 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 44.8 mg weißes Harz

MS: -

Aleuritinsäure 80 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 54.0 mg (32.4 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 32.8 mg (102 μmol , 3.2 eq) 95% Aleuritinsäure, 3.1 mg (11.9 μmol , 0.4 eq) Cäsiumiodid und 16.7 μl (97.6 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 32.1 mg weißes Harz

MS: 303.7 [M-H]⁻

Benzofuran-2-carbonsäure 94 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 50.2 mg (30.1 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 15.0 mg (90.7 μmol , 3.0 eq) Benzofuran-2-carbonsäure, 4.7 mg (18.1 μmol , 0.6 eq) Cäsiumiodid und 15.5 μl (90.5 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2.5 ml DMF.

Isol. Mat.: 24.0 mg weißes Harz

MS: -

4-Bromphenoxyessigsäure 97 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 54.2 mg (32.5 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 23.7 mg (102 μmol , 3.1 eq) 4-Bromphenoxyessigsäure, 4.2 mg (16.2 μmol , 0.5 eq) Cäsiumiodid und 16.7 μl (97.6 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2.5 ml DMF.

Isol. Mat.: 27.9 mg weißes Harz

MS: -

6-Aminopenicillansäure 81 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 53.5 mg (32.1 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 22.5 mg (99.9 μmol , 3.1 eq) 6-Aminopenicillansäure, 2.8 mg (10.8 μmol , 0.3 eq) Cäsiumiodid und 16.5 μl (96.4 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 26.7 mg weißes Harz

MS: 214.8 [M-H]⁻

***trans*-3-Hexensäure 82 an Phenacyl PS Harz**

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 49.5 mg (29.7 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 17.1 mg (145 μmol , 4.9 eq) 97% *trans*-3-Hexensäure, 2.6 mg (10.0 μmol , 0.3 eq) Cäsiumiodid und 15.3 μl (89.4 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 25.5 mg weißes Harz

MS: 113.7 [M-H]⁻

***cis*-2-Amino-1-cyclohexancarbonsäure 83 an Phenacyl PS Harz**

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 50.2 mg (30.1 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 13.4 mg (91.7 μmol , 3.1 eq) *cis*-2-Amino-1-cyclohexancarbonsäure, 2.8 mg (10.8 μmol , 0.4 eq) Cäsiumiodid und 15.5 μl (90.5 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 29.8 mg weißes Harz

MS: 142.9 [M-H]⁻

***trans*-4-(Aminomethyl)-cyclohexancarbonsäure 84 an Phenacyl PS Harz**

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 50.2 mg (30.1 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 14.9 mg (94.8 μmol , 3.1 eq) *trans*-4-(Aminomethyl)-cyclohexancarbonsäure, 2.8 mg (10.8 μmol , 0.4 eq) Cäsiumiodid und 15.5 μl (90.5 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 34.1 mg weißes Harz

MS: 156.8 [M-H]⁻

4-Acetylbuttersäure 85 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 50.5 mg (30.3 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 32.0 mg (246 μmol , 8.1 eq) 4-Acetylbuttersäure, 6.1 mg (23.5 μmol , 0.8 eq) Cäsiumiodid und 15.6 μl (91.1 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 34.1 mg weißes Harz

MS: 129.8 [M-H]⁻

Propiolsäure 94 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 50.7 mg (30.4 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 8.8 mg (123 μmol , 4.0 eq) Propiolsäure, 2.6 mg (10.0 μmol , 0.3 eq) Cäsiumiodid und 15.6 μl (91.1 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 32.0 mg weißes Harz

MS: -

Brenztraubensäure 86 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 50.4 mg (30.2 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 16.6 mg (185 μmol , 6.1 eq) 98% Brenztraubensäure, 2.4 mg (9.2 μmol , 0.3 eq) Cäsiumiodid und 15.5 μl (90.5 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 36.3 mg weißes Harz

MS: 87.7 [M-H]⁻

Acrylsäure 70 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 200.0 mg (120 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 34.4 mg (475 μmol , 4.0 eq) Acrylsäure, 10.6 mg (40.8 μmol , 0.3 eq) Cäsiumiodid und 61.6 μl (360 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 3 ml DMF.

Isol. Mat.: 179.0 mg weißes Harz

MS: 71.6 [M-H]⁻

6-Acetamidohexansäure 87 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 68.4 mg (41.0 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 22.0 mg (126 μmol , 3.1 eq) 6-Acetamidohexansäure, 3.6 mg (13.9 μmol , 0.3 eq) Cäsiumiodid und 21.1 μl (123 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 51.5 mg weißes Harz

MS: 172.8 [M-H]⁻

2-Aminothiazol-4-ylcarbonsäure 96 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 55.1 mg (33.1 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 16.1 mg (110 μmol , 3.3 eq) 2-Aminothiazol-4-ylcarbonsäure, 2.7 mg (10.4 μmol , 0.3 eq) Cäsiumiodid und 17.0 μl (99.3 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 39.8 mg weißes Harz

MS: -

4-Hydroxymethylphenoxyessigsäure 26 an Phenacyl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 95.6 mg (57.4 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 32.5 mg (173 μmol , 3.0 eq) 4-Hydroxymethylphenoxyessigsäure, 7.5 mg (28.9 μmol , 0.5 eq) Cäsiumiodid und 29.5 μl (172 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 2 ml DMF.

Isol. Mat.: 89.0 mg weißes Harz

MS: 181.8 [M-H]⁻

6-Hydroxycapronsäure an Phenacyl PS Harz 101

Die Herstellung erfolgt nach **AAV8** mit 201 mg (120 μmol) bromiertem Phenacyl PS Harz, 55.1 mg (396 μmol , 3.3 eq) 95% 6-Hydroxycapronsäure, 9.1 mg (35.0 μmol , 0.3 eq) Cäsiumiodid und 61.6 μl (360 μmol , 3.0 eq) DIPEA in 1.6 ml DMF.

Isol. Mat.: 158.0 mg weißes Harz

IR[cm^{-1}]: 3434 (m), 3100-2850 (s, br), 1944 (m), 1872 (m), 1803 (m), 1738 (s), 1689 (s), 1601 (s), 1493 (s), 1451 (s), 1371 (s), 1237 (s), 1178 (s), 1070 (m), 1029 (m), 971 (m), 907 (m), 843 (s), 764 (s), 705 (s).

MS: 131.9 [M-H]⁻

Fmoc-Alanin an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV9** mit 120 mg (72 μmol) *o*-Nitroveratryl PS Harz, 120.3 mg (365 μmol , 5 eq) Fmoc-Alanin, 20 μl (251 μmol , 3.5 eq) MeIm und 107.1 mg (361 μmol , 5 eq) MSNT in 1.2 ml CH_2Cl_2 :THF 5:1. Nach Aufarbeitung erfolgt eine zweite Kupplung mit 121 mg (366 μmol , 5 eq) Fmoc-Alanin, 20 μl (251 μmol , 3.5 eq) MeIm und 107 mg (361 μmol , 5 eq) MSNT.

Isol. Mat.: 121.0 mg gelbes Harz

Beladung (Fmoc –Methode^[98]): 0.25 mmol/g (42%)

MS: -

4-Iodbenzoesäure 71 an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Die Herstellung erfolgt gemäß **AAV9** mit 593 mg (356 μmol) *o*-Nitroveratryl PS Harz, 446 mg (1.80 mmol, 5.1 eq) 4-Iodbenzoesäure, 530.1 mg (1.789 mmol, 5.0 eq) MSNT und 0.11 ml (1.39 mmol, 3.89 eq) MeIm in 10 ml wasserfreiem DMF.

Isol. Mat.: 634.6 mg hellgelbes Harz

MS: 247.8 [M-H]⁻

Glykolsäure 55 an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV9** mit 38.9 mg (23.3 μmol) *o*-Nitroveratryl PS Harz, 9.1 mg (120 μmol , 5.2 eq) Glykolsäure, 34.6 mg (117 μmol , 5.0 eq) MSNT und 7 μl (87.8 μmol , 3.77 eq) MeIm in 1.2 ml CH_2Cl_2 :THF 5:1.

Isol. Mat.: 19.3 mg gelbes Harz

MS: -

3,4-Diaminobenzoessäure 89 an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV9** mit 38.0 mg (22.8 μmol) *o*-Nitroveratryl PS Harz, 18.3 mg (117 μmol , 5.1 eq) 3,4-Diaminobenzoessäure, 33.8 mg (114 μmol , 5.0 eq) MSNT und 7 μl (87.8 μmol , 3.85 eq) MeIm in 2.2 ml CH_2Cl_2 :THF 5:6.

Isol. Mat.: 21.9 mg gelbes Harz

MS: -

4-Chlor-3-nitrobenzoesäure 90 an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV9** mit 52.8 mg (31.7 μmol) *o*-Nitroveratryl PS Harz, 33.5 mg (166 μmol , 5.3 eq) 4-Chlor-3-nitrobenzoesäure, 45.3 mg (153 μmol , 4.9 eq) MSNT und 9 μl (113 μmol , 3.56 eq) MeIm in 1.7 ml CH_2Cl_2 :THF 8.5:1.

Isol. Mat.: 34.7 mg gelbes Harz

MS: -

6-Chlornicotinsäure 73 an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV9** mit 37.9 mg (22.7 μmol) *o*-Nitroveratryl PS Harz, 22.6 mg (142 μmol , 6.3 eq) 6-Chlornicotinsäure, 48.0 mg (162 μmol , 7.1 eq) MSNT und 7 μl (87.8 μmol , 3.88 eq) MeIm in 1.5 ml CH_2Cl_2 :THF 7.5:1.

Isol. Mat.: 17.4 mg gelbes Harz

MS: 156.9 [M-H]⁻

3-Benzoylbenzoesäure 91 an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV9** mit 47.2 mg (25.6 μmol) *o*-Nitroveratryl PS Harz, 31.4 mg (136 μmol , 5.3 eq) 3-Benzoylbenzoesäure, 39.5 mg (133 μmol , 5.2 eq) MSNT und 8 μl (100 μmol , 3.92 eq) MeIm in 1.7 ml CH_2Cl_2 :THF 8.5:1.

Isol. Mat.: 17.4 mg gelbes Harz

MS: -

4-Acetylbuttersäure 85 an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV9** mit 88.9 mg (53.3 μmol) *o*-Nitroveratryl PS Harz, 51.0 mg (38.0 μmol , 7.1 eq) 4-Acetylbuttersäure, 80.3 mg (271 μmol , 5.1 eq) MSNT und 16.0 μl (201 μmol , 3.77 eq) MeIm in 2 ml CH_2Cl_2 .

Isol. Mat.: 67.9 mg gelbes Harz

MS: -

5-Bromvaleriansäure 92 an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV9** mit 86.3 mg (51.8 μmol) *o*-Nitroveratryl PS Harz, 50.0 mg (276 μmol , 5.3 eq) 5-Bromvaleriansäure, 76.2 mg (257 μmol , 5.0 eq) MSNT und 15.5 μl (100 μmol , 3.92 eq) MeIm in 1.7 ml CH_2Cl_2 :THF 8.5:1.

Isol. Mat.: 62.4 mg gelbes Harz

MS: -

10-Undecensäure 75 an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV9** mit 93.2 mg (55.9 μmol) *o*-Nitroveratryl PS Harz, 57.5 mg (303 μmol , 5.3 eq) 97% 10-Undecensäure, 87.9 mg (296.6 μmol , 5.3 eq) MSNT und 16.7 μl (210 μmol , 3.75 eq) MeIm in 2 ml CH_2Cl_2 .

