

**Entwicklung von neuen  
peptidischen und peptidomimetischen  
Phosphono-Analoga des Glutathions**



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
**Andreas Andersen**  
Kiel 2003

Referent:

HD. Dr. T. Kunze

Korreferent:

Prof. Dr. D. Heber

Tag der mündlichen Prüfung:

12. November 2003

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 13. November 2003

gez.

Prof. Dr. W. Depmeier

(Dekan)

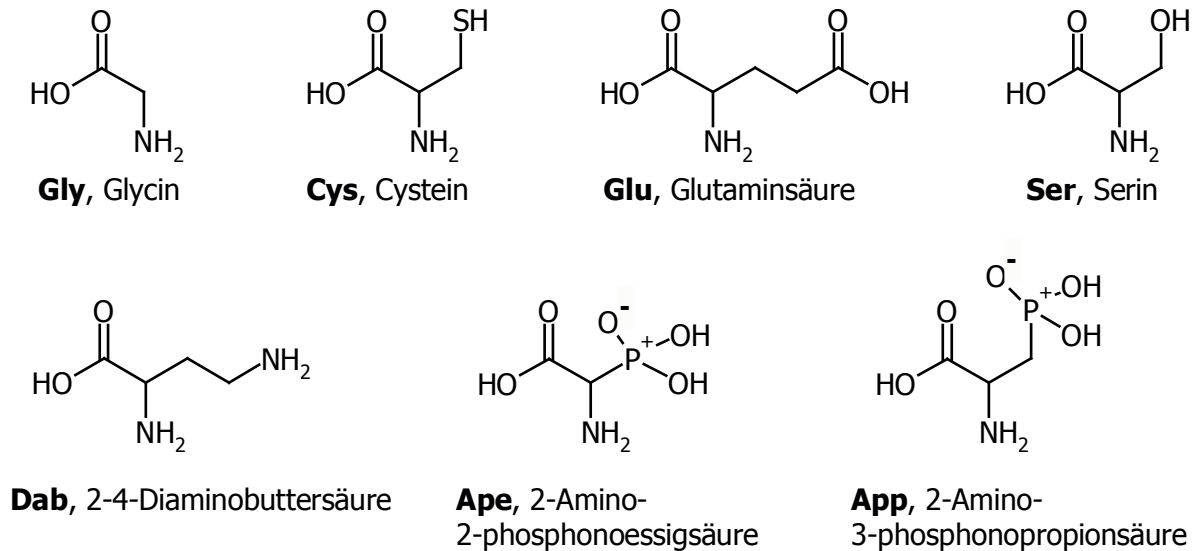
In Gedenken an  
Gerd Krüger



Boc	<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl
Bzl	Benzyl
<sup>n</sup> Bu	<i>n</i> -Butyl
<sup>t</sup> Bu	<i>tert.</i> -Butyl
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCNB	1,2-Dichlor-4-nitrobenzol
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI	Elektrosprayionisation
G-Site	Spezifische Bindungsstelle für Glutathion
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
H-Site	Bindungsstelle für hydrophobe Substrate
konz.	konzentrierte
L-Site	Bindungsstelle für Liganden
NMR	Kernresonanzspektroskopie
MDR	multidrug resistance, Sammelbegriff für Resistenz von Zellen gegenüber einer Vielzahl von strukturell unterschiedlichen Verbindungen
MS	Massenspektrometrie
GGT	$\gamma$ -Glutamyl Transferase; $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-Transferase
IC <sub>50</sub> -Wert	Substanzkonzentration, die bei festgelegten Reaktionsbedingungen die Verminderung der nicht gehemmtten enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit um 50% bewirkt
i. Vak.	im Vakuum
IR	Infrarotspektroskopie
nb	Nicht bestimmt
<sup>i</sup> Pr	<i>iso</i> -Propyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
Z	Benzyloxycarbonyl

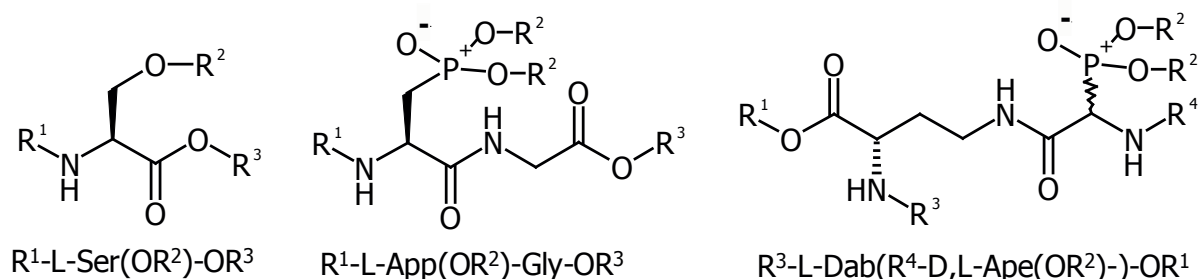


Für Aminosäuren wird im allgemeinen ein Dreibuchstaben-Symbol verwendet. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Synthesen wurden Derivate von zwei Posphonoaminosäuren eingesetzt, für die es bisher keine Symbole gibt. Die verwendeten Kürzel sind in Abb. 1 aufgeführt.



**Abb. 1:** Verwendete Aminosäuren mit zugehörigen Dreibuchstaben-Symbolen und Strukturformeln

Da die Strukturformeln von Peptiden sehr schnell unübersichtlich werden, gibt es eine Kurzform mit der die Verknüpfung von Peptiden beschrieben werden kann. Diese Kurzform soll hier dargestellt werden, da sie im Rahmen dieser Arbeit des öfteren verwendet wird. In der Kurzschreibweise befindet sich die  $\alpha$ -Aminogruppe der Aminosäure links und die  $\alpha$ -Carboxylgruppe rechts des Kürzels. Sowohl die Substitution eines Wasserstoffes aus der Amino-Funktion als auch die Substitution der Hydroxy-Funktion aus der Säurefunktion wird mit einem Strich gekennzeichnet. Die Substitution innerhalb einer Seitenkettenfunktion wird in Klammern geschrieben.



**Abb. 2:** Beispiele der verwendeten Kurzformen für Aminosäuren und Peptide

## VERWENDETE NOMENKLATUR FÜR AMINOSÄUREN

---

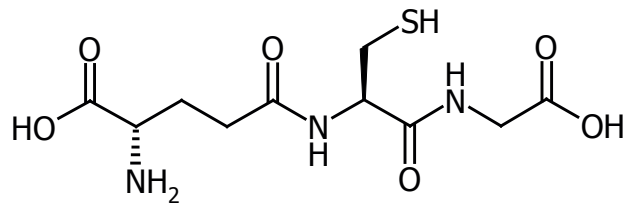
Für die Darstellung von Sequenzdaten werden Symbole verwendet, in denen Aminosäuren durch einen Buchstaben wiedergegeben werden. Da in dieser Arbeit auch Kristallstrukturen und Abwandlungen der Aminosäuresequenz dargestellt werden, soll hier eine Übersicht über die Symbole der üblichen Aminosäuren gegeben werden.

<b>Aminosäure</b>	<b>Drei- Buchstaben- symbol</b>	<b>Ein- Buchstaben- symbol</b>
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Phenylalanin	Phe	F
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

---

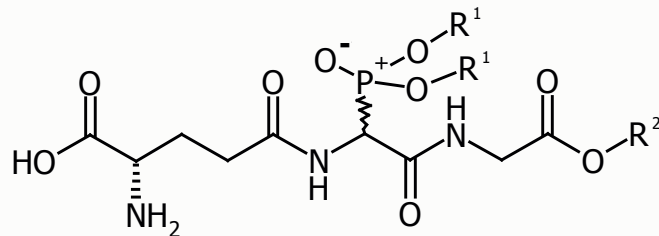
**Tab. 1:** Symbole für die wichtigsten proteinogenen Aminosäuren





H-L-Glu(-L-Cys-Gly-OH)-OH, Glutathion (**1**)

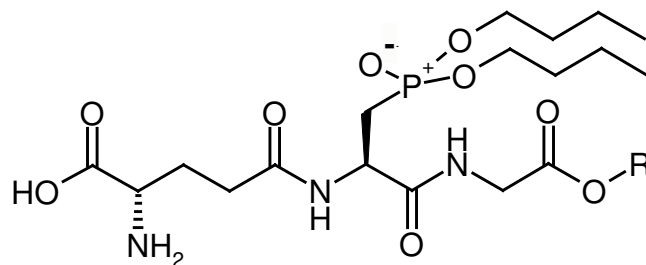
Kurzform: GSH



<b>14</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>
R <sup>1</sup>	Me	Et	<sup>i</sup> Pr	<sup>n</sup> Bu	<sup>n</sup> Bu	<sup>n</sup> Bu
R <sup>2</sup>	H	H	H	H	Me	Et

H-L-Glu(-D,L-Ape(OR<sup>1</sup>)-Gly-OR<sup>2</sup>)-OH

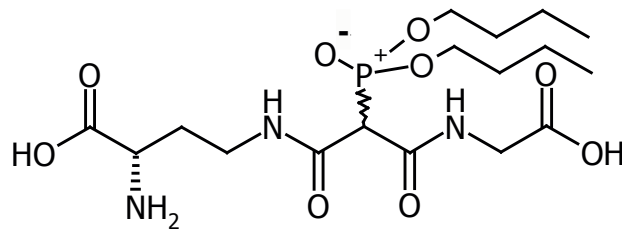
Kurzform: Phosphonsäurediester



**17a**: R=H; **17b**: R=Et

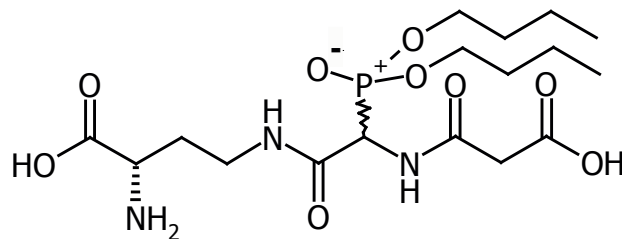
H-L-Glu(-L-App(O<sup>n</sup>Bu)-Gly-OR)-OH

Kurzform: seitenkettenverlängerter Phosphonsäurediester



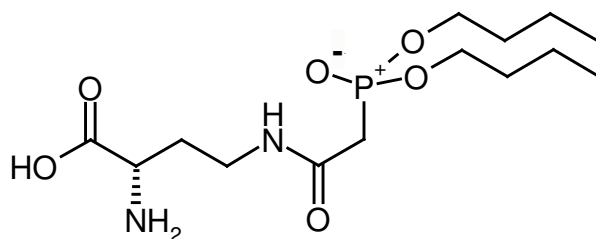
(2*RS*)-*N*-[(3*S*)-3-Amino-3-carboxypropyl]-*N'*-(carboxymethyl)-2-(di-*n*-butoxyphosphinyl)malonsäurediamid (**18**)