Isol. Mat.: 77.1 mg gelbes Harz

MS: -

4-Phenylzimtsäure 77 an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV9** mit 95.1 mg (57.1 μmol) *o*-Nitroveratryl PS Harz, 68.7 mg (297 μmol , 5.2 eq) 4-Phenylzimtsäure, 108.3 mg (366 μmol , 6.4 eq) MSNT und 17.1 μl (215 μmol , 3.76 eq) MeIm in 1.2 ml CH_2Cl_2 :THF 5:1 mit 5 Tropfen DMF.

Isol. Mat.: 77.0 mg gelbes Harz

MS: -

2-Nitrozimtsäure 43 an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV9** mit 86.5 mg (51.9 μmol) *o*-Nitroveratryl PS Harz, 51.2 mg (257 μmol , 5.0 eq) 2-Nitrozimtsäure, 84.9 mg (287 μmol , 5.5 eq) MSNT und 15.5 μl (194 μmol , 3.92 eq) MeIm in 3 ml CH_2Cl_2 :THF 2:1 mit 10 Tropfen DMF.

Isol. Mat.: 70.1 mg gelbes Harz

MS: -

Adipinsäuremonomethylester 78 an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV9** mit 87.7 mg (52.6 μmol) *o*-Nitroveratryl PS Harz, 53.6 mg (325 μmol , 6.2 eq) Adipinsäuremonomethylester, 81.4 mg (275 μmol , 5.2 eq) MSNT und 15.7 μl (100 μmol , 3.92 eq) MeIm in 1.2 ml CH_2Cl_2 :THF 5:1.

Isol. Mat.: 65.1 mg gelbes Harz

MS: -

2,5-Dihydroxybenzoesäure 74 an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV9** mit 49.8 mg (29.9 μmol) *o*-Nitroveratryl PS Harz, 47.4 mg (308 μmol , 10.3 eq) 2,5-Dihydroxybenzoesäure, 23.7 μl (153 μmol , 5.1 eq) DIC und 1.8 mg (14.7 μmol , 0.5 eq) DMAP in 3 ml CH_2Cl_2 , 1 ml THF und wenig DMF.

Isol. Mat.: 30.2 mg gelbes Harz

MS: 153.8 [M-H]⁻

Aleuritinsäure 80 an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV9** mit 51.9 mg (31.1 μmol) *o*-Nitroveratryl PS Harz, 99.8 mg (311 μmol , 10.0 eq) 95% Aleuritinsäure, 24.2 μl (156 μmol , 5.0 eq) DIC und 1.9 mg (15.6 μmol , 0.5 eq) DMAP in 3 ml DMF.

Isol. Mat.: 29.2 mg gelbes Harz

MS: -

2,4-Hexadiensäure 79 an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Die Herstellung erfolgt nach **AAV9** mit 50.6 mg (30.4 μmol) *o*-Nitroveratryl PS Harz, 34.4 mg (307 μmol , 10.1 eq) 2,4-Hexadiensäure, 23.8 μl (154 μmol , 5.1 eq) DIC und 1.8 mg (14.7 μmol , 0.5 eq) DMAP in 3 ml CH_2Cl_2 , 1 ml THF und wenig DMF.

Isol. Mat.: 33.6 mg gelbes Harz

MS: 223.9 [2M-H]⁻, 447.9 [4M-H]⁻

5.5.3 Versuche zu Kapitel 3.2.3

Fmoc-Abz-Ala an *o*-Nitroveratryl PS Harz

Eine Suspension von 121 mg (30.3 μmol) Fmoc-Alanin an *o*-Nitroveratryl PS Harz in 3 ml 20% Piperidin in DMF wird 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die überstehende Lösung wird abfiltriert und das Harz erneut in 3 ml 20% Piperidin in DMF suspendiert. Wiederum wird 10 min bei RT geschüttelt. Die überstehende Lösung wird abfiltriert und das Harz viermal mit je 3 ml DMF gewaschen und in 1.5 ml DMF suspendiert. Zeitgleich wird eine Lösung von 54.0 mg (150 μmol , 5.0 eq) Fmoc-Anthranilsäure, 38.2 mg (249 μmol , 8.2 eq) HOBt und 55.6 mg (147 μmol , 4.8 eq) HBTU in 1.5 ml DMF bereitet. Ca. 2 min nach Zugabe von 50.0 μl (292 μl , 9.6 eq) DIPEA wird die voraktivierte Säure zum Harz gegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird das Harz zweimal mit je 3 ml DMF und nacheinander mit je 3 ml CH_2Cl_2 , MeOH, CH_2Cl_2 , MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen. Das Produkt wird am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 99.6 mg gelbes Harz

Beladung (Fmoc –Methode^[98]): 0.22 mmol/g (37%)

H-Abz-Ala an *o*-Nitroveratryl PS Harz 103a

Eine Suspension von 99.6 mg Harz in 2.5 ml 20% Piperidin in DMF wird 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die überstehende Lösung wird abfiltriert und das Harz erneut in 2.5 ml 20% Piperidin in DMF suspendiert und geschüttelt. Nach weiteren 15 min wird die überstehende Lösung abfiltriert und das Harz zweimal mit je 3 ml DMF, dreimal mit je 3 ml CH_2Cl_2 und nacheinander mit je 3 ml MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen. Das Harz wird am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 92.6 mg gelbes Harz

MS: 207.8 [M-H]⁻

3-Methyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo(e)-[1,4]-diazepin-2,5-dion^[138] 104a

Eine Suspension von 92.6 mg (20.4 μmol) H-Abz-Ala an *o*-Nitroveratryl PS Harz in 1.5 ml wasserfreiem THF wird mit 4.3 mg (44.7 μmol , 2.2 eq) NaOtBu versetzt und auf 70 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach 24 h wird das Ölbad entfernt und das Harz zweimal mit je 3 ml wasserfreiem THF, dreimal mit je 3 ml CH_2Cl_2 und nacheinander mit je 3 ml MeOH, CH_2Cl_2 ,

EtOAc und MeOH gewaschen. Das Filtrat wird eingengt und der Rückstand am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 2.8 mg (14.8 μmol , 73%) weißer Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, D_2O]: es findet sich eine Verunreinigung von ca. 30% des offenkettigen Amids; δ = 1.32 (d, J =7.2 Hz, 3H, Me), 4.22 (q, J = 7.2 Hz, 1H, $\alpha\text{C-H}$), 6.73 – 6.79 (m, 2H, arom. H), 7.23 (t, J =7.8 Hz, 1H, arom. H), 7.40 (d, J = 7.5 Hz, 1H, arom. H).

HPLC (C18PPN): R_t = 4.60 (offenkettiges Amid), R_t = 5.25 (Produkt).

Fmoc-Abz-Val-OH an *o*-Nitroveratryl PS Harz 103b

Eine Suspension von 213.6 mg (38.4 μmol) Fmoc-Valin an *o*-Nitroveratryl PS Harz wird insgesamt viermal in 2 ml 20% Piperidin in DMF 5 min bei RT geschüttelt. Das entschützte immobilisierte Valin wird noch viermal mit je 2 ml DMF gewaschen. Eine Lösung von 70.6 mg (193 μmol , 5.0 eq) Fmoc-Anthranilsäure und 72.3 mg (190 μmol , 4.95 eq) HATU und 42.2 mg (276 μmol , 7.2 eq) HOBt in 1.5 ml DMF wird mit 32.9 μl (192 μmol , 5.0 eq) DIPEA voraktiviert und nach 2 min zum Harz gegeben. Das Gemisch wird 2.5 h bei RT geschüttelt und anschließend das Harz zweimal mit je 2 ml DMF, dreimal mit je 2 ml CH_2Cl_2 und nacheinander mit je 2 ml MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen. Da der Kaiser Test noch freie NH_2 -Gruppen anzeigt, wird die Kupplung noch einmal mit je 70.5 mg (196 μmol , 5.1 eq) Fmoc-Anthranilsäure, 71.2 mg (187 μmol , 4.9 eq) HATU, 42.7 mg (279 μmol , 7.3 eq) HOBt und 32.9 μl (192 μmol , 5.0 eq) DIPEA wiederholt. Das Harz wird zweimal mit je 2 ml DMF, dreimal mit je 2 ml CH_2Cl_2 und nacheinander mit je 2 ml MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen. Das Harz wird wiederum viermal nacheinander mit je 2 ml 20% Piperidin in DMF 5 min bei RT geschüttelt und anschließend zweimal mit je 2 ml DMF, dreimal mit je 2 ml CH_2Cl_2 und nacheinander mit je 2 ml MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen. Das Harz wird am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 199.7 mg (32.0 μmol) gelbes Harz

Beladung (Fmoc –Methode^[98]): 0.16 mmol/g (70%)

MS: 235.6 [M-H]⁺

3-iso-Propyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo(e)-[1,4]-diazepin-2,5-dion^[138] 104b

Eine Suspension von 199 mg (31.8 μmol) H-Abz-Val an *o*-Nitroveratryl PS Harz in 3 ml wasserfreiem THF wird mit 7.6 mg (79.1 μmol , 2.5 eq) NaOtBu versetzt und auf 70 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach 24 h wird das Ölbad entfernt und das Harz zweimal mit je 3 ml

wasserfreiem THF, dreimal mit je 3 ml CH₂Cl₂ und nacheinander mit je 3 ml MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen. Das Filtrat wird eingengt und der Rückstand am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 4.7 mg (21.5 μmol, 68%) weißer Feststoff

¹H-NMR[400 MHz, D₂O]: es findet sich eine Verunreinigung von ca. 10% des offenkettigen Amids; δ= 1.04 (d, J=6.8 Hz, 6H, 2 Me), 2.56-2.63 (m, 1H, -CH(CH₃)), 3.90-3.93 (m, 1H, αCH), 6.73-6.75 (m, 1H, arom. H), 6.90-6.94 (m, 1H, arom. H), 7.12-7.20 (m, 2H, arom. H), 7.53 (d, J=7.4 Hz, 1H, arom. H).

Fmoc-Abz-Phe-OH an *o*-Nitroveratryl PS Harz 103c

Eine Suspension von 225 mg (54.1 μmol) Fmoc-Phenylalanin an *o*-Nitroveratryl PS Harz in 2 ml 20% Piperidin in DMF wird insgesamt viermal 5 min bei RT geschüttelt. Das entschützte immobilisierte Phenylalanin wird noch viermal mit je 2 ml DMF gewaschen. Eine Lösung von 99.2 mg (271 μmol, 5.0 eq) Fmoc-Anthranilsäure, 100.9 mg (265 μmol, 4.9 eq) HATU und 58.3 mg (380 μmol, 7.0 eq) HOBt in 1.5 ml DMF wird mit 46.4 μl (270 μmol, 5.0 eq) DIPEA voraktiviert und nach 2 min zum Harz gegeben. Das Gemisch wird 2.5 h bei RT geschüttelt und anschließend das Harz zweimal mit je 2 ml DMF, dreimal mit je 2 ml CH₂Cl₂ und nacheinander mit je 2 ml MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen. Die Kupplung wird noch einmal mit 99.2 mg (271 μmol, 5.0 eq) Fmoc-Anthranilsäure, 101 mg (265 μmol, 4.9 eq) HATU, 59.6 mg (389 μmol, 7.2 eq) HOBt und 46.4 μl (270 μmol, 5.0 eq) DIPEA in 1.5 ml DMF wiederholt.

Das Harz wird nach 1 h nacheinander dreimal mit je 2 ml DMF und CH₂Cl₂ und dann mit MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen. Wiederum wird das Harz viermal in 2 ml 20% Piperidin in DMF suspendiert und 5 min bei RT geschüttelt. Anschließend wird das Harz zweimal mit je 2 ml DMF, dreimal mit je 2 ml CH₂Cl₂ und nacheinander mit je 2 ml MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen.