Kurzform: retro-inverser Phosphonsäurediester



*N*<sup>γ</sup>-[(2*RS*)-2-Malonylamino-2-(di-*n*-butoxyphosphinyl)acetyl]-L-2,4-diaminobuttersäure (**19**)

Kurzform: Doppelt retro-inverser Phosphonsäurediester



*N*<sup>γ</sup>-[2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)acetyl]-L-2,4-diaminobuttersäure (**20**)

Kurzform: Retro-inversers Phosphonsäurediesterfragment

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>FUNKTION, VORKOMMEN UND ISOENZYME VON GLUTATHION S-TRANSFERASEN</b>	<b>1</b>
1.1.1	FUNKTION	1
1.1.2	VORKOMMEN UND ISOENZYME	5
<b>1.2</b>	<b>BEDEUTUNG DER GLUTATHION S-TRANSFERASEN FÜR DIE RESISTENZ BEI DER CHEMOTHERAPIE MALIGNER ERKRANKUNGEN</b>	<b>8</b>
1.2.1	RESISTENZMECHANISMEN BEI DER CHEMOTHERAPIE MALIGNER ERKRANKUNGEN	8
1.2.2	BEDEUTUNG DES GSH/GST-SYSTEMS INNERHALB DER RESISTENZMECHANISMEN	10
1.2.3	MAßNAHMEN ZUR VERMINDERUNG DER RESISTENZ IN DER CHEMOTHERAPIE MALIGNER ERKRANKUNGEN	10
<b>1.3</b>	<b>ENTWICKLUNG VON INHIBITOREN DER GLUTATHION S-TRANSFERASEN</b>	<b>11</b>
1.3.1	ETACRYNSÄURE UND SULPHASALAZIN	11
1.3.2	ANALOGA DES GSH	12
<b>1.4</b>	<b>THEMA UND ZIELSETZUNG</b>	<b>13</b>
1.4.1	PEPTIDISCHER ANSATZ	13
1.4.2	PEPTIDOMIMETISCHER ANSATZ	14
1.4.3	ANSATZ IM SINNE EINES PRODRUG-KONZEPTES	16
<b>2</b>	<b>SYNTHESEN</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>SEITENKETTENVERLÄNGERTER PHOSPHONSÄUREDIESTER</b>	<b>19</b>
2.2.1	GESCHÜTZTE $\gamma$ -L-GLUTAMYL-L-SERYLGLYCINESTER	22
2.2.2	MICHAELIS-ARBUZOV-REAKTION VON SERIN-DERIVATEN	23
<b>2.3</b>	<b>RETRO-INVERSER PHOSPHONSÄUREDIESTER</b>	<b>25</b>
2.3.1	2-(DI- <i>M</i> -BUTOXYPHOSPHINYL)MALONSÄUREDIESTER	26
2.3.2	<i>N</i> [(2 <i>RS</i> )- <i>O</i> -BENZYL-2-(DI- <i>M</i> -BUTOXYPHOSPHINYL)MALONYL]GLYCINESTER	27

2.3.3	(2 <i>RS</i> )- <i>N</i> [(3 <i>S</i> )-3-AMINO-3-CARBOXYPROPYL]- <i>N</i> <sup>1</sup> -(CARBOXYMETHYL)-2-(DI- <i>N</i> -BUTOXYPHOSPHINYL)MALONSÄUREDIAMID	31
<b>2.4</b>	<b>DOPPELT RETRO-INVERSER PHOSPHONSÄUREDIESTER</b>	<b>32</b>
2.4.1	GESCHÜTZTE <i>N</i> <sup>γ</sup> -[(2 <i>RS</i> )-2-AMINO-2-(DI- <i>N</i> -BUTOXYPHOSPHINYL)ACETYL]-L-2,4-DIAMINO BUTTERSÄURE	33
2.4.2	<i>N</i> <sup>γ</sup> -[(2 <i>RS</i> )-2-MALONYLAMINO-2-(DI- <i>N</i> -BUTOXYPHOSPHINYL)ACETYL]-L-2,4-DIAMINO BUTTERSÄURE	34
<b>2.5</b>	<b>RETRO-INVERSES PHOSPHONSÄUREDIESTERFRAGMENT</b>	<b>35</b>
2.5.1	<i>N</i> <sup>α</sup> - <i>TERT.</i> -BUTOXYCARBONYL- <i>N</i> <sup>γ</sup> -[2-(DI- <i>N</i> -BUTOXYPHOSPHINYL)ACETYL]-L-2,4-DIAMINO BUTTERSÄURE- <i>TERT.</i> -BUTYLESTER	35
2.5.2	<i>N</i> <sup>γ</sup> -[2-(DI- <i>N</i> -BUTOXYPHOSPHINYL)ACETYL]-L-2,4-DIAMINO BUTTERSÄURE	36
2.5.3	VERSUCHTE UMSETZUNG ZU (2 <i>S</i> ,7 <i>RS</i> )-2-AMINO-7-(DI- <i>N</i> -BUTOXYPHOSPHINYL)-6,8-DIOXO-5-AZAUNDECAN-1,11-DISÄURE	36
<b>2.6</b>	<b>GLYCYL-ETHYLESTER DER PHOSPHONSÄUREDIESTER</b>	<b>37</b>
2.6.1	<i>N</i> [(2 <i>RS</i> )-2-BENZYLOXYCARBONYLAMINO-2-(DI- <i>N</i> -BUTOXYPHOSPHINYL)ACETYL]GLYCINETHYLESTER	37
2.6.2	<i>N</i> [(2 <i>RS</i> )-2-γ-L-GLUTAMYLAMINO-2-(DI- <i>N</i> -BUTOXYPHOSPHINYL)ACETYL]GLYCINETHYLESTER	38
<b>2.7</b>	<b>NMR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>39</b>
2.7.1	2-AMINO-2-(DIALKOXYPHOSPHINYL)ESSIGSÄURE-DERIVATE	39
2.7.2	2-(DIALKOXYPHOSPHINYL)ESSIGSÄURE-DERIVATE	41
2.7.3	2-(DIALKOXYPHOSPHINYL)MALONSÄURE-DERIVATE	44
<b>2.8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>HEMMUNG DER GST-AKTIVITÄT</b>	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>47</b>
<b>3.2</b>	<b>BESTIMMUNG DER IC<sub>50</sub>-WERTE</b>	<b>51</b>
3.2.1	HEMMUNG VON GLUTATHION S-TRANSFERASE A1-1	52
3.2.2	HEMMUNG VON GLUTATHION S-TRANSFERASE M1-1	53

3.2.3	HEMMUNG VON GLUTATHION S-TRANSFERASE P1-1	54
<b>3.3</b>	<b>DISKUSSION DER ERGEBNISSE</b>	<b>55</b>
<b>3.4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>60</b>
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>62</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>67</b>
<b>5.1</b>	<b>ALLGEMEINE HINWEISE</b>	<b>67</b>
<b>5.2</b>	<b>SYNTHESEN</b>	<b>68</b>
5.2.1	SEITENKETTENVERLÄNGERTER PHOSPHONSÄUREDIESTER	68
5.2.1.1	<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-L-serin ( <b>27</b> )	68
5.2.1.2	<i>N</i> -( <i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-L-seryl)glycin- <i>tert.</i> -butylester ( <b>29a</b> )	69
5.2.1.3	<i>N</i> -( <i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-L-seryl)glycinethylester ( <b>29b</b> )	70
5.2.1.4	<i>N</i> [ <i>N</i> -( <i>N</i> -Benzyloxycarbonyl- <i>O</i> <sup>α</sup> -benzyl- $\gamma$ -L-glutamyl)-L-seryl]glycin- <i>tert.</i> -butylester ( <b>30a</b> )	71
5.2.1.5	<i>N</i> [ <i>N</i> -( <i>N</i> -Benzyloxycarbonyl- <i>O</i> <sup>α</sup> -benzyl- $\gamma$ -L-glutamyl)-L-seryl]glycinethylester ( <b>30b</b> )	73
5.2.1.6	<i>N</i> [(2 <i>S</i> )-2- $\gamma$ -L-Glutamylamino-3-(di- <i>n</i> -butoxyphospinyl)propionyl]glycin ( <b>17a</b> )	74
5.2.1.7	<i>N</i> [(2 <i>S</i> )-2- $\gamma$ -L-Glutamylamino-3-(di- <i>n</i> -butoxyphospinyl)propionyl]glycinethylester ( <b>17b</b> )	75
5.2.2	VERSUCHE ZUR DARSTELLUNG VON PHOSPHONSÄUREESTERN ÜBER MICHAELIS-ARBUZOV-REAKTION UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER HALOGENIERUNG VON SERIN-DERIVATEN	77
5.2.2.1	<i>N</i> -Benzyloxycarbonyl-L-serinmethylester ( <b>31</b> )	77
5.2.2.2	(2 <i>S</i> )-2-Benzyloxycarbonylamino-3-(di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)-propionsäuremethylester ( <b>32</b> )	78
5.2.3	RETRO-INVERSER PHOSPHONSÄUREDIESTER	80
5.2.3.1	2-(Di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)essigsäure- <i>tert.</i> -butylester ( <b>39</b> )	80
5.2.3.2	(2 <i>RS</i> )-2-(Di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)malonsäurebenzyl- <i>tert.</i> -butylester ( <b>40</b> )	81

5.2.3.3	<i>N</i> -[(2 <i>RS</i> )- <i>O</i> -Benzyl-2-(di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)malonyl]glycin- <i>tert.</i> -butylester ( <b>41</b> )	82
5.2.3.4	2-(Di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)essigsäurebenzylester ( <b>43</b> )	84
5.2.3.5	2-(Di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)essigsäure ( <b>44</b> )	85
5.2.3.6	<i>N</i> -[2-(Di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)acetyl]glycin- <i>tert.</i> -butylester ( <b>45</b> )	86
5.2.3.7	<i>N</i> -[2-(di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)acetyl]- <i>N</i> -(Benzyloxycarbonyl)glycin- <i>tert.</i> -butylester ( <b>46</b> )	87
5.2.3.8	(2 <i>RS</i> )- <i>N</i> -[(3 <i>S</i> )-3-Amino-3-carboxypropyl]- <i>N</i> '-(carboxymethyl)-2-(di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)malonsäurediamid ( <b>18</b> )	88
5.2.4	DOPPELT RETRO-INVERSER PHOSPHONSÄUREDIESTER	90
5.2.4.1	(2 <i>RS</i> )-2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-methoxyessigsäuremethylester ( <b>48</b> )	90
5.2.4.2	(2 <i>RS</i> )-2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-(di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)essigsäuremethylester ( <b>49</b> )	91
5.2.4.3	<i>N</i> <sup>α</sup> -( <i>tert.</i> -Butoxycarbonyl)- <i>N</i> <sup>γ</sup> -[(2 <i>RS</i> )-2-(benzyloxycarbonylamino)-2-(di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)acetyl]-L-2,4-diaminobuttersäure- <i>tert.</i> -butylester ( <b>50</b> )	92
5.2.4.4	<i>N</i> <sup>α</sup> -( <i>tert.</i> -Butoxycarbonyl)- <i>N</i> <sup>γ</sup> -[(2 <i>RS</i> )-2-( <i>O</i> - <i>tert.</i> -butyl-malonylamino)-2-(di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)acetyl]-L-2,4-diaminobuttersäure- <i>tert.</i> -butylester ( <b>51</b> )	93
5.2.4.5	<i>N</i> <sup>γ</sup> -[(2 <i>RS</i> )-2-Malonylamino-2-(di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)acetyl]-L-2,4-diaminobuttersäure ( <b>19</b> )	95
5.2.5	RETRO-INVERSE PHOSPHONSÄUREDIESTERFRAGMENT	96
5.2.5.1	<i>N</i> <sup>α</sup> -( <i>tert.</i> -Butoxycarbonyl)- <i>N</i> <sup>γ</sup> -[2-(di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)acetyl]-L-2,4-diaminobuttersäure- <i>tert.</i> -butylester ( <b>52</b> )	96
5.2.5.2	<i>N</i> <sup>γ</sup> -[2-(Di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)acetyl]-L-2,4-diaminobuttersäure ( <b>20</b> )	97
5.2.6	GLYCYL-ESTER DES PHOSPHONSÄUREDIESTERS	98
5.2.6.1	<i>N</i> -[(2 <i>RS</i> )-2-Benzyloxycarbonylamino-2-(di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)acetyl]-glycinethylester ( <b>56</b> )	98
5.2.6.2	<i>N</i> -[(2 <i>RS</i> )-2-( <i>N</i> -Benzyloxycarbonyl- <i>O</i> <sup>α</sup> -benzyl- $\gamma$ -L-glutamyl)amino-2-(di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)acetyl]glycinethylester ( <b>57</b> )	99
5.2.6.3	<i>N</i> -[(2 <i>RS</i> )-2-( $\gamma$ -L-Glutamylamino)-2-(di- <i>n</i> -butoxyphosphinyl)-acetyl]-glycinethylestermonoformiat ( <b>14f</b> )	101

<b>5.3</b>	<b>HEMMUNG DER GST-AKTIVITÄT</b>	<b>102</b>
5.3.1	GERÄTE UND CHEMIKALIEN	102
5.3.2	BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT	102
5.3.3	BESTIMMUNG DER IC <sub>50</sub> -WERTE	102
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>104</b>



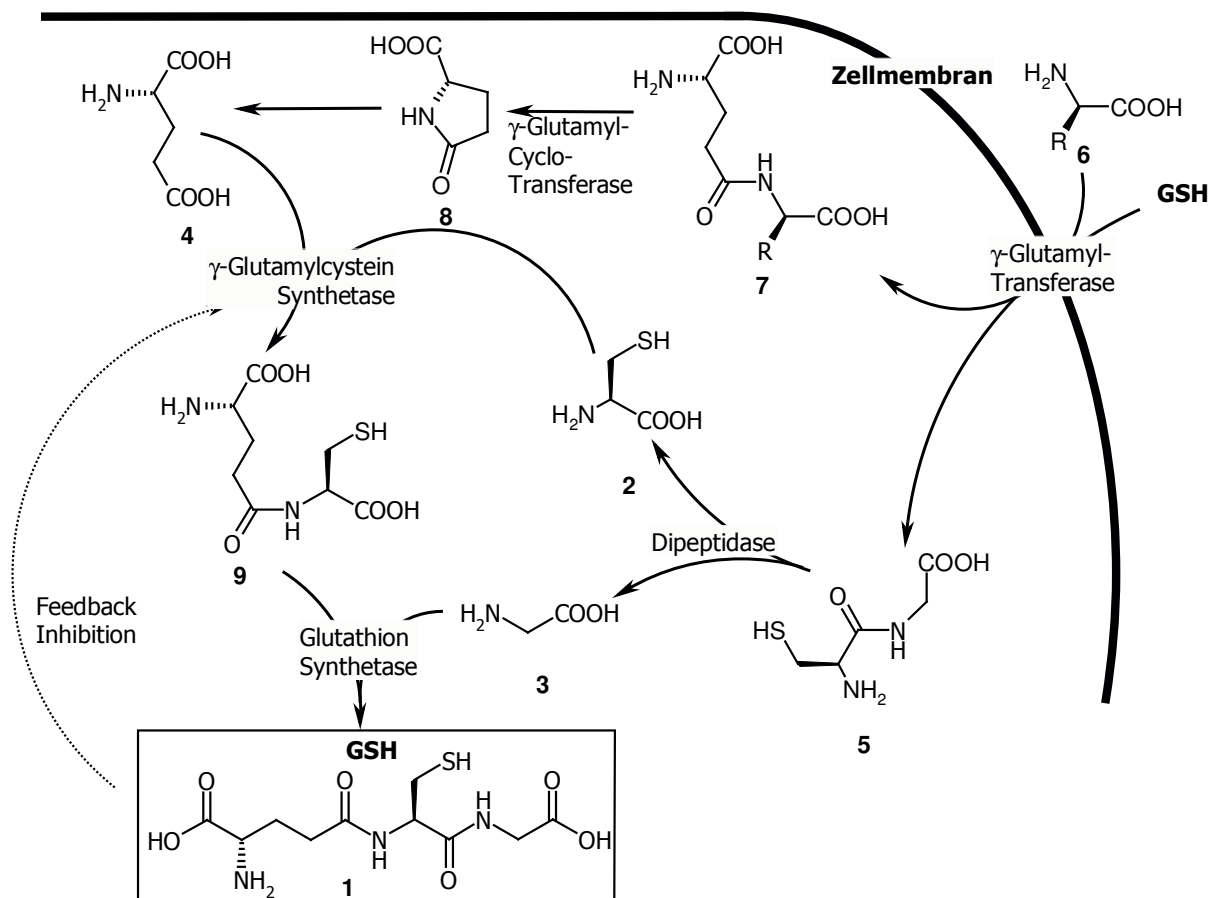


# 1 EINLEITUNG

## 1.1 FUNKTION, VORKOMMEN UND ISOENZYME VON GLUTATHION S-TRANSFERASEN

### 1.1.1 FUNKTION

Glutathion (**1**; GSH) ist ein ubiquitär vorkommendes Tripeptid, das sich aus den nicht essentiellen Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin zusammensetzt. Es ist das wichtigste nicht-proteingebundene Thiol in der Zelle und weist in vielen Geweben eine Konzentration im millimolaren Bereich auf<sup>[1,2]</sup>. GSH wird über die ATP-abhängigen Enzyme  $\gamma$ -Glutamylcystein Synthetase und Glutathion Synthetase aufgebaut. Die Bereitstellung der benötigten Aminosäuren Cystein (**2**), Glycin (**3**) und Glutaminsäure (**4**) erfolgt entweder durch de Novo-Synthese aus essentiellen Aminosäuren oder durch Wiederverwertung (Glutamyl-Zyklus; Abb. 3) von GSH.

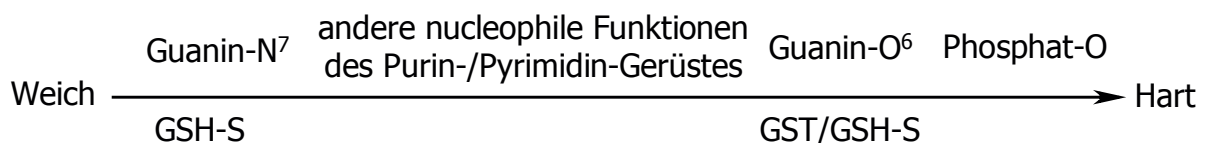


**Abb. 3:** GSH-Synthese durch Wiederverwertung (modifiziert nach Abhijit und Tew<sup>[3]</sup> und Meister<sup>[4]</sup>)

Dabei spaltet die  $\gamma$ -Glutamyl Transferase (GGT) extrazelluläres Glutathion zu Cysteinylglycin (**5**) und überträgt den Glutamyl-Rest auf eine Aminosäure (**6**). Diese beiden Bruchstücke werden in die Zelle transportiert und dort zu GSH aufgebaut. Die  $\gamma$ -Glutamylaminosäure (**7**) wird im weiteren Verlauf in der Zelle gespalten und über 5-Oxoprolin (**8**) als Zwischenstufe zur freien Glutaminsäure (**4**) umgesetzt. Diese wird dann mit Cystein (**2**) durch die  $\gamma$ -Glutamylcystein Synthetase zum  $\gamma$ -Glutamylcystein (**9**) zusammengesetzt. An diesen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt schließt sich die Bildung des GSH durch die Glutathion Synthetase an, die das  $\gamma$ -Glutamylcystein mit Glycin (**3**) verbindet.

Glutathion spielt als Cosubstrat verschiedener Enzyme wie der Formaldehyd Dehydrogenase, Prostaglandin H Synthetase, Maleylacetoacetat Isomerase, DDT-Dehydrochlorinase, Glutathion Peroxidase/Reduktase, Glyoxalase I und II und der Glutathion S-Transferase (GST; EC 2.5.1.18) eine für jede Zelle lebenswichtige Rolle<sup>[4]</sup>.

GSH kann die Zelle bereits durch spontane Thiolierung mit Elektrophilen gegen entsprechende Angriffe schützen. Allerdings reagiert der Schwefel der Thiol-Funktion als weiche Base nur mit vergleichbar weichen Elektrophilen, die ähnlich weiche Nucleophile der Zelle wie z.B. den N<sup>7</sup>-Stickstoff des Guanins angreifen würden. So kann Glutathion als früher, evolutionärer Schutz der Zelle gegen elektrophile Angriffe angesehen werden<sup>[5]</sup>.