Isol. Mat.: 230 mg (48.3 μmol) gelbes Harz

Beladung (Fmoc –Methode^[98]): 0.21 mmol/g

MS: 283.8 [M-H]⁺

3-Benzyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo(e)-[1,4]-diazepin-2,5-dion^[138] 104c

Eine Suspension von 230 mg (48.3 μmol) H-Abz-Phe an *o*-Nitroveratryl PS Harz in 3 ml wasserfreiem THF wird mit 7.6 mg (79.1 μmol, 2.5 eq) NaOtBu versetzt und auf 70 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach 24 h wird das Ölbad entfernt und das Harz zweimal mit je 3 ml

wasserfreiem THF, dreimal mit je 3 ml CH₂Cl₂ und nacheinander mit je 3 ml MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen. Das Filtrat wird eingengt und der Rückstand am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 8.0 mg (35.4 μmol, 73%) weißer Feststoff

¹H-NMR[400 MHz, D₂O]: δ= 3.86-3.89 (m, 1H, αCH), 5.71-5.72 (m, 2H, -CH₂Ph), 7.08 (d, J= 7.6 Hz, 1H, arom. H), 7.16-7.25 (m, 5H, Phenyl), 7.29 (d, J=8.0 Hz, 1H, arom. H), 7.48 (dd, J₁=J₂= 7.6 Hz, 1H, arom. H), 7.65 (dd, J₁= 8.0 Hz, J₂= 1.6 Hz, 1H, arom. H).

4'-Methoxybiphenyl-3-carbonsäure an Phenacyl PS Harz 105a

Die Herstellung erfolgt nach **AAV10** mit 200 mg (190 μmol) 4-Iodbenzoesäure an Phenacyl PS Harz mit 190.3 mg (1.22 mmol, 6.4 eq) 4-Methoxyphenylboronsäure, 90.6 mg (427 μmol, 2.3 eq) K₃PO₄*3H₂O und 5 ml DMF: H₂O 6:1.

Isol. Mat.: 167.2 mg graues Harz

MS: 227.9 [M-H]⁻

Das Harz wird zweimal mit je 2 ml DMF gewaschen und anschließend in 2 ml 5% Hydrazin Hydrat in DMF (v/v) suspendiert. Die Suspension wird 2 h bei Raumtemperatur am Orbitalschüttler durchmischt und das Harz anschließend zweimal mit je 2 ml DMF und dreimal mit je 2 ml CH₂Cl₂, sowie nacheinander mit je 2 ml MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen. Das Filtrat wird zur Trockene eingengt (HV wg. DMF).

Isol. Mat.: 10.5 mg (43.4 μmol, 49%) weißer Feststoff

¹H-NMR[400MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: δ= 3.58 (s, 3H, -CH₃), 6.83 (d, J= 8.7 Hz, 2H, arom. H), 7.45-7.55 (m, 4H, arom. H), 7.89 (d, J= 8.9 Hz, 2H, arom. H).

4'-Methoxybiphenyl-4-carbonsäure an Phenacyl PS Harz 106a

Die Herstellung erfolgt nach **AAV10** mit 207 mg (124 μmol) 4-Iodbenzoesäure an Phenacyl PS Harz mit 190 mg (1.25 mmol, 10.1 eq) 4-Methoxyphenylboronsäure, 52.8 mg (249 μmol, 2.0 eq) K₃PO₄*3H₂O und 4.9 ml DMF:H₂O 6:1.

Isol. Mat.: 197.5 mg graues Harz

MS: 227.9 [M-H]⁻

Das Harz wird zweimal mit je 2 ml DMF gewaschen und anschließend in 2 ml 5% Hydrazin Hydrat in DMF (v/v) suspendiert. Die Suspension wird 2 h bei Raumtemperatur am Orbitalschüttler durchmischt und das Harz anschließend zweimal mit je 2 ml DMF und dreimal mit je 2 ml CH₂Cl₂, sowie nacheinander mit je 2 ml MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen. Das Filtrat wird zur Trockene eingengt (HV wg. DMF).

Isol. Mat.: 10.6 mg (44.0 μ mol, 42%) weißer Feststoff

¹H-NMR[400MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: δ = 3.44 (s, 3H, -CH₃), 6.74 (d, J= 9.1 Hz, 2H, arom. H), 7.40-7.49 (m, 3H, arom. H), 7.71-7.74 (m, 1H, arom. H), 7.88-7.91 (m, 1H, arom. H), 8.17 (s, 1H, arom. H).

LCMS(C18): R_t 8.24, 227.1 [M-H]⁻

4'-Acetylbiphenyl-3-carbonsäure an Phenacyl PS Harz 105b

Die Herstellung erfolgt nach **AAV10** mit 201 mg (189 μ mol) 3-Iodbenzoesäure an Phenacyl PS Harz mit 198.9 mg (1.21 mmol, 6.4 eq) 3-Acetylphenylboronsäure, 88.0 mg (415 μ mol, 2.2 eq) K₃PO₄*3H₂O und 5 ml DMF:H₂O 6:1.

Isol. Mat.: 178.2 mg graues Harz

MS: 239.8 [M-H]⁻

Das Produkt wird in 3 ml 1% Ethanolamin in THF unter Argon suspendiert und mit einer Hg-Dampflampe über Nacht bestrahlt. Das Harz wird zweimal mit je 3 ml THF, zweimal mit je 3 ml CH₂Cl₂ und nacheinander mit je 3 ml MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen. Das Filtrat wird eingengt. Der Rückstand wird am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 9.3 mg (38.7 μ mol, 41%) weißer Feststoff

¹H-NMR[400MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: δ = 2.55 (s, 3H, -CH₃), 7.53-7.62 (m, 3H, arom. H), 7.80-7.93 (m, 3H, arom. H), 8.09 (dd, J₁= 8.7 Hz, J₂= 1.4 Hz, 1H, arom. H), 8.35 (s, 1H, arom. H).

LCMS(C18PPN): R_t 10.42 min; 239.1 [M-H]⁻

4'-Acetylbiphenyl-4-carbonsäure an Phenacyl PS Harz 106b

Die Herstellung erfolgt nach **AAV10** mit 99.1 mg (79.3 μ mol) 4-Iodbenzoesäure an Phenacyl PS Harz mit 136 mg (806 μ mol, 10.2 eq) 4-Acetylphenylboronsäure, 34.1 mg (161 μ mol, 2.0 eq) K₃PO₄*3H₂O und 3.5 ml DMF: H₂O 6:1.

Isol. Mat.: 92.1 mg graues Harz

MS: 239.6 [M-H]⁻

Das Produkt wird in 3 ml 1% Ethanolamin in THF unter Argon suspendiert und mit einer Hg-Dampflampe über Nacht bestrahlt. Das Harz wird zweimal mit je 3 ml THF, zweimal mit je 3 ml CH₂Cl₂ und nacheinander mit je 3 ml MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen. Das Filtrat wird eingengt. Der Rückstand wird am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 4.8 mg (20.0 μmol, 41%) weißer Feststoff

¹H-NMR[400MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: δ= 2.58 (s, 3H, -CH₃), 7.59-7.70 (m, 4H, arom. H), 7.93 (d, J=8.6 Hz, 2H, arom. H), 8.22 (d, J=8.4 Hz, 2H, arom. H)

LCMS(C18PPN): R_t 7.42 min; 239.1 [M-H]⁻

3'-Acetylbiphenyl-3-carbonsäure an Phenacyl PS Harz 105c

Die Herstellung erfolgt nach **AAV10** mit 73.5 mg (44.1 μmol) 3-Iodbenzoesäure an Phenacyl PS Harz mit 73.9 mg (442 μmol, 10.0 eq) 3-Acetylphenylboronsäure, 20.8 mg (98 μmol, 2.2 eq) K₃PO₄*3H₂O und 4.9 ml DMF:H₂O 6:1.

Isol. Mat.: 55.6 mg graues Harz

MS: 239.8 [M-H]⁻

Das Produkt wird in 3 ml 1% Ethanolamin in THF unter Argon suspendiert und mit einer Hg-Dampflampe über Nacht bestrahlt. Das Harz wird zweimal mit je 3 ml THF, zweimal mit je 3 ml CH₂Cl₂ und nacheinander mit je 3 ml MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen. Das Filtrat wird eingengt. Der Rückstand wird am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 2.8 mg (11.5 μmol, 39%) weißer Feststoff

¹H-NMR[400MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: δ= 2.54 (s, 3H, -CH₃), 7.43-7.57 (m, 3H, arom. H), 7.80-7.85 (m, 2H, arom. H), 8.08-8.11 (m, 2H, arom. H), 8.38 (s, 2H, arom. H).

LCMS(C18PPN): r_t 11.54 min; 239.1 [M-H]⁻

3'-Acetylbiphenyl-4-carbonsäure an Phenacyl PS Harz 106c

Die Herstellung erfolgt nach **AAV10** mit 255 mg (239 μmol) 4-Iodbenzoesäure an Phenacyl PS Harz mit 254 mg (1.55 mmol, 6.5 eq) 3-Acetylphenylboronsäure, 81.0 mg (382 μmol, 1.6 eq) K₃PO₄*3H₂O und 5 ml DMF: H₂O 6:1.

Isol. Mat.: 114.1 mg graues Harz

MS: 239.6 [M-H]⁻

Das Produkt wird in 3 ml 1% Ethanolamin in THF unter Argon suspendiert und mit einer Hg-Dampflampe über Nacht bestrahlt. Das Harz wird zweimal mit je 3 ml THF, zweimal mit je 3 ml CH₂Cl₂ und nacheinander mit je 3 ml MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen. Das Filtrat wird eingengt. Der Rückstand wird am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 3.2 mg (13.3 μmol, 22%) weißer Feststoff

¹H-NMR[400MHz, CDCl₃, wenig CD₃OD]: δ= 2.56 (s, 3H, -CH₃), 7.41-7.43 (m, 1H, arom. H), 7.66-7.70 (m, 3H, arom. H), 7.82-7.84 (m, 1H, arom. H), 8.11-8.20 (m, 3H, arom. H)

LCMS(C18PPN): R_t 10.35 min; 239.1 [M-H]⁻

4-Phenoxybiphenyl-3'-carbonsäure an Phenacyl PS Harz 105d

Die Herstellung erfolgt nach **AAV10** mit 63.0 mg (37.8 μmol) 3-Iodbenzoesäure an Phenacyl PS Harz mit 80.5 mg (376.1 μmol, 9.9 eq) 4-Phenoxyphenylboronsäure, 21.6 mg (101.8 μmol, 2.7 eq) K₃PO₄*3H₂O und 4.5 ml DMF: H₂O 6:1.

Isol. Mat.: 35.7 mg graues Harz

MS: kein Signal

Das Produkt wird in 3 ml 1% Ethanolamin in THF suspendiert und mit einer Hg-Dampflampe über Nacht bestrahlt. Das Harz wird zweimal mit je 3 ml THF, zweimal mit je 3 ml CH₂Cl₂ und nacheinander mit je 3 ml MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen. Das Filtrat wird eingengt. Der Rückstand wird am HV getrocknet.

Isol. Mat.: <1 mg weißer Feststoff

LCMS(C18PPN): r_t 7.23 min; 289.1 [M-H]⁻

4-Phenoxybiphenyl-4'-carbonsäure an Phenacyl PS Harz 106d

Die Herstellung erfolgt nach **AAV10** mit 80.5 mg (78.9 μmol) 4-Iodbenzoesäure an Phenacyl PS Harz mit 104.5 mg (488.3 μmol, 6.2 eq) 4-Phenoxyphenylboronsäure, 21.4 mg (100.8 μmol, 1.3 eq) K₃PO₄*3H₂O und 4.5 ml DMF: H₂O 6:1.

Isol. Mat.: 55.7 mg graues Harz

MS: kein Signal

Das Produkt wird in 3 ml 1% Ethanolamin in THF suspendiert und mit einer Hg-Dampfampe über Nacht bestrahlt. Das Harz wird zweimal mit je 3 ml THF, zweimal mit je 3 ml CH₂Cl₂ und nacheinander mit je 3 ml MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen. Das Filtrat wird eingengt. Der Rückstand wird am HV getrocknet.