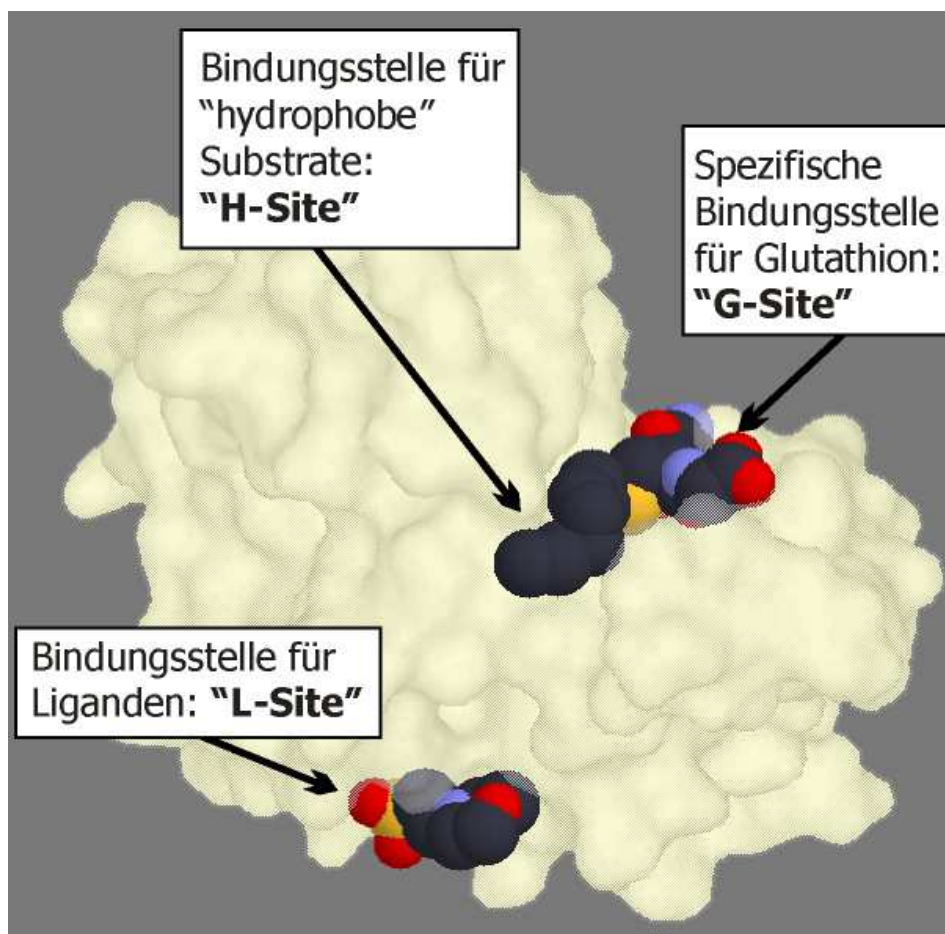
**Abb. 4:** Einordnung verschiedener Nucleophile der DNA-Bausteine und des GSH-Schwefels nach dem HSAB-Konzept<sup>[5]</sup>

Der Schutz gegen elektrophile Angriffe auf härtere Nucleophile innerhalb der DNA wie die anderen Pyrimidin-/Purin-Stickstoffe oder den O<sup>6</sup>-Sauerstoff des Guanins kann durch eine Erweiterung der Reaktionsbreite durch Glutathion S-Transferasen erzielt werden (Abb. 4).

GSTs katalysieren die Umsetzung elektrophiler Substanzen mit GSH zu Thioethern

oder -estern und gehören zur Familie der Phase-II-Enzyme. Die entstehenden Konjugate sind hydrophiler und häufig weniger toxisch als die Ausgangsverbindungen und können durch ATP-abhängige Pumpen wie das Multidrug-Resistance-Associated-Protein (MRP; GS-X Pumpe)<sup>[6]</sup>, den Multi-Organic-Anion-Transporter (MOAT)<sup>[7]</sup> oder das P-Glycoprotein (MDR1)<sup>[8]</sup> aus der Zelle transportiert werden.

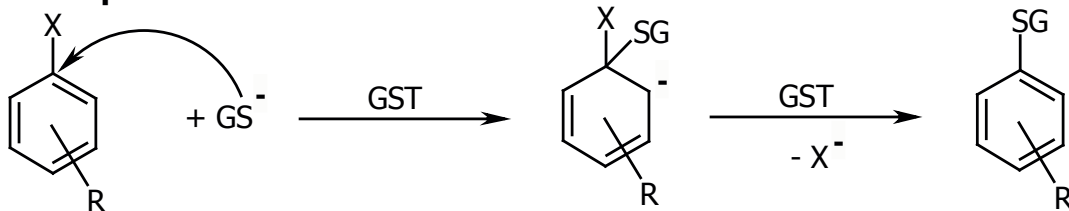
Neben der Bindungsstelle für hydrophobe, elektrophile Substrate („H-Site“) und der Bindungsstelle für das Cosubstrat Glutathion („G-Site“) besitzt die GST noch eine weitere für endogene, hydrophobe Liganden („L-Site“). An diese L-Site bindet eine Vielzahl von Verbindungen, die nicht weiter umgesetzt werden, unter anderem Steroide, Produkte des Häm-Stoffwechsels, Bilirubin, Gallensäure und Hormone<sup>[3]</sup>. Die Fähigkeit zur Bindung an verschiedene Liganden führte auch zur ersten Namensgebung dieser Proteine, die anfangs als „Ligandin“ bezeichnet wurden<sup>[9]</sup>. Eine Darstellung der Bindungsstellen des GST findet sich in Abb. 5.



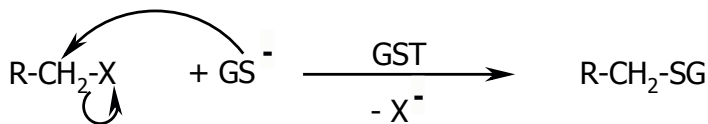
**Abb. 5:** Darstellung der Bindungsstellen eines GST-Monomers am Beispiel von S-Hexylglutathion und 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure und hGSTP1<sup>[10]</sup>

Durch die unspezifische Bindungsstelle für hydrophobe Substanzen und die Existenz verschiedener Isoenzyme können Glutathion S-Transferasen eine Vielzahl an strukturell unterschiedlichen Verbindungen als Substrate umsetzen. In Abb. 6 sind die unterschiedlichen Reaktionstypen von GSTs mit GSH und den entstehenden Konjugationsprodukten zusammengefasst<sup>[11]</sup>.

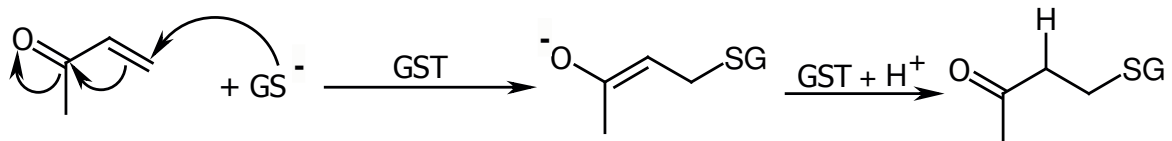
**(A) Nucleophile aromatische Substitution**



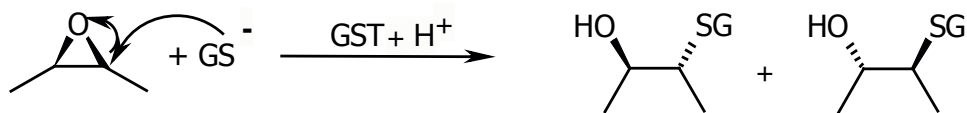
**(B) Nucleophile aliphatische Substitution**



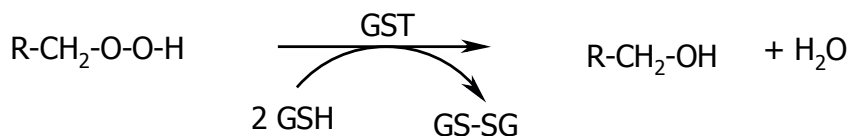
**(C) Michael-Addition an  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Ketone**



**(D) Ringöffnung von Epoxiden**



**(E) Reduktion von Hydroperoxiden**



**Abb. 6:** Mechanismen der GST-katalysierten Reaktionen von Glutathion

Zu den katalysierten Reaktionen gehören die nucleophile Substitution von Halogenarylverbindungen (A) und Alkylhalogeniden (B), die Addition an aktivierte Doppelbindungen wie beispielsweise an  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindungen (C), die Addition an Epoxide (D) und die Reduktion von Peroxiden (E).

Die Reaktionstypen A und B führen zur Detoxifikation von Alkylantien, Herbiziden oder Pestiziden. Zu den wichtigen Verbindungen, die nach C vom GSH/GST-System umgesetzt werden, gehört Acrolein, das u.a. durch die Bioaktivierung des Zytostatikums Cyclophosphamid entsteht. Wichtige Schritte zur Entgiftung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen sind die Bildung von Epoxiden durch P450-Enzyme und anschließende Konjugation mit Glutathion wie in D beschrieben. Reaktionstyp E spielt in der Bekämpfung des oxidativen Stresses in der Zelle eine wichtige Rolle, bei der endogen gebildete Peroxide zu Alkoholen umgesetzt werden.

### **1.1.2 VORKOMMEN UND ISOENZYME**

Glutathion S-Transferasen werden in die Familien der löslichen (cytosolischen) und der unlöslichen (mikrosomalen) Transferasen unterteilt. Die löslichen GSTs haben ein Molekulargewicht von ungefähr 50 kDa und treten ausschließlich als Dimere auf, die aus 24-28 kDa großen monomeren Untereinheiten bestehen. In Säugetieren werden sie in acht Klassen (Alpha, Kappa, Mu, Pi, Sigma, Theta, Zeta und Omega<sup>[12,13,14]</sup>) eingeteilt, in Insekten und Pflanzen gibt es darüber hinaus noch weitere Klassen<sup>[14]</sup>. Diese Einteilung erfolgt auf der Basis von Sequenzhomologien. Als weitere Parameter werden zur Klassifizierung die molaren Massen, isoelektrischen Punkte, immunologischen Eigenschaften und Substrat- und Hemmcharakteristika herangezogen.

Die Untereinheiten jeder Klasse werden mit arabischen Zahlen gekennzeichnet. Innerhalb einer Klasse beträgt die Sequenzhomologie mindestens 70%, während Isoenzyme unterschiedlicher Klassen lediglich eine Homologie von ca. 30 – 40% aufweisen<sup>[2,15]</sup>. Zur genaueren Bezeichnung der Isoenzyme wird im Folgenden die Nomenklatur benutzt, die für humane GSTs eingeführt und von Mannervik *et al.*<sup>[16]</sup> auf alle Säugetiere übertragen wurde. So steht beispielsweise die Bezeichnung pGSTM1-1 (oder kurz pM1-1) für ein aus dem Schwein isoliertes GST-Isoenzym der Klasse Mu, das als Homodimer aus den Untereinheiten des Typs 1 aufgebaut ist. Die Untereinheiten reagieren allerdings unabhängig voneinander und zeigen keine Kooperativität<sup>[17,18]</sup>.

Eine Sonderstellung nimmt das mitochondriale Isoenzym der Klasse Kappa ein, da dieses zwar löslich ist, nicht aber im Cytosol vorhanden zu sein scheint<sup>[12]</sup>.

Von den Glutathion S-Transferasen wurden viele Kristallstrukturen veröffentlicht, die einen guten Einblick in den Mechanismus der katalysierten Konjugatbildung mit Glutathion geben<sup>[11]</sup>. Hierbei wird das Rückgrat (backbone) des Glutathions über eine Vielzahl von Wasserstoffbrücken in einer leicht gebogenen Form gebunden und die Nucleophilie des Schwefels durch Wechselwirkung mit einem Tyrosin-Rest gesteigert. Durch die Bindung des Glutathions an das Enzym wird der pK<sub>a</sub>-Wert der Thiofunktion von ca. 9 im ungebundenen Zustand auf 6 – 7 gesenkt<sup>[19,20]</sup>. Genauere strukturelle Eigenschaften der einzelnen Isoenzyme sind in Kapitel 3.1 aufgeführt.