Isol. Mat.: <1 mg weißer Feststoff

LCMS(C18PPN): R_t 10.79 min; 289.1 [M-H]⁻

6-Oxohexancarbonsäure an Phenacyl PS Harz 102

Eine Suspension aus 158 mg (82.0 µmol) 6-Hydroxyhexansäure an Phenacyl PS Harz in 1 ml wasserfreiem THF wird mit einer Lösung von 118.4 mg (423 µmol, 5.2 eq) IBX in 1.3 ml wasserfreiem DMSO versetzt. Das Gemisch wird 24 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird das Harz mit je 3 ml DMSO, dreimal mit je 5 ml DMSO:THF 1:1, dreimal mit je 3 ml CH₂Cl₂ und nacheinander mit je 3 ml MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen. Das Harz wird am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 145.8 mg weißes Harz

IR[cm⁻¹]: 3432 (m), 3100-2850 (s, br), 2720 (m), 1944 (m), 1870 (m), 1802 (m), 1735 (s), 1697 (s), 1602 (s), 1508 (s), 1492 (s), 1452 (s), 1420 (m), 1372 (s), 1309 (w), 1237 (s), 1179 (s), 1133 (m), 1088 (m), 1029 (m), 972 (m), 907 (m), 843 (m), 763 (s), 705 (s).

MS: 129.9 [M-H]⁻

Beladung (DNPH-Methode): 0.42 mmol/g (70% über zwei Stufen)

Methylrot-Test: negativ

6-Hydroxy-8-nonencarbonsäure an Phenacyl PS Harz 112

Eine auf -30 °C gekühlte Suspension von 127 mg (53.3 µmol) 6-Oxohexancarbonsäure an Phenacyl PS Harz in 3 ml wasserfreiem THF wird mit 0.76 ml (1.52 mmol, 28.5 eq) 2 M Allylmagnesiumchlorid in THF versetzt. Die Suspension wird vorsichtig bei -30 °C über Nacht gerührt. Durch Zugabe von 5 ml MeOH wird die Reaktion anschließend abgefangen. Das Harz wird mit 5 ml CH₂Cl₂, zweimal mit je 3 ml DMF, dreimal mit je 3 ml CH₂Cl₂ und nacheinander mit je 3 ml MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen und am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 145.8 mg weißes Harz
IR[cm^{-1}]: 3430(s, br), 3100-2850 (s, br), 2803 (w), 1943 (m), 1872 (m), 1803 (m), 1738 (s), 1687 (s), 1601 (s), 1493 (s), 1451 (s), 1372 (s), 1241 (s), 1180 (s), 1068 (m), 1028 (m), 966 (m), 908 (m), 830 (m), 764 (s), 705 (s).
Methylrot-Test: positiv
MS: 171.9 [M-H]⁺

6-Oxohexancarbonsäure 109

Eine Lösung von 0.40 ml (4.66 mmol, 1.04 eq) Oxalylchlorid in 4.3 ml wasserfreiem CH_2Cl_2 wird auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Zur Lösung werden 0.66 ml (9.29 mmol, 2.08 eq) DMSO in 1 ml wasserfreiem CH_2Cl_2 über 20 min getropft. Nach weiteren 20 min wird dazu eine Lösung aus 622.8 mg (4.48 mmol) 95% 6-Hydroxyhexansäure in 3.3 ml wasserfreiem CH_2Cl_2 gegeben. Nach weiteren 30 min werden 2.7 ml (19.4 mmol, 4.3 eq) wasserfreiem Triethylamin zugesetzt (sofortige Niederschlagsbildung). Nach 2.5 h wird das Eisbad entfernt und die Reaktion mit 2 ml Wasser abgefangen. Das Reaktionsgemisch wird in 50 ml CH_2Cl_2 und in 50 ml 1 N HCl_{aq} mit etwas Eis aufgenommen. Die wässrige Phase wird zehnmal mit insgesamt 500 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Die organischen Phasen werden mit etwa 100 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend werden die wässrigen Phasen noch fünfmal mit insgesamt 250 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und verdampfer bis zur Trockene eingeeengt. Der gelblich ölige Rückstand wird in zweimal je 450 ml Wasser aufgenommen und anschließend gefriergetrocknet.

Isol. Mat.: 412 mg (3.16 mmol, 68%) gelbliches Öl
Roh- ^1H -NMR[400 MHz, CDCl_3]: Verunreinigung durch DMSO, CH_2Cl_2 , TEA; δ = 1.33-1.38 (m, 2H, $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 1.58-1.66 (m, 4H, $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$), 2.25-2.34 (m, 2H, $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$), 9.73 (m, 1H, -CHO).
Roh- ^{13}C -NMR[100.6 MHz, CDCl_3]: δ = 201.9 (1C, -CHO), 172.8 (1C, -COOH), 43.3 (1C, $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$), 33.8 (1C, $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$), 25.4 (1C, $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$), 21.3 (1C, $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$).

Das Rohprodukt wird ohne weitere Charakterisierung umgesetzt.

6-Hydroxy-8-nonencarbonsäure 110

Eine auf $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlte Lösung von 504 mg (3.87 mmol) 6-Oxohexancarbonsäure in 6 ml wasserfreiem THF wird mit 3.8 ml (7.6 mmol, 2.0 eq) 2 M Allylmagnesiumchlorid in THF

versetzt. Das Gemisch wird 3 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Die Reaktion wird mit 2 ml MeOH abgefangen und in 50 ml 10% Citronensäure_{aq} und 50 ml EtOAc aufgenommen. Die wässrige Phase wird insgesamt zehnmal mit je 20 ml EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen werden mit 50 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 20 ml EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgt durch FC (LM CyH:EtOAc 3:1), das Rohprodukt wird dafür auf Kieselgel aufgezogen.

Isol. Mat.: 307 mg (4.58 mmol, 46%) farbloses Öl

R_f: 0.19 (LM CyH:EtOAc 2:1)

¹H-NMR[400 MHz, CDCl_3]: δ = 1.36- 1.47 (m, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-$), 1.57-1.61 (m, 2H, $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.71 (m, 2H, $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.19 (d, $J=7.8$ Hz, $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 3.65 (t, $J=6.6$ Hz, 1H, $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.09-5.16 (m, 2H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.79-5.90 (m, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$).

¹³C-NMR[100.6 MHz, CDCl_3]: δ = 176.5 (1C, $\text{HOOC}-$), 133.5 (1C, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 118.3 (1C, $-\text{CH}=\text{CH}_2$), 62.6 (1C, $-\text{CH}(\text{OH})-$), 43.7 (1C, $-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 39.0 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$), 32.5 (1C, $\text{HOOC}-\text{CH}_2-$), 26.3 (1C, $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 23.1 (1C, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-$).

MS (FAB, Triethanolamin): 170.99 [M-H]⁻

HRMS (FAB, Triethanolamin) für $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_3$ [M-H]⁻: ber.: 171.1021
gef.: 171.1041

6-Acryloyl-8-nonencarbonsäure 111

Eine Lösung von 162.0 mg (941 μmol) 6-Hydroxy-8-nonencarbonsäure in 4.5 ml wasserfreiem CH_2Cl_2 wird mit 33.5 mg (272 μmol , 0.3 eq) DMAP in 0.5 ml wasserfreiem CH_2Cl_2 versetzt. Die Lösung wird auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und mit 0.36 ml (4.66 mmol, 4.9 eq) Acryloylchlorid versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 2 h bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Die Reaktion wird mit 2 ml MeOH abgefangen. Das Gemisch wird in 20 ml CH_2Cl_2 und 15 ml 1 N HCl_{aq} aufgenommen und die wässrige Phase zehnmal mit insgesamt 150 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Die organischen Phasen werden mit 20 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen und aus der wässrigen Phase fünfmal mit insgesamt 80 ml CH_2Cl_2 rückextrahiert. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Die weitere Aufreinigung erfolgt über FC (LM CyH:EtOAc 3:1), dabei wird das Rohprodukt auf Kieselgel aufgezogen.

Isol. Mat.: 103.6 mg (49%) farbloses Öl

R_f: 0.27 (LM CyH:EtOAc 2:1)

¹H-NMR[400 MHz, CDCl_3]: δ = 1.38- 1.46 (m, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OR})-$), 1.67 (t, $J=6.4$ Hz, 2H, $\text{HOOC}-\text{CH}_2-$), 1.75 (m, 2H, $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.22 (dd, $J_1=1.2$ Hz, $J_2=$

7.4 Hz, 2H, -CH(OR)-CH₂-CH=CH₂), 4.13-4.17 (m, 1H, -CH(OR)-CH₂-), 5.09-5.15 (m, 2H, -CH(OR)-CH₂-CH=CH₂), 5.79-5.90 (m, 2H, -C(=O)-CH=CH₂, -C(=O)-CH=CH_{cis}H), 6.12 (dd, J(cis)= 10.2 Hz, J(trans)= 17.6 Hz, 1H, -CH₂-CH=CH₂), 6.39 (d, J(trans)= 17.3 Hz, 1H, -C(=O)-CH=CH_{trans}H).

¹³C-NMR[100.6 MHz, CDCl₃]: δ= 170.0 (1C, HOOC-), 165.9 (1C, -O-C(=O)-CH=CH₂), 133.5 (1C, -O-C(=O)-CH=CH₂), 130.3 (1C, -O-C(=O)-CH=CH₂), 128.3 (1C, -CH₂-CH=CH₂), 118.4 (1C, -CH₂-CH=CH₂), 64.4 (1C, -CH(OH)-CH₂-CH=CH₂), 43.7 (1C, -CH(OH)-CH₂-CH=CH₂), 39.0 (1C, HOOC-CH₂-), 28.5 (1C, -CH₂-CH(OR)-CH₂-), 26.4 (1C, HOOC-CH₂-CH₂-), 23.0 (1C, -CH₂-CH₂-CH(OR)-).

LCMS (C4): R_t= 13.50 min, 225.1 [M-H]⁻

5.5.4 Versuche zu Kapitel 3.2.4

Fmoc-Lys-OAll an *o*-Nitroveratryl PS Harz 114

Eine Suspension von 132 mg (79.1 μmol) *o*-Nitroveratryl PS Harz in 1 ml wasserfreiem DMF wird unter Argon mit einer Lösung von 59.5 mg (356 μmol, 4.5 eq) 97% Carbonyldiimidazol in 0.5 ml wasserfreiem DMF versetzt. Das Gemisch wird bei RT über Nacht geschüttelt. Das überschüssige Carbonyldiimidazol wird mit 11.3 μl (277 μmol, 3.5 eq) Methanol abgefangen und die Suspension mit einer Lösung von 309.4 mg (729 μmol, 9.2 eq) Fmoc-Lys-Oall in 1 ml wasserfreiem DMF versetzt. Das Gemisch wird über Nacht bei RT am Orbitalschüttler durchmischt. Das Harz wird zweimal mit je 2 ml DMF und dreimal mit CH₂Cl₂, sowie mit MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc und MeOH gewaschen und am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 131.4 mg (23.7 μmol, 30%) gelbes Harz

Beladung^[98]: 0.18 mmol/g

H-Abz-Lys-OAll an *o*-Nitroveratryl PS Harz 115

Insgesamt dreimal werden 131 mg (23.7 μmol) Fmoc-Lys-OAll an *o*-Nitroveratryl PS Harz in 3 ml 20% Piperidin in DMF suspendiert und 15 min bei RT am Orbitalschüttler durchmischt. Das Harz wird zweimal mit je 2 ml DMF und dreimal mit CH₂Cl₂, sowie MeOH, CH₂Cl₂, EtOAc, MeOH und wieder zweimal DMF gewaschen. Eine Lösung von 44.2 mg (121 μmol, 5.1 eq) Fmoc-Abz-OH, 43.6 mg (115 μmol, 4.9 eq) HBTU und 26.9 mg (176 μmol, 7.4 eq) HOBt in 1 ml DMF wird mit 20.3 μl (118 μmol, 5.0 eq) DIPEA versetzt und nach 3 min zum

Harz gegeben. Nach 2 h wird das Harz zweimal mit je 3 ml DMF gewaschen und erneut mit einer Lösung von 43.6 mg (119 μmol , 5.0 eq) Fmoc-Anthranilsäure, 44.4 mg (117 μmol , 4.9 eq) HBTU, 25.6 mg (167 μmol , 7.1 eq) HOBt und 20.3 μl (118 μmol , 5.0 eq) DIPEA versetzt.