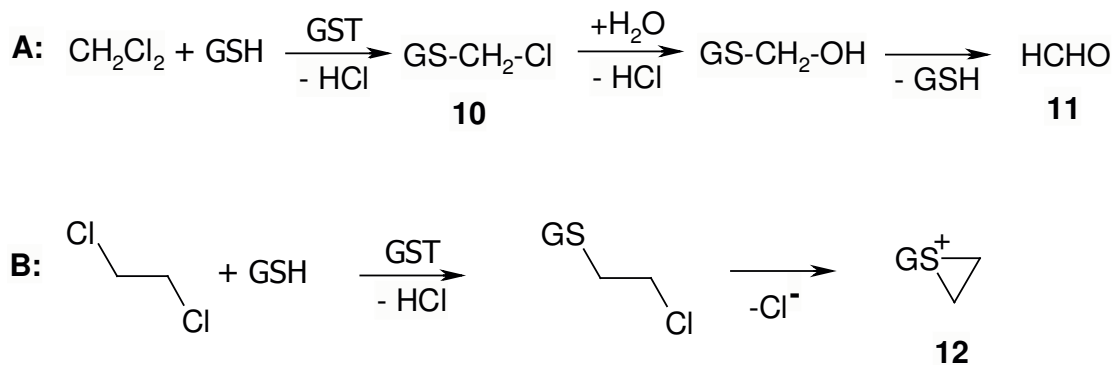
Isoenzym	Gewebe
hGSTA1	Leber ≈ Hoden >>Niere ≈ Nebenniere> Bauchspeicheldrüse
hGSTA2	Leber ≈ Hoden ≈ Bauchspeicheldrüse> Niere> Nebenniere> Gehirn> Placenta
hGSTA3	Placenta
hGSTA4	Dünndarm ≈ Milz> Leber ≈ Niere> Gehirn
hGSTK1	Leber (mitochondrial)
hGSTM1	Leber> Hoden> Gehirn> Nebenniere ≈ Niere> Lunge
hGSTM2	Gehirn ≈ Skelettmuskulatur ≈ Hoden> Herz > Niere
hGSTM3	Hoden>> Gehirn ≈ Dünndarm> Skelettmuskulatur
hGSTM4	Gehirn, Herz, Skelettmuskulatur
hGSTM5	Gehirn, Herz, Lunge, Hoden
hGSTP1	Gehirn> Herz ≈ Lunge ≈ Hoden> Niere ≈ Bauchspeicheldrüse
hGSTS1	fötale Leber, Knochenmark
hGSTT1	Niere ≈ Leber> Dünndarm> Gehirn ≈ Prostata
hGSTT2	Leber
hGSTZ1	fötale Leber; Skelettmuskulatur
hGSTO1	Leber ≈ Herz ≈ Skelettmuskulatur> Bauchspeicheldrüse> Niere

**Tab. 2:** Gewebeverteilung der löslichen GST-Isoenzyme im Menschen nach Hayes et al.<sup>[12]</sup>

Die Verteilung der einzelnen Isoenzyme ist stark gewebeabhängig. Eine Übersicht über die Verteilung der GSTs im menschlichen Gewebe ist in Tab. 2 aufgeführt. Viele Isoenzyme befinden sich in der Leber, in der auch der größte Teil der Biosynthese des Tripeptids stattfindet. Dieser Sachverhalt stimmt sehr gut mit der Rolle der GSTs als detoxifizierende Enzyme überein.

Neben der organspezifischen Isoenzymverteilung treten auch Genvariationen der GSTs in verschiedenen Populationen auf. Dieser Polymorphismus betrifft Gendelationen, die zum Verlust der katalytischen Aktivität des Isoenzym führen<sup>[12]</sup>. Er kann aber auch zu einer erhöhten Expression eines Isoenzym führen<sup>[21]</sup>.

Der Polymorphismus ist am besten für das Isoenzym hGSTT1 untersucht. Während die Isoenzyme der Klassen Alpha, Mu und Pi vor allem Arylhalogene detoxifizieren, haben die Isoenzyme der Klasse Theta eine besonders hohe Affinität zu kurzkettigen Halogenalkanen. Bei der Konjugation dieser Verbindungen mit GSH entstehen jedoch Metaboliten, die Schwefellosten ähneln und eine höhere Toxizität aufweisen können als die Ausgangssubstanzen. Als toxische Metaboliten sind unter anderem Halogenmethyl-Konjugate (**10**), Formaldehyd (**11**) und Episulfonium-Ionen (**12**) zu nennen.



**Abb. 7:** Giftung von kurzkettigen Alkylhalogenen durch Entstehung von Halogenmethyl-Konjugaten (**10**) und Formaldehyd (**11**) oder von Episulfonium-Ionen (**12**)

Besonders hGSTT1 kann Substanzen wie Dichlormethan oder Dibrommethan durch Konjugation mit GSH zu Metaboliten mit neurotoxischen Eigenschaften umsetzen<sup>[22]</sup>. Bei Individuen mit positivem hGSTT1-Phänotyp kann es daher bei Exposition mit diesen Lösungsmitteln zu neurotoxischen Vergiftung kommen<sup>[23]</sup>.

## **1.2 BEDEUTUNG DER GLUTATHION S-TRANSFERASEN FÜR DIE RESISTENZ BEI DER CHEMOTHERAPIE MALIGNER ERKRANKUNGEN**

Betrachtet man lediglich die Rolle der Glutathion S-Transferasen für den Zellschutz, so stellt sich die Frage nach dem therapeutischen Sinn der Hemmung dieses Systems. Dazu soll im Folgenden auf die Bedeutung des GSH/GST-Systems bei der Entwicklung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika maligner Erkrankungen eingegangen werden.

### **1.2.1 RESISTENZMECHANISMEN BEI DER CHEMOTHERAPIE MALIGNER ERKRANKUNGEN**

Das größte Problem bei der Therapie von Tumoren ist die während der Behandlung auftretende Resistenz des Gewebes gegen die verabreichten Chemotherapeutika. Häufig betrifft diese erworbene Resistenz auch Arzneistoffe, die im Rahmen der Therapie gar nicht verabreicht wurden und deren Strukturen wenige oder keine Gemeinsamkeiten mit den verabreichten Substanzen aufweisen. Dieses Phänomen wird als Mehrfachresistenz (multidrug resistance; MDR) bezeichnet<sup>[24]</sup>.

Bei der Zytostatika-Resistenz müssen nichtzelluläre und zelluläre Faktoren unterschieden werden. Nichtzelluläre Faktoren umfassen alle Vorgänge, welche die Wirksamkeit von Zytostatika außerhalb der Krebszelle beeinflussen. Zu dieser Gruppe zählen verminderte Bioverfügbarkeit, gesteigerte Ausscheidung und andere pharmakokinetische Faktoren. Diese Mechanismen können nur *in vivo* untersucht werden und sollen im Folgenden nicht weiter betrachtet werden.

Als zelluläre Faktoren können folgende Mechanismen aufgeführt werden<sup>[25,26,27]</sup>:

- Verstärkte Aktivität von Reparatur-Enzymen
- Veränderung des Arzneistofftransportes
  - verringerte Aufnahme von Arzneistoffen
  - verstärkte Ausscheidung des Arzneistoffes oder dessen Detoxifikationsprodukte



- Veränderung der Zielstruktur (qualitativ/quantitativ)
- Veränderung des Metabolismus
  - verringerte Aktivierung des Arzneistoffes (Freisetzung eines Pro-Drugs)
  - verstärkte Deaktivierung des Arzneistoffes (Detoxifikationsreaktionen)
- Verringerte Apoptose

Eine verringerte Aufnahme in die Zelle wurde beispielsweise für den Arzneistoff Methotrexat beschrieben<sup>[26]</sup>.

Die verstärkte Ausscheidung von Arzneistoffen aus der Zelle wird vor allem durch die ATP-abhängigen Efflux-Pumpen bewirkt. Diese Pumpen transportieren eine Vielzahl von strukturell unterschiedlichen Verbindungen aus der Zelle. Die Überexpression dieser Proteine führt im allgemeinen zu einer Kreuzresistenz<sup>[28]</sup>. Die wichtigste unidirektionale Efflux-Pumpe stellt das P-Glycoprotein (P-gp, MDR1)<sup>[24,29]</sup> als Gen-Produkt des MDR-Gens dar. P-gp transportiert eine Vielzahl von verschiedenen Substanzen und Arzneistoffen wie z.B. Doxorubicin, Etoposid oder Vincristin aus der Zelle. Aber auch das Multidrug-resistance-associated-protein (MRP1) ist hier einzuordnen<sup>[6]</sup>. Es transportiert vor allem Glutathion-Konjugate aus der Zelle.

Eine Veränderung der Zielstruktur findet sich bei der Topoisomerase II wieder. So wird im Verlaufe der Therapie mit Topoisomerase II-Hemmern (z.B. Etoposid) sowohl die Expression der Enzyme vermindert, als auch strukturell veränderte Topoisomerasen exprimiert, die zu einer Verminderung der Hemmwirkung und so zu einer Resistenz der Zelle gegen die eingesetzten Arzneistoffe führen können<sup>[30]</sup>.

Bei Antimetaboliten wie beispielsweise Fluorouracil oder 6-Thioguanin, die zunächst zu Nucleotid-Analoga metabolisiert werden müssen, konnte eine verringerte Aktivierung mit einer Resistenzzunahme in Zusammenhang gebracht werden<sup>[26]</sup>.

Eine verstärkte Deaktivierung von Cisplatin und Doxorubicin wird bei der verstärkten Expression von Metallthioneinen diskutiert<sup>[31]</sup>. Eine weitere wichtige Möglichkeit zur Inaktivierung stellt das GSH/GST-System dar, auf dessen besondere Bedeutung in Kapitel 1.2.2 näher eingegangen wird.

Die Veränderung der Apoptose wird durch verschiedene Genprodukte beeinflusst. Die daraus entwickelten Resistenzen richten sich gegen verschiedene Zytostatika wie Doxorubicin, Vincristin, Methotrexat, Cisplatin oder Etoposid.

### **1.2.2 BEDEUTUNG DES GSH/GST-SYSTEMS INNERHALB DER RESISTENZMECHANISMEN**

Die Überexpression von GST-Isoenzymen ist ein entscheidender Faktor in der Resistenz gegenüber zahlreichen Zytostatika<sup>[32]</sup>. Untersuchungen an Zelllinien bringen eine Resistenz gegen Zytostatika mit einer Überexpression von einzelnen GST-Isoenzymen in Zusammenhang.

Neuere klinische Untersuchungen an Patienten mit Ovarial-Karzinomen<sup>[33]</sup> und Leukämie<sup>[34]</sup> weisen ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen GST-Überexpression und Resistenz hin.

Morrow *et al.*<sup>[35]</sup> untersuchten Brustkrebszellen auf Resistenz gegen verschiedene Zytostatika. Dabei wurde besonders das Zusammenspiel zwischen MRP1 und hGSTA1-1 untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass eine Überexpression von hGSTA1-1 allein keine Resistenz gegen Chlorambucil bewirkt. Auch die einseitige Überexpression von MRP1 erbrachte keine Steigerung der Resistenz gegen das verabreichte Chemotherapeutikum.

Zellen bildeten nur dann eine Resistenz gegen Chlorambucil aus, wenn sowohl MRP1 und GST überexprimiert waren. Erklärt wurde dieser Befund mit der Theorie, dass das GSH/GST-System Chlorambucil nicht völlig detoxifiziert, sondern lediglich die Giftigkeit reduziert und das gebildete Konjugat durch die MRP1-Pumpe aus der Zelle entfernt werden muss.

### **1.2.3 MAßNAHMEN ZUR VERMINDERUNG DER RESISTENZ IN DER CHEMOTHERAPIE MALIGNER ERKRANKUNGEN**

Zur Verminderung der Resistenz können Modulatoren parallel zur Gabe von Chemotherapeutika appliziert werden. Ziel der Kombination ist eine möglichst selektive Hemmung des für die Resistenz verantwortlichen Mechanismus.

Als Modulatoren des GSH/GST-Systems wurden bisher vor allem Buthioninsulfoximin als irreversibler Inhibitor der  $\gamma$ -Glutamylcystein Synthetase<sup>[36]</sup> und die GST-Inhibitoren Etacrynsäure und Sulphasalazin eingesetzt.

Diesen Hemmstoffen ist gemein, dass sie nicht isoenzymspezifisch wirken und somit auch nicht erkranktes Gewebe schädigen. So ist die Hemmung der Glutathionbiosynthese nur dann sinnvoll, wenn der Tumor eine deutlich geringere Konzentration an GSH besitzt, da sonst in gleichem Maße auch gesundes Gewebe betroffen wäre. Die Polymorphismen der GSTs und die organspezifische Verteilung von GST-Isoenzymen erfordern Inhibitoren, die selektiv auf einzelne Isoenzyme wirken.

### **1.3 ENTWICKLUNG VON INHIBITOREN DER GLUTATHION S-TRANSFERASEN**

Zur Modulation des GSH/GST-Systems sind zwei Ansätze denkbar: Zum einen die Hemmung der Glutathionbiosynthese, um die Konzentration an Cosubstrat gering zu halten und zum anderen die direkte Hemmung der Glutathion S-Transferase.

Zur Entwicklung von Inhibitoren der GSTs existieren unterschiedliche Ansätze, basierend auf den unterschiedlichen Bindungsstellen der GSTs, die im Folgenden dargestellt werden.

#### **1.3.1 ETACRYNSÄURE UND SULPHASALAZIN**

Etacrynsäure und Sulphasalazin binden an die H-Site der GSTs und stellen sowohl Substrate als auch Inhibitoren des GSH/GST-Systems dar.

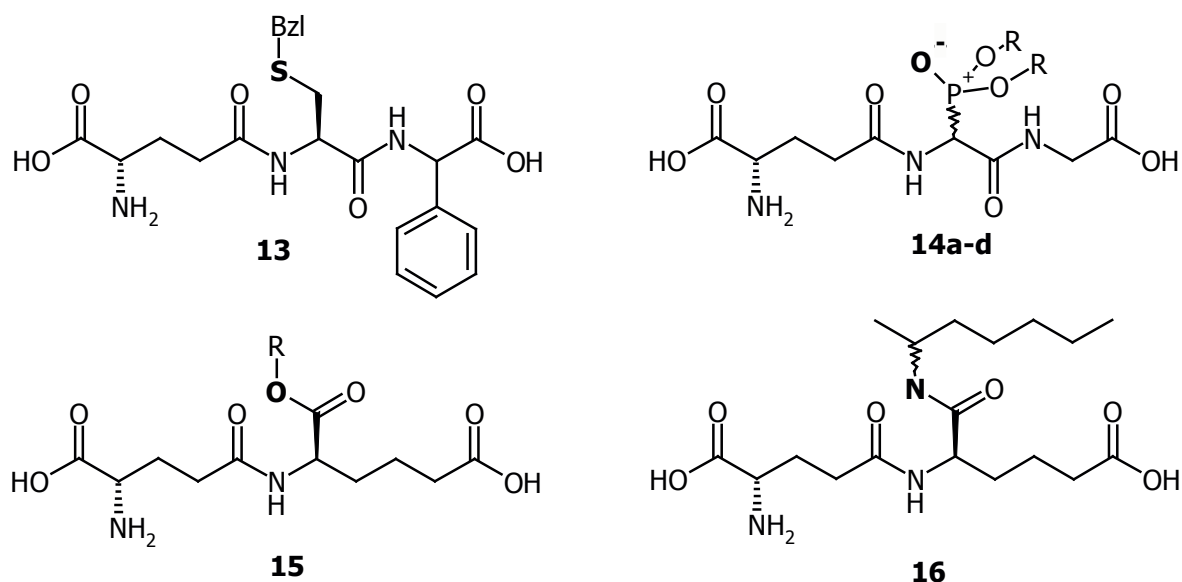
Testungen an Zelllinien weisen eine deutliche Erhöhung der Zytotoxizität von Alkylantien bei Zugabe von Etacrynsäure auf<sup>[37,38]</sup>. So untersuchten Caffrey *et al.*<sup>[39]</sup> Ovarial-Tumorzellen, die durch Zugabe geringer Dosen von Melphalan eine Resistenz gegen diesen Arzneistoff entwickelten. Durch Zugabe von Etacrynsäure zu den resistenten Zellen konnte diese Resistenz aufgehoben werden. Wurden noch nicht resistente Zellen gleichzeitig mit Melphalan und Etacrynsäure behandelt, blieb eine Resistenzbildung aus. Klinische Studien mit beiden Arzneistoffen zeigen jedoch widersprüchliche Ergebnisse<sup>[40,41,42]</sup>.

Zudem haben sich die Nebenwirkungen des Diuretikums Etacrynsäure auf den

Elektrolythaushalt als zu schwer herausgestellt<sup>[40]</sup>. Weiterhin induziert Etacrynsäure die Bildung von GSTs<sup>[43,44]</sup> und durch die Bindung an die H-Site der Glutathion S-Transferasen zeigt sich eine fehlende Isoenzympezifität, die bei der Bekämpfung von Tumorresistenzen erforderlich wäre, um die Auswirkungen der Chemotherapie auf gesundes Gewebe möglichst zu reduzieren<sup>[45]</sup>.

### 1.3.2 ANALOGA DES GSH

Ein anderer Ansatz zur Hemmung der GSTs besteht in der Verwendung von Substanzen, die an die G-Site binden, aber nicht weiter umgesetzt werden können. Diese Substanzen (Abb. 8) besitzen entweder einen bereits kovalent gebundenen Schwefel (**13**)<sup>[46]</sup> oder aber einen Sauerstoff (**14a-d**)<sup>[47]</sup> und (**15**)<sup>[48]</sup> oder Stickstoff (**16**)<sup>[49]</sup>, der nicht zur Konjugation herangezogen werden kann. Der unveränderte Backbone-Bereich der Inhibitoren bewirkt dabei eine gute Bindung an das Enzym und der hydrophobe Substituent am Schwefel, Sauerstoff oder Stickstoff kann zusätzlich mit der H-Site des Enzyms in Wechselwirkung treten.



**Abb. 8:** GSH-analoge Inhibitoren TER117 (**13**), Phosphonsäurediester (**14a-d**),  $\gamma$ -L-Glu-D-Aad (**15**) und R-Hep(**16**)

Kunze<sup>[47]</sup> synthetisierte 1996 eine Reihe von Phosphono-Analoga des Glutathions. Diese Phosphonsäureester, insbesondere die *n*-Butylester (**14d**), stellen potente

Hemmstoffe der Glutathion S-Transferase dar. Innerhalb dieser Substanzklasse nimmt ein Sauerstoff der Phosphonsäure-Gruppe die Position des Schwefels aus dem Cystein des GSH ein. Dieser Sauerstoff steht nicht für Konjugationsbildungen zur Verfügung und hemmt somit die katalytische Fähigkeit des Enzyms. Außerdem zeigten die Phosphonsäureester eine hohe Selektivität gegenüber den Isoenzymen hGSTM1-1, pGSTM1-1 und pGSTM4-4<sup>[50]</sup>.

Diese Verbindungen bildeten die Grundlage für die vorliegende Arbeit, deren Thematik im Folgenden dargestellt wird.

## **1.4 THEMA UND ZIELSETZUNG**

Ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit ist die Herstellung neuer Phosphono-Analoga des Glutathions, um isoenzymspezifische Hemmstoffe zu entwickeln. Dabei sollte, aufbauend auf bereits vorliegende Substanzen einerseits ein Homologes der peptidischen Phosphono-Analoga hergestellt werden, das durch die Seitenkettenverlängerung eine andere Art der Wechselwirkung mit der G-Site des Enzyms eingeht.

Andererseits sollte der Backbone-Bereich im Sinne eines peptidomimetischen Wirkstoffes modifiziert werden, um neue Klassen von Phosphono-Analoga des Glutathions zu erschließen.

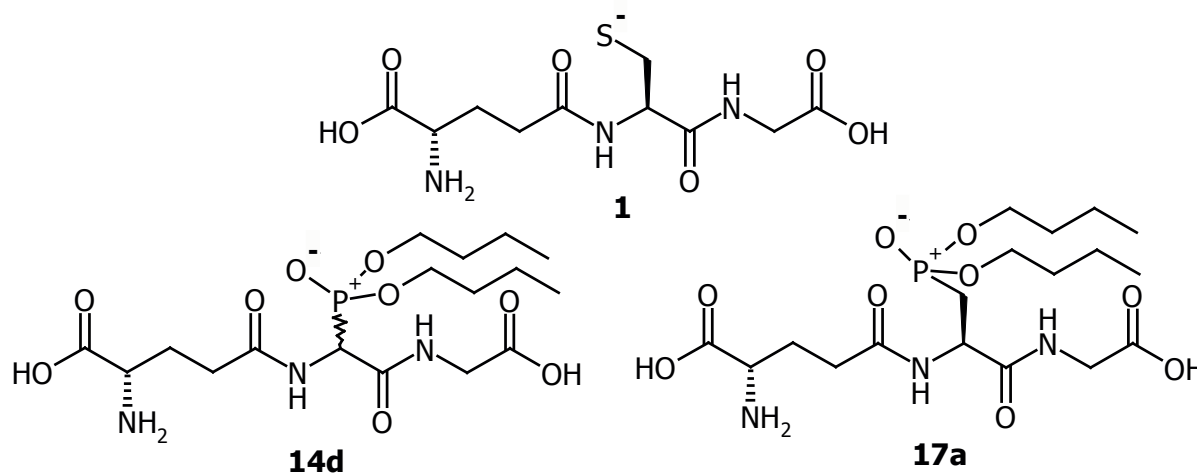
Zudem sollten die synthetisierten Substanzen auf ihre inhibitorische Wirkung hin untersucht und die unterschiedlichen Hemmwirkungen auf die einzelnen Isoenzyme aufgrund von Struktur-Wirkungs-Beziehungen erklärt werden.