Das Harz wird nach 16 h zweimal mit je 2 ml DMF und dreimal mit CH_2Cl_2 , sowie mit MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen und am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 95.9 mg gelbes Harz

Beladung^[98]: 0.09 mmol/g

Das Harz wird insgesamt viermal in 2.5 ml 20% Piperidin in DMF suspendiert und anschließend zweimal mit je 2 ml DMF und dreimal mit CH_2Cl_2 , sowie mit MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen und am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 75.7 mg gelbes Harz

MS: -

H-Abz-Lys-OH an *o*-Nitroveratryl PS Harz 116

Eine Suspension von 75.7 mg (17.6 μmol) H-Abz-Lys-OAll an *o*-Nitroveratryl PS Harz wird mit 40.0 mg (645 μmol , 45 eq) Dimethylamin-Boran in 2 ml wasserfreiem CH_2Cl_2 und mit 5.9 mg (5.1 μmol , 0.3 eq) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ versetzt. Das Gemisch wird 2 h bei RT geschüttelt. Das Harz wird mit je 2 ml zweimal mit DMF: Wasser 9:1, dreimal mit DMF und dreimal mit CH_2Cl_2 , sowie mit MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen und am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 44.3 mg gelbbraunes Harz

MS: 278.3 $[\text{M}+\text{BH}]^+$

Das Produkt wird in 3 ml 1% Ethanolamin in THF unter Argon suspendiert und mit einer Hg-Dampflampe über Nacht bestrahlt. Das Harz wird zweimal mit je 3 ml THF, zweimal mit je 3 ml CH_2Cl_2 und nacheinander mit je 3 ml MeOH, CH_2Cl_2 , EtOAc und MeOH gewaschen. Das Filtrat wird eingengt. Der Rückstand wird am HV getrocknet.

Isol. Mat.: 1.3 mg gelbes Öl

LCMS(C18): R_t 1.45 min, 277.1 $[\text{M}+\text{BH}]^+$

MALDI: 277.51 $[\text{M}+\text{BH}]^+$

6 Literaturverzeichnis

- [1] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [2] C. C. Leznoff, *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11*, 327-333.
- [3] J. M. J. Fréchet, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 663-683.
- [4] K. Burgess, *Solid-Phase Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, New York, **2000**.
- [5] L. A. Wessjohann, *Curr. Op. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 303-309.
- [6] D. G. Hall, S. Manku, F. Wang, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 125-150.
- [7] D. Brohm, Dissertation, Universität Dortmund (Dortmund), **2002**.
- [8] K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, *Biopolymers* **2001**, *60*, 171-193.
- [9] K. C. Nicolaou, N. Winssinger, J. Pastor, S. Ninkovic, F. Sarabia, Y. He, D. Vourloumis, Z. Yang, T. Li, P. Giannakakou, E. Hamel, *Nature* **1997**, *387*, 268-272.
- [10] M. Barbacid, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 779-827.
- [11] J. L. Bos, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4682-4689.
- [12] D. R. Lowy, B. M. Willumsen, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 851-891.
- [13] C. Lenzen, R. H. Cool, H. Prinz, J. Kuhlmann, A. Wittinghofer, *Biochemistry* **1998**, *37*, 7420-7430.
- [14] N. P. Fam, W. T. Fan, Z. X. Wang, L. J. Zhang, H. Chen, M. F. Moran, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 1396-1406.
- [15] L. Wiesmüller, A. Wittinghofer, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10207-10210.
- [16] P. Gideon, J. John, M. Frech, A. Lautwein, R. Clark, J. E. Scheffler, A. Wittinghofer, *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 2050-2056.
- [17] J. F. Eccleston, K. J. M. Moore, L. Morgan, R. H. Skinner, P. N. Lowe, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 27102-27019.
- [18] U. S. Vogel, R. A. F. Dixon, M. D. Schaber, R. E. Diehl, M. S. Marshall, E. M. Scolnick, I. S. Sigal, J. B. Gibbs, *Nature* **1988**, *335*, 90-93.
- [19] M. Trahey, G. Wong, R. Halenbeck, B. Rubinfeld, G. A. Martin, M. Ladner, C. M. Long, W. J. Crosier, K. Watt, K. Koths, F. McCormick, *Science* **1988**, *242*, 1697-1700.
- [20] G. Xu, P. O'Connel, D. Viskochil, R. Cawthon, M. Robertson, M. Culver, D. Dunn, J. Stevens, R. Gesteland, R. White, R. Weiss, *Cell* **1990**, *62*, 599-608.
- [21] G. A. Martin, D. Viskochil, G. Bollag, P. C. McCabe, W. J. Crosier, H. Haubruck, L. Conroy, R. Clark, P. O'Connel, R. M. Cawthon, M. A. Innis, F. McCormick, *Cell* **1991**, *63*, 843-849.
- [22] G. Xu, B. Lin, K. Tanaka, D. Dunn, D. Wood, R. Gesteland, R. White, R. Weiss, *Cell* **1991**, *63*, 835-841.
- [23] R. Ballester, D. Marchuk, M. Boguski, A. Saulino, R. Letcher, M. Wigler, F. Collins, *Cell* **1990**, *63*, 851-859.
- [24] J. K. Buolamwini, *Curr. Op. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 500-509.

- [25] K. G. Waddick, F. M. Uckun, *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 1411-1426.
- [26] H. Waldmann, M. Thutewohl, *Topics Curr. Chem.* **2001**, *211*, 117-130.
- [27] L. A. Sorbera, R. Fernandez, J. Castaner, *Drugs* **2001**, *26*, 453-461.
- [28] K. Hinterding, P. Hagenbuch, J. Retez, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 227-236.
- [29] M. Thutewohl, L. Kissau, B. Popkirova, I. M. Karaguni, T. Nowak, M. Bate, J. Kuhlmann, O. Muller, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Edit.* **2002**, *41*, 3616-3620.
- [30] E. Gourzoulidou, Diplom, Universität Dortmund (Dortmund), **2000**.
- [31] K. Scheffzek, A. Lautwein, W. Kabsch, M. R. Ahmadian, A. Wittinghofer, *Nature* **1996**, *384*, 591-596.
- [32] K. Scheffzek, M. R. Ahmadian, W. Kabsch, L. Wiesmüller, A. Lautwein, F. Schmitz, A. Wittinghofer, *Science* **1997**, *277*, 333-338.
- [33] M. R. Ahmadian, T. Zor, D. Vogt, W. Kabsch, Z. Selinger, A. Wittinghofer, K. Scheffzek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 7065-7070.
- [34] R. Gail, B. Costisella, M. R. Ahmadian, A. Wittinghofer, *Chembiochem* **2001**, *2*, 570-575.
- [35] J. J. Scicinski, M. S. Congreve, C. Kaye, S. V. Ley, *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 2103-2127.
- [36] E. Kaiser, R. I. Colescot, C. D. Bossinge, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
- [37] C. G. Bochet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **2002**, 125-142.
- [38] D. H. Rich, S. K. Gurwara, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1973**, 610-611.
- [39] A. Patchornik, B. Amit, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6333-6335.
- [40] D. Bellof, M. Mutter, *Chimia* **1985**, *39*, 317-320.
- [41] S. S. Wang, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 3258-3261.
- [42] C.-H. Park, R. S. Givens, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2453-2463.
- [43] K. Zhang, J. E. T. Corrie, V. R. N. Munasinghe, P. Wan, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5625-5632.
- [44] P. G. Conrad, II, R. S. Givens, B. Hellrung, C. S. Rajesh, M. Ramseier, J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9346-9347.
- [45] A. Routledge, C. Abell, S. Balasubramanian, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1227-1230.
- [46] H. B. Lee, S. Balasubramanian, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3454-3460.
- [47] M. Cano, M. Ladlow, S. Balasubramanian, *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 44-48.
- [48] Y. J. Shi, J. E. T. Corrie, P. Wan, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8278-8279.
- [49] S. Peukert, B. Giese, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9045-9051.
- [50] R. Glatthar, B. Giese, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2315-2317.
- [51] S. Peukert, pers. Mitteilung, **2001**.
- [52] J. R. Horton, L. M. Stamp, A. Routledge, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9181-9184.
- [53] B. B. Brown, D. S. Wagner, H. M. Geysen, *Mol. Div.* **1995**, *1*.

- [54] H. M. Geysen, C. D. Wagner, W. M. Bodnar, C. J. Markworth, G. J. Parke, F. J. Schoenen, D. S. Wagner, D. S. Kinder, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 679-688.
- [55] K. Heinze, U. Winterhalter, T. Jannack, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 4203-4210.
- [56] M. C. Fitzgerald, K. Harris, C. G. Shevlin, G. Siuzdak, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 979-982.
- [57] M. C. Carrasco, M. C. Fitzgerald, Y. Oda, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6331-6334.
- [58] A. B. Kantchev, J. R. Parquette, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 8049-8053.
- [59] P. M. S. Hilaire, T. L. Lowary, M. Meldal, K. Bock, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13312-13320.
- [60] P. H. Seeburg, W. W. Colby, D. J. Capon, D. V. Goedel, A. D. Levinson, *Nature* **1986**, *312*, 71-75.
- [61] InsightII ed., Accelrys Inc., www.accelrys.com.
- [62] Sybyl 6.7.1 ed., Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd, St. Louis, Missouri, 63144, USA.
- [63] InsightII ed., www.accelrys.com, LUDI ist im Insight II Software Paket von Accelrys Inc. implementiert.
- [64] GOLD ed., CCDC Software Ltd., 12 Union Rd, Cambridge CB2 1E7, UK, p. www.ccdc.cam.ac.uk.
- [65] H. Gohlke, G. Klebe, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2765-2798.
- [66] J. Zeng, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2000**, *3*, 355-362.
- [67] L. Kissau, Dissertation, Universität Dortmund (Dortmund), **2002**.
- [68] A. Ajayaghosh, V. N. R. Pillai, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 777-780.
- [69] T. Y. H. Wu, S. Ding, N. S. Gray, P. G. Schultz, *Org. Lett.* **2001**.
- [70] L. Boymond, M. Rottländer, G. Cahiez, P. Knochel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1701-1703.
- [71] W. Yun, S. Li, B. Wang, L. Chen, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 175-177.
- [72] H.-J. Knölker, T. Braxmeier, G. Schlechtingen, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2746-2749.
- [73] H.-J. Knölker, T. Braxmeier, *Synlett* **1997**, 925-928.
- [74] K. Hanaya, T. Muramatsu, H. Kudo, Y. L. Chow, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1979**, 2409-2410.
- [75] G. B. Phillips, G. P. Wei, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4887-4890.
- [76] R. A. Scheuermann, D. Tumelty, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6531-6535.
- [77] M. Meldal, F. I. Auzanneau, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1994**, 1849-1850.
- [78] E. Atherton, C. J. Logan, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1981**, 538-546.
- [79] P. J. Hajduk, M. Bures, J. Praestgaard, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3443-3447.
- [80] E. Jacoby, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 891-893.

- [81] B. P. Orner, J. T. Ernst, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5382-5383.
- [82] U. Grether, Dissertation, Universität Karlsruhe (TH) (Karlsruhe), **2000**.
- [83] F. Stieber, U. Grether, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1073-1077.
- [84] R. J. Bochis, L. E. Olen, F. S. Wakszynski, H. Mrozik, P. Eskola, P. Kulsa, G. Wilks, J. E. Taylor, J. R. Egerton, D. A. Ostlind, G. Olson, *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 1518-1521.
- [85] R. Gail, pers. Mitteilung, Dortmund, **2000**.
- [86] R. C. Gupta, M. Seth, A. P. Bhaduri, *Ind. J. Chem. Sect. B* **1992**, *31*, 745-747.
- [87] G. Bartoli, E. Marcantoni, M. Petrini, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5834-5840.
- [88] G. Bartoli, M. Bosco, R. Dalpozzo, G. Palmieri, E. Marcantoni, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1991**, 2757-2761.
- [89] J. F. Hartwig, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2154-2177.
- [90] B. H. Yang, S. L. Buchwald, *J. Organomet. Chem.* **1999**, *576*, 125-146.
- [91] J. F. Hartwig, M. Kawasutra, S. I. Hauck, K. H. Shaughnessy, L. M. Alcazar-Roman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5575-5580.
- [92] S. Jaime-Figuera, Y. Liu, J. M. Muchowski, D. G. Putman, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1313-1316.
- [93] J. P. Wolfe, J. Ahman, J. P. Sadighi, R. A. Singer, S. L. Buchwald, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6367-6370.
- [94] Y. D. Ward, V. Farina, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6993-6996.
- [95] C. A. Willoughby, K. T. Chapman, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7181-7184.
- [96] R. Gail, pers. Mitteilung, Dortmund, **2001**.
- [97] A. Hari, B. L. Miller, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3667-3670.
- [98] M. F. Gordeev, G. W. Luehr, H. C. Hui, E. M. Gordon, D. V. Patel, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15879-15890.
- [99] F. Stieber, Dissertation, Universität Dortmund (Dortmund), **2002**.
- [100] J. R. Lewis, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 389-416.
- [101] A. Naya, K. Kobayashi, M. Ishikawa, K. Ohwaki, T. Saeki, K. Noguchi, N. Ohtake, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1219-1223.
- [102] J. Pratt, H.-S. Jae, S. Rosenberg, K. Spina, M. Winn, S. Buchner, E. Novosad, D. Kerkman, K. Shiosaki, T. Opgenorth, J. DeBernardis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 169-172.
- [103] J. S. Carter, S. Kramer, J. J. Talley, T. Penning, P. Collins, M. J. Graneto, K. Seibert, C. M. Koboldt, J. Masferrer, B. Zweifel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1171-1174.
- [104] J. Rudolph, H. Theis, R. Hanke, R. Endermann, L. Johannsen, F.-U. Geschke, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 619-626.
- [105] K. S. Kim, S. D. Kimball, R. N. Misra, D. B. Rawlins, J. T. Hunt, H. Y. Xiao, S. F. Lu, L. G. Qian, W. C. Han, W. F. Shan, T. Mitt, Z. W. Cai, M. A. Poss, H. Zhu, J. S.

- Sack, J. S. Tokarski, C. Y. Chang, N. Pavletich, A. Kamath, W. G. Humphreys, P. Marathe, I. Bursuker, K. A. Kellar, U. Roongta, R. Batorsky, J. G. Mulheron, D. Bol, C. R. Fairchild, F. Y. Lee, K. R. Webster, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3905-3927.
- [106] W. K. M. Chong, S. S. Chu, R. R. Duvadie, L. Li, W. Xiao, Y. Yang, Agouron Pharmaceuticals Inc., WO 9921845, **1999**.
- [107] K. S. Kim, S. D. Kimball, M. A. Poss, R. N. Misra, Z. W. Cai, D. B. Rawlins, K. Webster, J. T. Hunt, W. C. Han, Bristol Myers Squibb Pharmaceuticals, WO 9924416, **1999**.
- [108] F. Stieber, R. Matzischek, N. Soric, A. Giannis, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4951-4955.
- [109] T. Masquelin, D. Obrecht, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 153-156.
- [110] R. Baer, T. Masquelin, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 16-19.
- [111] F. Garro-Helion, A. Marzouk, F. Guibe, *J. Org. Chem.* **1995**, *58*, 6109-6113.
- [112] A. Wissner, C. V. Grudzinkas, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3972-3973.
- [113] A. Ullrich, J. Schlessinger, *Cell* **1990**, *61*, 203-212.
- [114] A. J. Bridges, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2541-2571.
- [115] F. McCormick, *Curr. Op. Biotech.* **2000**, *11*, 593-597.
- [116] P. C. Maisonpierre, C. Suri, P. F. Jones, S. Bartunkova, S. J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T. H. Aldrich, N. Papadopoulos, T. J. Daly, S. Davis, T. N. Sato, G. D. Yancopoulos, *Science* **1997**, *277*, 55-60.
- [117] A. Levitzki, A. Gazit, *Science* **1995**, *267*, 1782-1788.
- [118] J. Adams, P. Huang, D. Patrick, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**.
- [119] E. Addicks, A. Giannis, *Nachr. Chem.* **2003**, *51*, 136-141.
- [120] P. Stahl, L. Kissau, R. Mazitschek, A. Huwe, P. Furet, A. Giannis, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11586-11593.
- [121] R. S. Kerbel, *Nature* **1997**, *390*, 335-336.
- [122] G. D. Yancopoulos, S. Davis, N. W. Gale, J. S. Rudge, S. J. Wiegand, J. Holash, *Nature* **2000**, *407*, 242-248.
- [123] A. Compagni, P. Wilgenbus, M.-A. Impagnatiello, M. Cotten, G. Christofori, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 7163-7169.
- [124] Y. Wang, D. Becker, *Nat. Med.* **1997**, *3*, 887-893.
- [125] D. J. Slamon, G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich, W. L. McGuire, *Science* **1987**, *235*, 177-182.
- [126] M. J. Ellis, S. Jenkins, J. Hanfelt, M. E. Redington, M. Taylor, R. Leek, K. Siddle, A. Harris, *Breast Canc. Res. Treatm.* **1998**, *52*, 175-182.
- [127] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3-25.
- [128] W. Horspool, D. Armesto, *Organic photochemistry - a comprehensive Treatment*, Ellis Horwood Limited, Chichester, **1992**.

- [129] G. Dorman, G. D. Prestwich, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5661-5673.
- [130] A. Cerpapojlak, A. Jenkins, M. W. Duncan, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 233.
- [131] B. E. Evans, M. G. Bock, K. E. Rittle, R. M. DiPardo, W. L. Whitter, D. F. Veber, P. S. Anderson, R. M. Freidinger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 4918-4922.
- [132] C. G. Boojamra, K. M. Burow, L. A. Thompson, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1240-1256.
- [133] B. E. Evans, K. E. Rittle, M. G. Bock, R. M. DiPardo, R. M. Freidinger, W. L. Whitter, G. F. Lundell, D. F. Veber, P. S. Anderson, R. S. Lang, V. J. Lotti, D. J. Cerino, T. B. Chen, P. J. Kling, K. A. Kunkel, J. P. Springer, J. Hirshfield, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2235-2246.
- [134] T. I. Ho, W. S. Chen, C. W. Hsu, Y. M. Tsai, J. M. Fang, *Heterocycles* **2002**, *57*, 1501-1506.
- [135] D. A. Goff, R. N. Zuckermann, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5744-5745.
- [136] M. J. Plunkett, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3306-3307.
- [137] N. Terrett, *Drug Discovery Today* **1999**, *4*, 141-141.
- [138] J. P. Mayer, J. Zhang, K. Bjergarde, D. M. Lenz, J. J. Gaudino, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8081-8084.
- [139] A. M. Tafesh, J. Weiguny, *Chem. Rev.* **1996**, *96*.
- [140] A. Fürstner, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3140-3172.
- [141] M. Frigerio, M. Santagostino, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8019-8022.
- [142] M. Frigerio, M. Santagostino, S. Sputore, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537-4538.
- [143] T. Hattori, A. Takeda, O. Yamabe, S. Miyano, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 233-238.
- [144] J. Quick, B. Saha, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8553-8556.
- [145] B. A. Burkett, R. C. D. Brown, M. M. Meloni, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5773-5775.
- [146] P. Gomez-Martinez, M. Dessolin, F. Guibe, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1999**, 2871-2874.
- [147] D. Fernandez-Forner, G. Casals, E. Navarro, H. Ryder, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4471-4474.
- [148] S. Wendeborn, A. d. Mesmaeker, W. K. D. Brill, S. Berteina, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 215-224.
- [149] A. Cerpapojlak, A. Jenkins, M. W. Duncan, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 233-239.
- [150] K. I. Voivodov, J. Ching, T. W. Hutchens, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5669-5672.
- [151] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [152] D. D. Perrin, W. L. F. Armstrong, *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, Oxford, **1988**.
- [153] M. Amat, S. Hadida, G. P. Shkenichmyi, J. Bosch, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3158-3175.

-
- [154] R. Gandolfo, *Gazz. Chim. Ital.* **1971**, *101*, 946-954.
- [155] T. Masquelin, D. Sprenger, R. Baer, F. Gerber, Y. Mercadal, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 646-660.
- [156] M. J. Plunkett, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2885-2893.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abz	Anthranilsäure
CyH	Cyclohexan
DBU	1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIC	<i>N,N'</i> -Di- <i>iso</i> -propylcarbodiimid
DIPEA	<i>N</i> -Ethyl- <i>N,N</i> -di- <i>iso</i> -propylamin
DMA	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMB	<i>N,N'</i> -Dimethylbarbitursäure
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EtOAc	Ethylacetat
EI	Electron Impact
ESI	Electron Spray Ionization
FAB	Fast atom bombardment
FC	Flashchromatographie
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
GAP	GTPase activating protein
GEF	guanine nucleotide exchange factor
ges.	gesättigt
Grb	Growth factor binding
H	Hexan
HATU	2-(1 <i>H</i> -7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxy-1 <i>H</i> -benzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HV	Hochvakuum
IBX	1-Hydroxy-1,2-benziodoxol-3(1 <i>H</i>)-on 1-Oxid
LCMS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
LM	Laufmittelgemisch
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization
MAP	mitogen activated protein
MeIm	<i>N</i> -Methylimidazol
MeOH	Methanol