### **1.4.1 PEPTIDISCHER ANSATZ**

Bei den von Kunze<sup>[47]</sup> synthetisierten Phosphono-Analoga wurde die CH<sub>2</sub>-SH-Gruppe des Glutathions formal gegen eine Dialkoxyphosphinyl-Gruppe ausgetauscht.

Im Zuge dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob ein seitenkettenverlängerter Phosphonsäurediester (**17**), bei dem die Thiol-Funktion des GSH formal gegen eine Dialkoxyphosphinyl-Gruppe ausgetauscht ist, zu einer Erhöhung oder Erniedrigung

der inhibitorischen Wirkung führt. Durch geeignete Syntheseführung sollte die sterische Information mit der des GSH übereinstimmen, was bei der Darstellung der bisherigen Phosphono-Analoga nicht möglich war. Die geplanten strukturellen Veränderungen sind in Abb. 9 zusammengefasst. Da unter den bisher getesteten Substanzen die Phosphonsäuredi-*n*-butylester die besten Hemmwirkungen aufweisen, sollte auch der seitenkettenverlängerte Phosphonsäurediester die Di-*n*-butoxyphosphinyl-Gruppe enthalten.



**Abb. 9:** Strukturelle Veränderungen der peptidischen Phosphono-Analoga im Vergleich zu GSH

## 1.4.2 PEPTIDOMIMETISCHER ANSATZ

Zu den Nachteilen von peptidischen Wirkstoffen gehören ihre ungünstigen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften<sup>[51]</sup>:

- Geringe metabolische Stabilität durch Proteolyse im Magen-Darm-Trakt
- Schlechte Absorption nach oraler Einnahme aufgrund der hohen Molekülmasse, der hohen Hydrophilie und des Fehlens von Transportsystemen
- Schnelle Ausscheidung durch Niere und Leber
- Unerwünschte Effekte durch Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Rezeptoren

Um diesen Nachteilen entgegen zu wirken, werden häufig Substanzen entwickelt, die den peptidischen Arzneistoffen im Wechselverhalten mit dem Rezeptor ähneln,

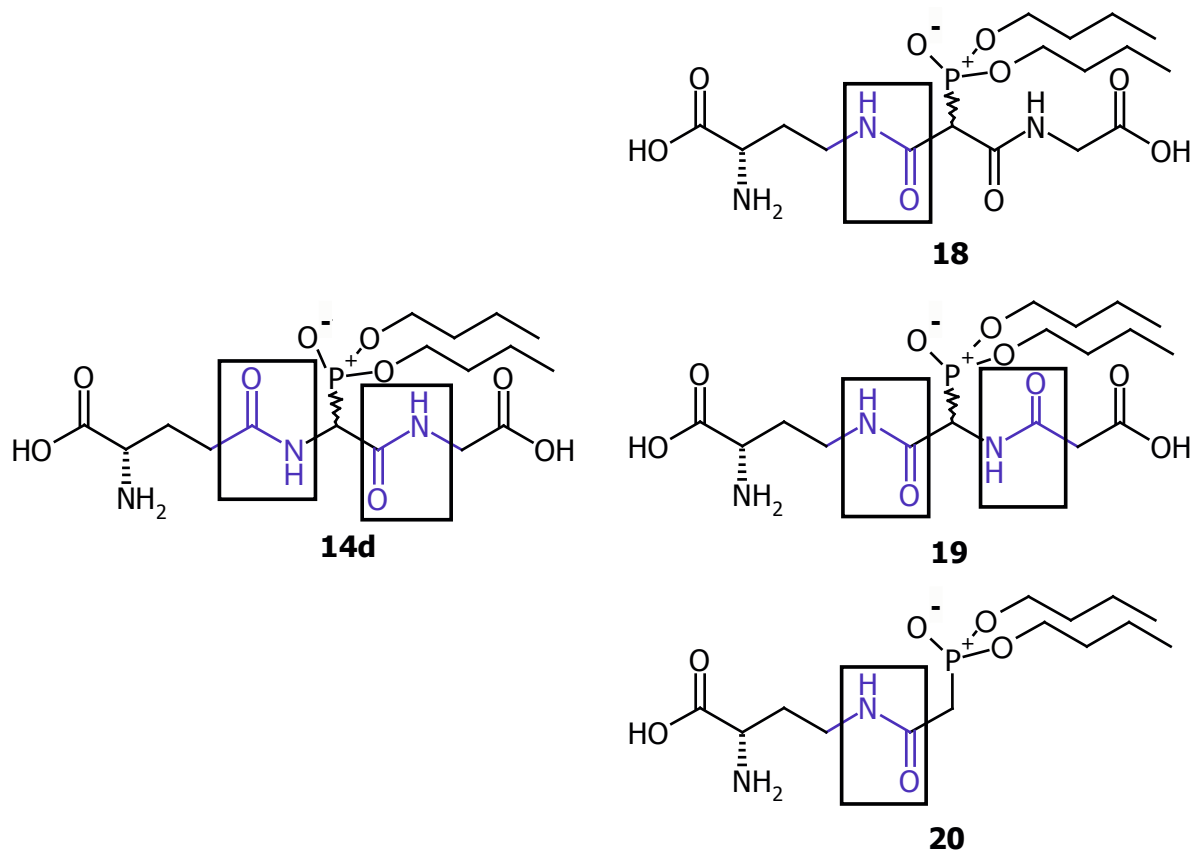
aber nicht oder nur teilweise aus Aminosäuren bestehen. Die Entwicklung solcher Peptidomimetika stellt ein lohnendes Ziel der Wirkstoffentwicklung dar. So konnten zum Beispiel effektive Protease-Hemmer für die HIV-Therapie hergestellt werden, die mittlerweile Eingang in den Arzneischatz gefunden haben<sup>[52]</sup>.

Ein besonders wichtiger Faktor, der die Bioverfügbarkeit der unter 1.3.2 aufgeführten Inhibitoren in der Zelle limitieren kann, ist die  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase (EC 2.3.2.2). Wie bereits in Kapitel 1.1.1 beschrieben, spaltet dieses Enzym extrazelluläres GSH in Glutamylaminosäure und Cysteinylglycin. Der gleiche Abbau betrifft auch Konjugate des Glutathions und andere Peptide, die eine solche  $\gamma$ -Glutamylcystein-Bindung aufweisen<sup>[48,53]</sup>. Diese Abbaureaktion galt es bei den Substanzen des peptidomimetischen Ansatzes von vornherein auszuschließen.

Als Ausgangspunkt wurde die Invertierung der Peptidbindung zwischen Glutaminsäure und Cystein gewählt. Um die Länge des Rückgrates nicht zu verändern, sollten die neuen Peptidomimetika  $N^\gamma$ -acylierte Derivate der Diaminobuttersäure sein. Zusätzlich sollte der Phosphonsäure-Teil als Di-*n*-butylester vorliegen, da diese Phosphonsäurediester in den von Kunze untersuchten Substanzen die beste inhibitorische Wirkung zeigen.

Der weitere Backbone-Bereich sollte variiert werden, um zu Verbindungen zu gelangen, die selektiv auf verschiedene GST-Isoenzyme wirken. Die Invertierung der Peptidbindungen sollte zu unterschiedlichen Wechselwirkungen mit verschiedenen Isoenzymen führen.

Die strukturellen Veränderungen der neuen peptidomimetischen Phosphonsäurediester **18**, **19** und **20** sind in Abb. 10 zusammengefasst.



**Abb. 10:** Strukturelle Veränderungen der peptidomimetischen Phosphonsäurediester **18**, **19** und **20** im Vergleich zu **14d**

### 1.4.3 ANSATZ IM SINNE EINES PRODRUG-KONZEPTES

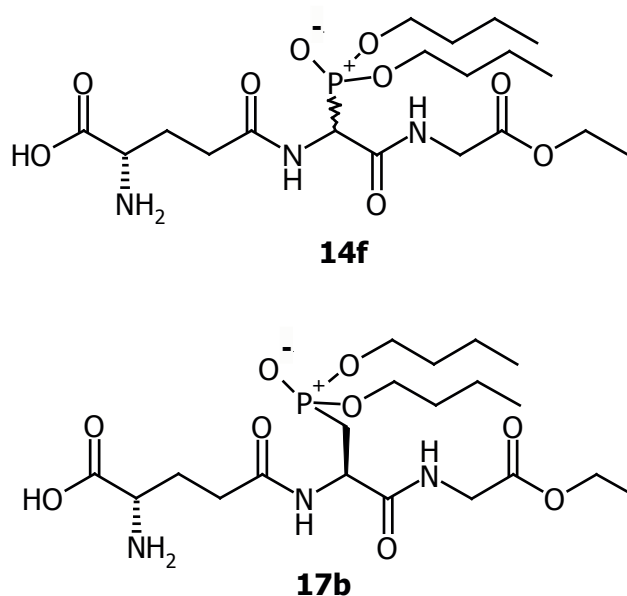
Für die Entwicklung von Arzneistoffen ist nicht nur die Wirkung einer Verbindung entscheidend, sondern auch dessen Bioverfügbarkeit. So sollte ein Wirkstoff sehr früh unter Gesichtspunkten der guten Resorption betrachtet werden. Ein allgemeines Maß hierfür ist das Wechselspiel zwischen Lipophilie und Hydrophilie eines Wirkstoffes. Ein zu lipohiler Wirkstoff ist aufgrund seiner schlechten Löslichkeit nur bedingt als Arzneistoff einsetzbar. Andererseits ist ein zu hydrophiler Wirkstoff nur begrenzt membrangängig und kann so schlecht resorbiert werden.

Die ausgeprägte Hydrophilie der hier vorgestellten Phosphono-Analoga macht daher die Entwicklung eines Prodrugs nötig, in dem die Anzahl an Wasserstoffbrücken-Donoren reduziert ist, und das am Wirkort in das aktive Prinzipin metabolisiert werden kann.



Hier kommen aus synthetischer Sicht vor allem die Glycyl-Ester der Verbindungen **14d** und **17a** in Betracht. Von Verbindung **14d** wurde bereits ein Glycyl-Methylester (**14e**) hergestellt, der zwar schwächer wirksam ist als die freie Säure **14d**, aber aus dem nach Aufnahme in die Zelle durch Esterasen die wirksamere Form freigesetzt wird<sup>[50]</sup>. Jedoch ist die Hydrolyse von Methylestern mit einer Freisetzung von toxischem Methanol verbunden, so dass der Einsatz von Ethylestern bevorzugt werden sollte, zumal ihre Lipophilie gegenüber den Methylestern leicht erhöht ist.

Daher sollten vom Phosphono-Analogen **14d** und vom seitenkettenverlängerten Phosphonsäurediester **17a** die entsprechenden Glycyl-Ethylester **14f** und **17b** im Sinne eines Pro-Drugs hergestellt werden.