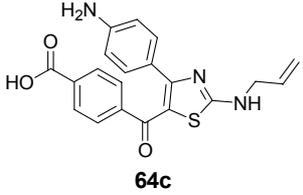
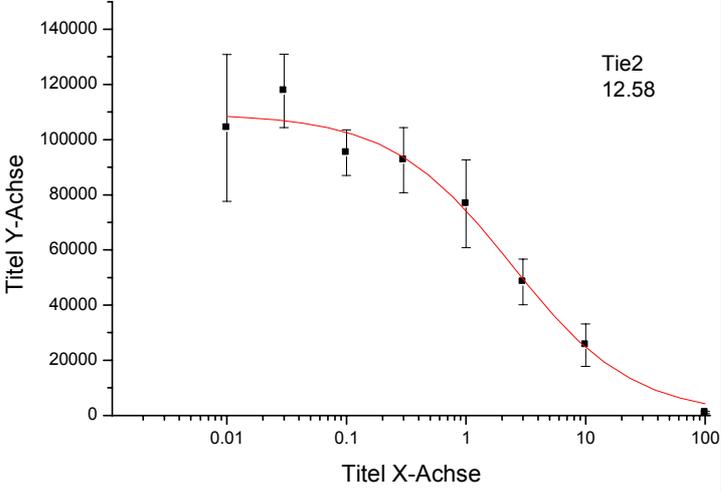
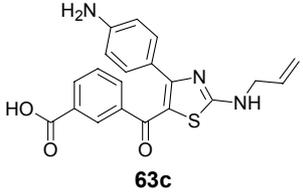
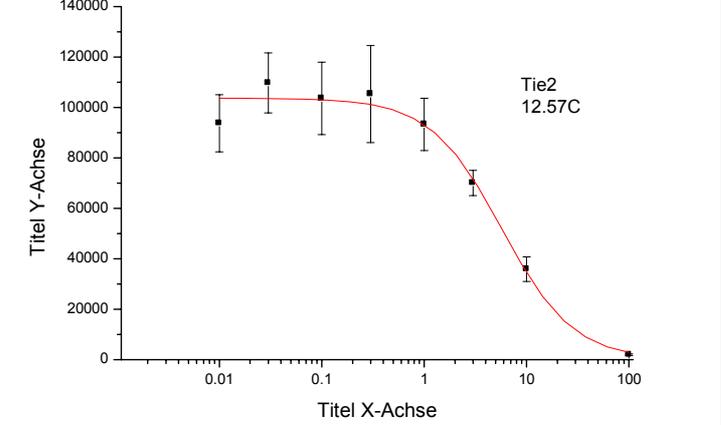
MS	Massenspektrum
MSNT	1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol
MS-SPOS	Matrix free, direct <u>m</u> ass <u>s</u> pectrometric monitoring of <u>s</u> olid phase <u>o</u> rganic <u>s</u> yntheses
NaHMDS	Natriumhexamethyldisilazid
3-NBA	3-Nitrobenzylalkohol
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
PS	Polystyrol
rac.	racemisch
R _f	Retentionsfaktor
R _t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
Sos	Son of sevenless
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOF	Time of flight

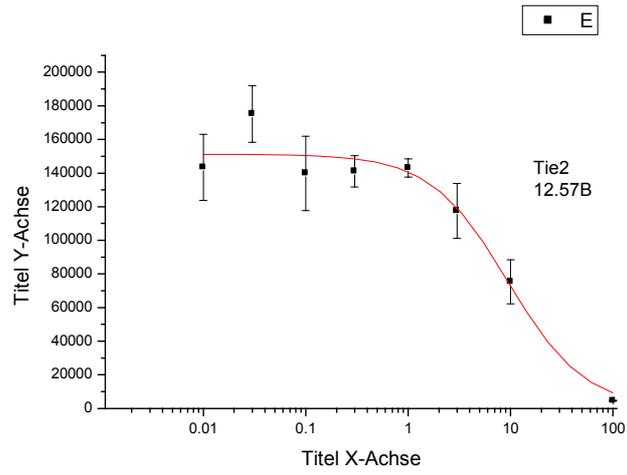
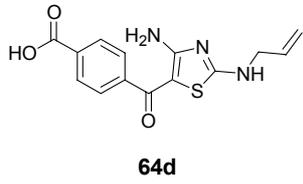
8 Anhang

8.1.1 Messdaten der Kinasetests (Ralph Mazitschek)

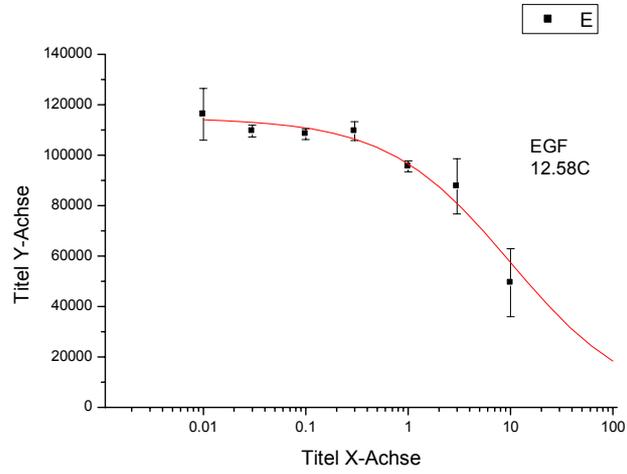
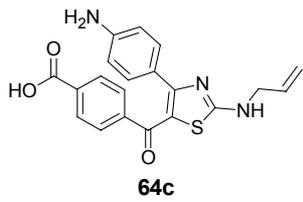
Für alle Messkurven gilt::

x-Achse: Konzentration [μM]
y-Achse: Luminiszenz [RLU]

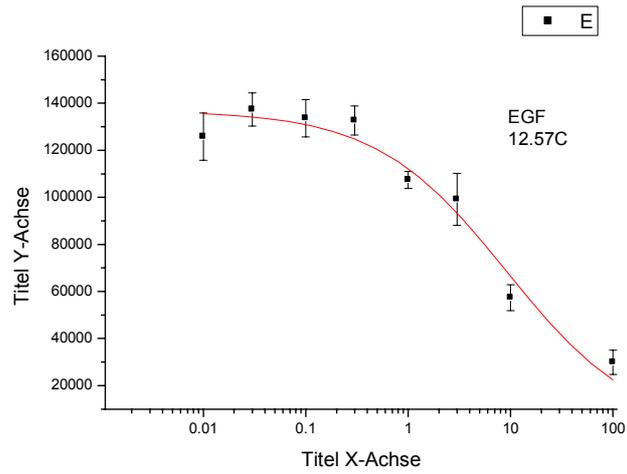
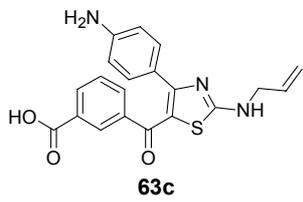
Struktur	Messkurve	IC ₅₀ [μM]
 <p>64c</p>	 <p>Titel Y-Achse</p> <p>Titel X-Achse</p> <p>■ E</p> <p>Tie2 12.58</p>	2.4
 <p>63c</p>	 <p>Titel Y-Achse</p> <p>Titel X-Achse</p> <p>■ E</p> <p>Tie2 12.57C</p>	6



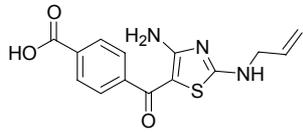
9



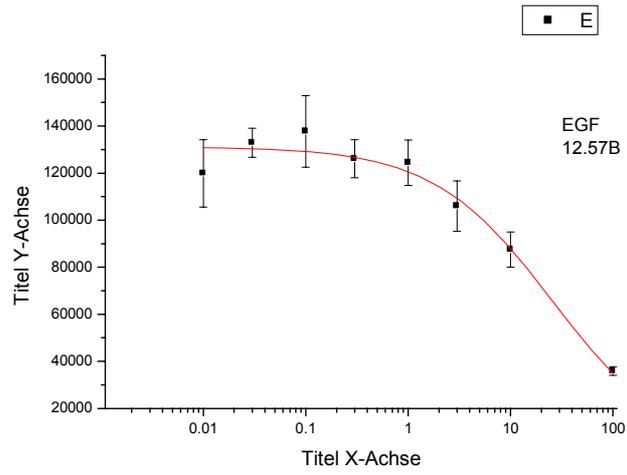
5



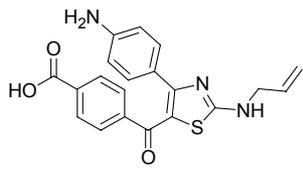
9



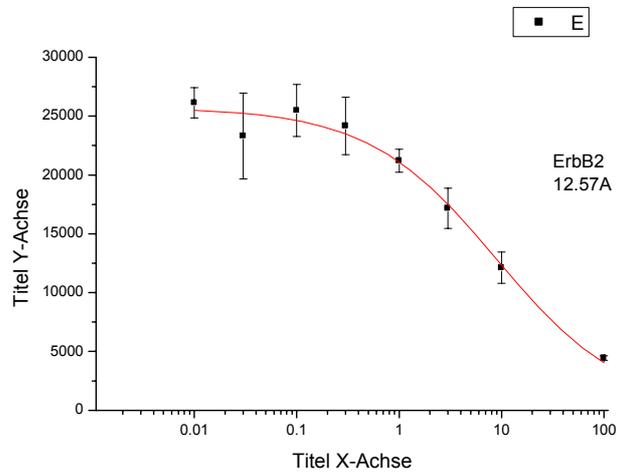
64d



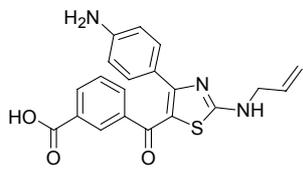
25



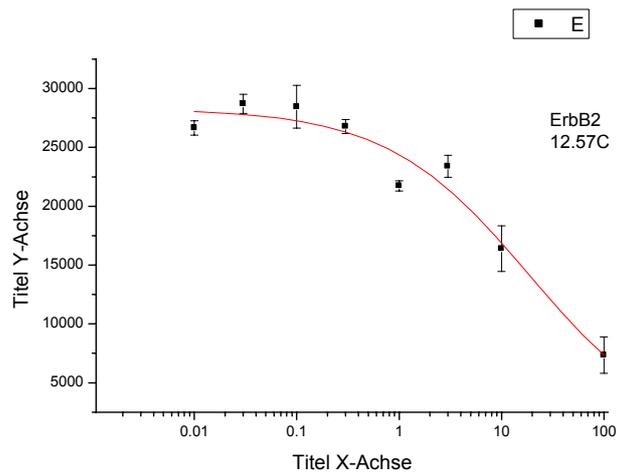
64c



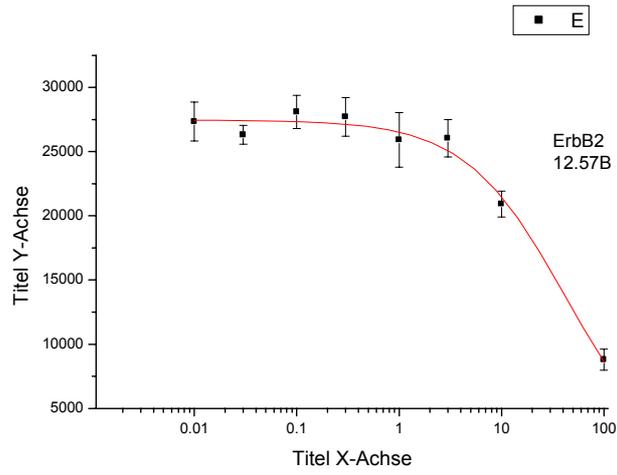
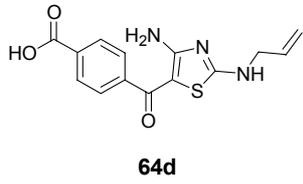
9



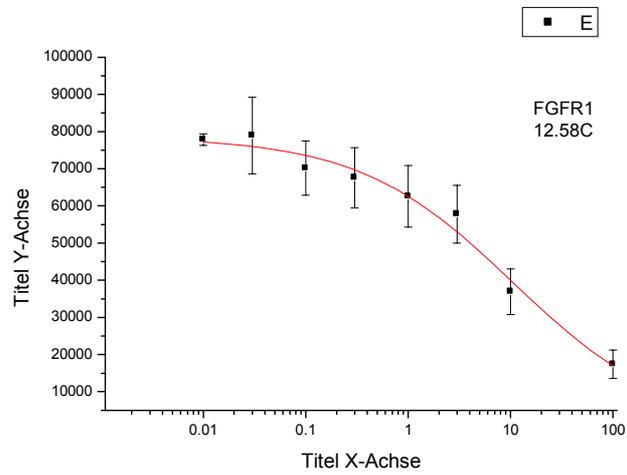
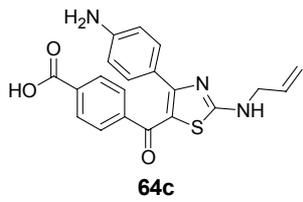
63c



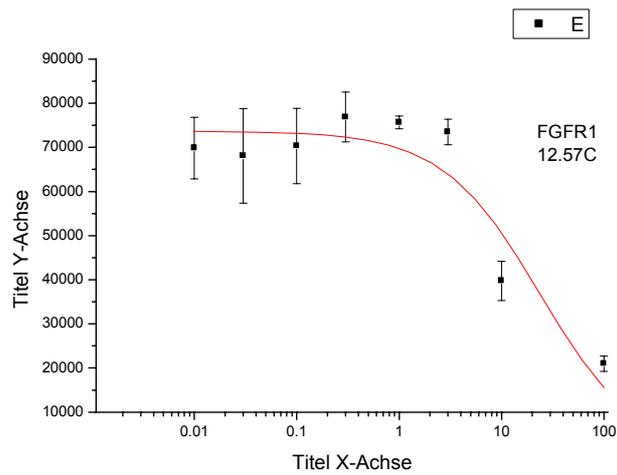
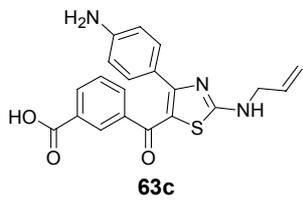
19



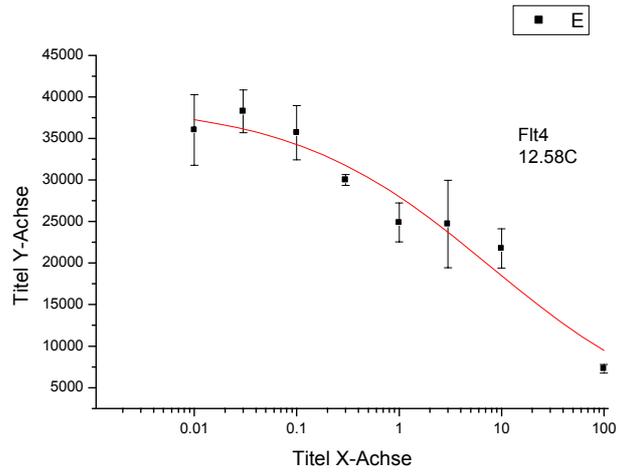
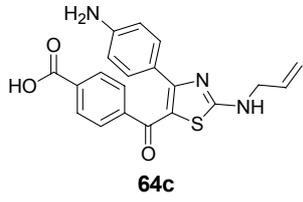
42



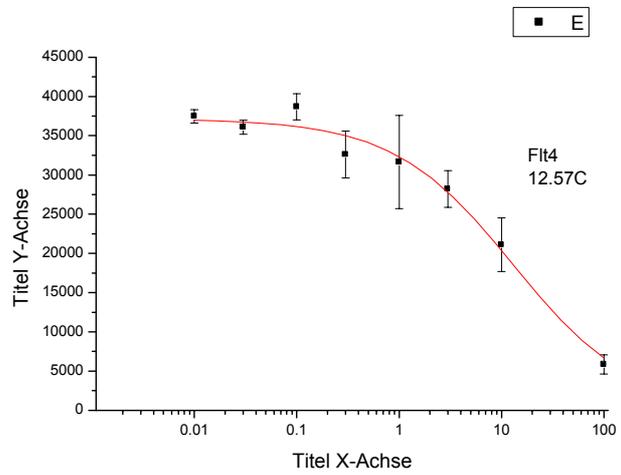
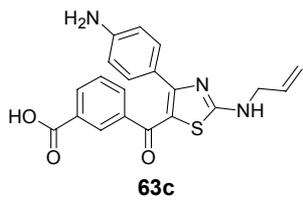
10



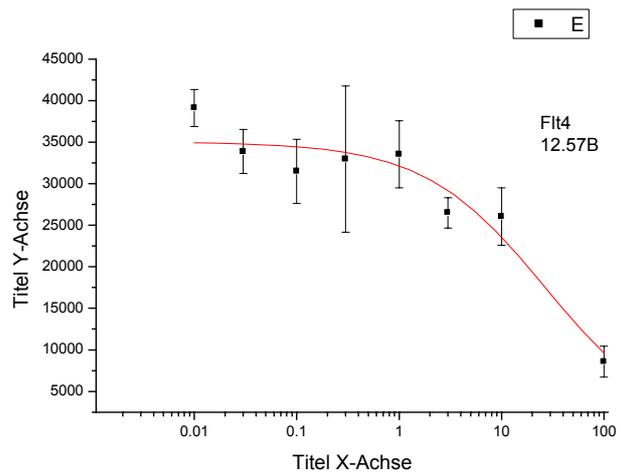
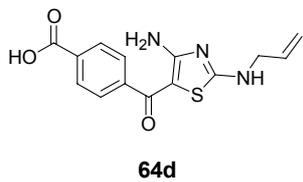
9



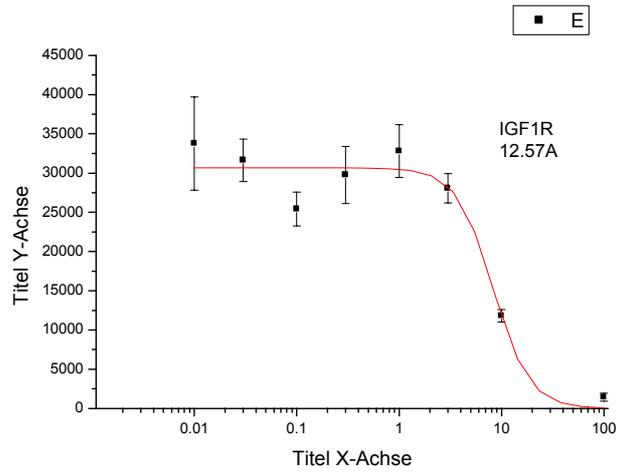
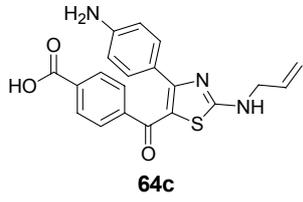
8



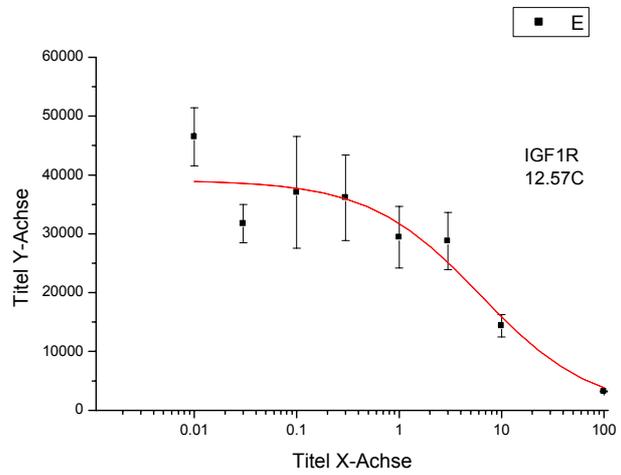
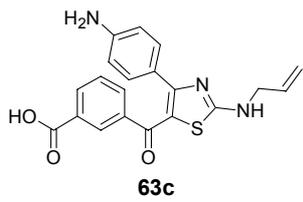
13



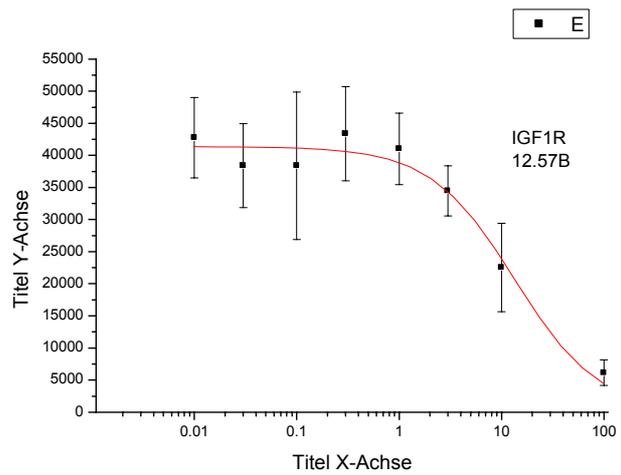
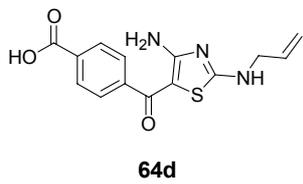
27



5



6



14

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann danke ich für die interessante Themenstellung und stete Unterstützung meiner Arbeit, sowie für die Freiheit und das Vertrauen, das er in mich setzte.

Die Freude und das Interesse an meiner Arbeit gingen auch wegen der guten Atmosphäre in der Gruppe, vor allem aber in unserem Labor nicht verloren. Für die vielen Diskussionen und den hohen Unterhaltungswert danke ich vor allem Norman Kuder, Patrick Deck und Stefanie Schlummer. Eine nie versiegende Quelle an Spass, Solidarität und Loyalität war Ines Heinemann: Danke, Ines!

Frau Elke Simon möchte ich für die tatkräftige praktische Unterstützung danken. Während der gesamten Zeit in Labor A 3.14 hat sie durch ihren organisatorischen Einsatz uns allen die Arbeit erleichtert.

Für die Zusammenarbeit im GTPase-Aktivatoren-Projekt danke ich Dr. Courtney Aldrich, Lars Kissau, Dr. Laurent Soulere und Robert Gail. Dr. Ralph Mazitschek sei für die Durchführung des Kinase-Inhibitorstests gedankt. Dr. Hanno Steen gebührt Dank für seine hilfreichen Diskussionen und vor allem Antworten auf massenspektrometrische Fragen.

Grosser Dank gebührt auch Dr. Rolf-Peter Breinbauer, Simon Ficht, Stefanie Schlummer und Stefan Sommer für die zügige und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Den Mitarbeitern der analytischen Abteilungen der Universitäten Karlsruhe und Dortmund danke ich herzlich für die Durchführung der Analysen und die Messung der Spektren. Sandra Eichhorn, Christiane Vornweg und Dr. Petra Janning danke ich für die Aufnahme von Massenspektren.

Beim Land Baden-Württemberg bedanke ich mich für die Gewährung eines Landesgraduiertenstipendiums und bei der Studienstiftung des deutschen Volkes für ein Promotionsstipendium.

Mein grosser Dank gilt meinen Freunden, die mich während meines Studiums und folgenden Jahren begleitet haben. Vor allem jedoch möchte ich meiner Familie danken. Ohne ihre nicht nur finanzielle Unterstützung und die Tatsache, dass sie immer an mich glauben, wäre all dies nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

Name Jantje Mareike Gerdes
Geburtsdatum/-ort 10.05.1973, Delmenhorst/ Niedersachsen
Familienstand ledig

Schulbildung

1979-83 Grundschule am Stadtpark, Lübeck
1983-89 Katharineum zu Lübeck, Gymnasium mit humanistischem Zweig
1989-90 Chittenango High School, Chittenango, NY, USA (High School Dipl.)
1990-93 Katharineum zu Lübeck, Gymnasium mit humanistischem Zweig
3. Juni 1993 Abitur

Hochschulbildung

11/1993-10/1995 Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Vordiplom)
11/1995-12/1998 Eidgenössische Technische Hochschule Zürich ETH
4/1998-8/1998 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. D. Seebach:
„Versuche zur kinetischen Racematspaltung mit Diisopropoxytitan-TADDOLat und zur Azidübertragung durch Titan-TADDOLat-Komplexe“
12/1998 Diplom

Praktikum

4/1997-12/1997 Industriepraktikum bei Ballard Advanced Materials, Inc., Burnaby, BC, Kanada

Promotion

1/1999-4/2000 Anfertigung der Doktorarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Waldmann an der Universität Karlsruhe
5/2000-4/2003 Fortführung der Doktorarbeit unter der Betreuung von Prof. Waldmann an der Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut f. mol. Physiologie, Dortmund:
„Strategien zum Aufbau niedermolekularer GTPase-Aktivatoren und zur direkten massenspektrometrischen Reaktionskontrolle am polymeren Träger (MS-SPOS)“