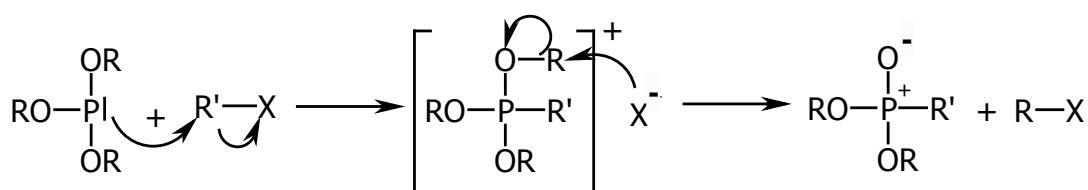


**Abb. 11:** Glycyl-Ethylester **14f** und **17b** im Sinne eines Pro-Drugs

## 2 SYNTHESEN

### 2.1 EINLEITUNG

Die Darstellung von peptidischen und peptidomimetischen Phosphono-Analoga des Glutathions erfordert unterschiedliche synthetische Methoden. Gemeinsames Element ist bei allen Verbindungen die Michaelis-Arbuzov<sup>1)</sup>-Reaktion<sup>[54]</sup>, bei der durch die Umsetzung von Phosphorigsäureestern mit Alkylhalogeniden Phosphonsäureester hergestellt werden (Schema 1).



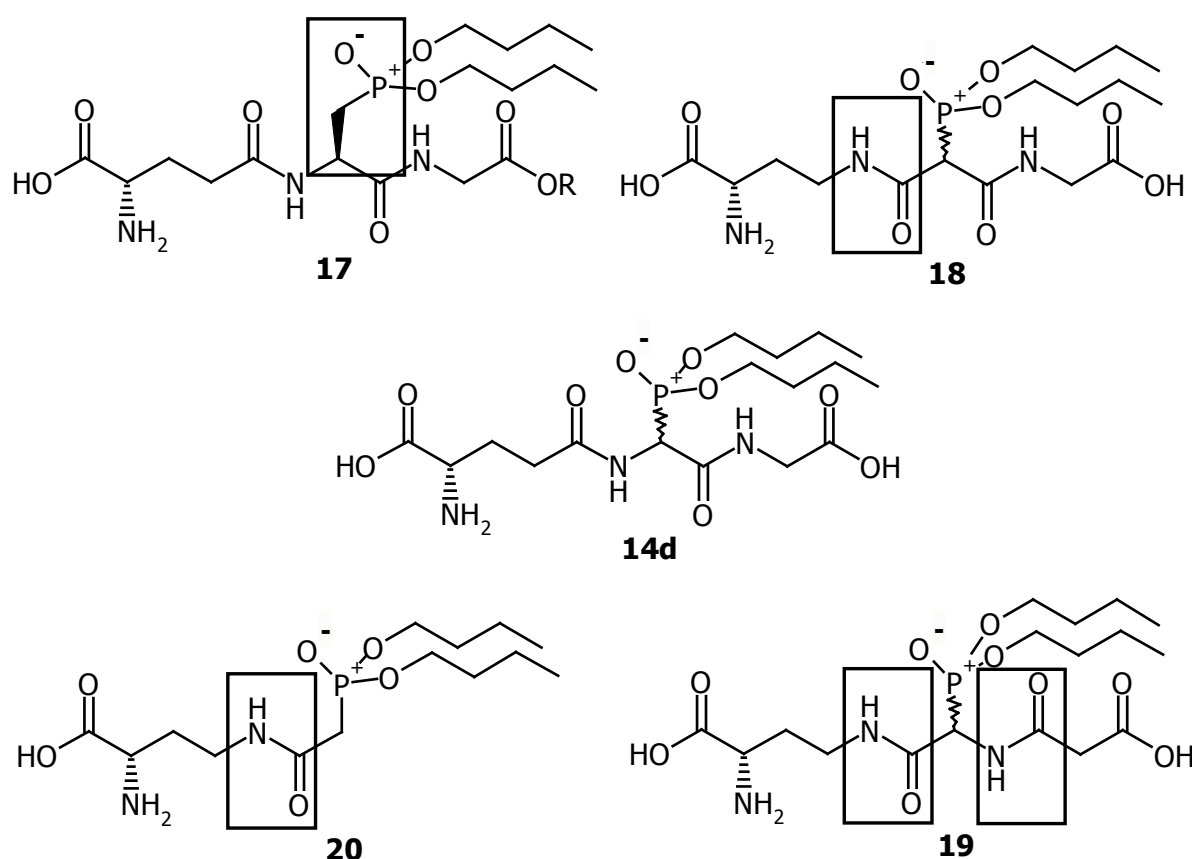
**Schema 1**

Beim Aufbau der rein peptidischen Verbindungen wurde die klassische Peptidsynthese in Lösung genutzt, die sowohl die Aktivierung von Carboxyl-Funktionen, als auch die Einführung und selektive Abspaltung von Schutzgruppen beinhaltet. Bei den peptidomimetischen Verbindungen war es erforderlich, unterschiedliche Synthesestrategien anzuwenden. Hier standen neben der Amidbildung und der Schutzgruppentechnik vor allem Acylierungs-Reaktionen im Vordergrund.

Im Zuge dieser Arbeit wurden vier neue potentielle Inhibitoren der GST entwickelt, die alle eine Phosphonsäurediester-Funktion besitzen; ein neues peptidisches Phosphono-Analoga des Glutathions (**17**) sowie drei peptidomimetische Phosphono-Analoga (**18**, **19** und **20**). Die drei letztgenannten Substanzen besitzen alle eine Di-*n*-butoxyphosphinyl-Funktion anstatt der CH<sub>2</sub>-SH-Gruppe des Glutathions und einen modifizierten Backbone-Bereich. In Verbindung **18** ist die Glutamyl-Cystein-Peptidbindung bezogen auf das Glutathion invertiert worden (im Folgenden als retro-

<sup>1)</sup> Der Name Arbuzov wird in der Literatur uneinheitlich als Arbusow, Arbuzow oder Arbusov angegeben und zitiert.

inverser Phosphonsäurediester bezeichnet), wohingegen im Peptidomimetikum **19** beide Amidbindungen umgekehrt wurden (als doppelt retro-inverser Phosphonsäurediester bezeichnet). Bei **20** ist ebenso wie in Verbindung **18** die ursprüngliche Glutamyl-Cystein-Peptidbindung invertiert, jedoch fehlt hier die Cystein-Glycin-Bindung des GSH (Bezeichnung: retro-inverses Phosphonsäurediesterfragment). Schema 2 zeigt die Strukturformeln der neuen Substanzen sowie der Leitstruktur **14d**, von der sich die neuen Phosfono-Analoga ableiten.



Schema 2

## 2.2 SEITENKETTENVERLÄNGERTER PHOSPHONSÄUREDIESTER

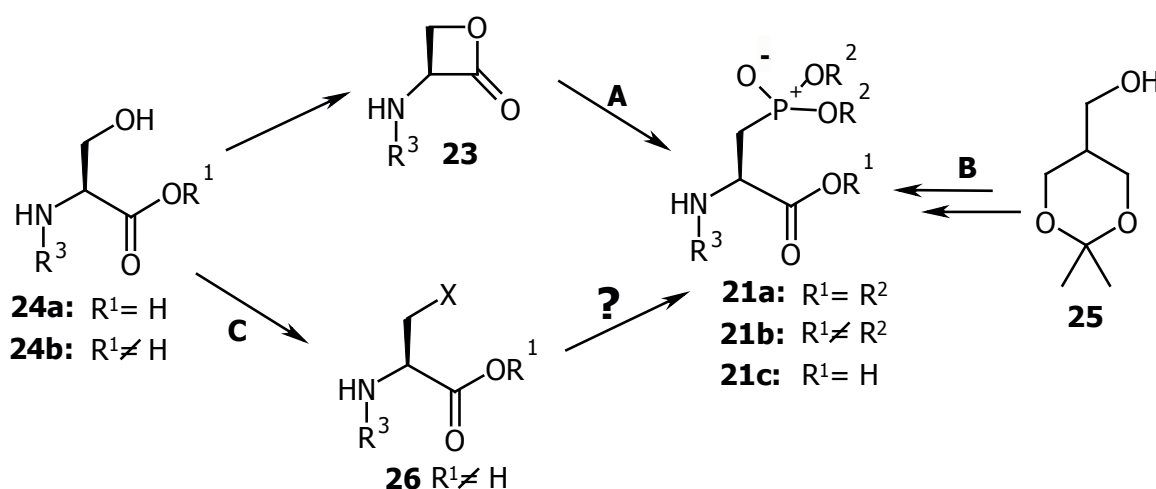
Das zentrale Strukturelement des seitenkettenverlängerten Phosphonsäurediesters **17** stellt ein Serin-Derivat dar. Für die Darstellung von **17** sind zwei Syntheseansätze denkbar:

Zum einen die Umsetzung von Serin in einer Michaelis-Arbuzov-Reaktion zu einem Phosfono-analogen Derivat (**21**), aus dem dann das gewünschte Tripeptid

aufgebaut wird. Zum anderen die vorangestellte Synthese des Tripeptids H-L-Glu(-L-Ser-Gly-OH)-OH (**22**), das anschließend zum Phosphonsäureester umgesetzt wird.

Die in der Literatur beschriebenen Synthesen von Phosphono-analogen Serin-Derivaten gehen zumeist von *N*-terminal geschützten (3*S*)-3-Amino-2-oxetanonen<sup>[55,56]</sup> (**23**) aus (Schema 3, A), die aus *N*-terminal geschütztem Serin (**24a**) hergestellt wurden<sup>[57,58,59]</sup>. Ein wesentlicher Nachteil dieser Darstellung ist, dass synthesebedingt nur homogene Ester zugänglich sind, in denen sowohl die Phosphonsäure-, als auch die Carboxyl-Gruppe den gleichen Substituenten tragen (**21a**). Bei der Reaktion würden Aminosäure-*n*-butylester entstehen, die aufgrund der Hydrolysestabilität für die anschließende Peptidsynthese ungeeignet wären.

Einen anderen Ansatz verfolgten Yokomatsu *et al.*<sup>[60]</sup>, die ausgehend von 5-Hydroxymethyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxan (**25**) *N*-terminal geschützte (2*S*)-2-Amino-3-(dialkoxyphosphinyl)propionsäure (**21c**) (Schema 3, B) herstellten. Allerdings lag die Gesamtausbeute dieser sechstufigen Synthese insgesamt bei nur 27%.



**Schema 3**

Sowohl die Herstellung von 2-Amino-3-halogenpropionsäure-Derivaten (**26**)<sup>[61,62,63]</sup> ausgehend von Verbindungen des Typs **24b** (Schema 3, C), als auch der Austausch eines Halogens gegen die Dialkoxyphosphinyl-Gruppe für 3-Halogen-carbonsäuren<sup>[64,65]</sup> wurde bereits in der Literatur beschrieben. Daher sollte erst ein Halogen-Serin-Derivat (**26**) und dann in einer anschließenden Michaelis-Arbuzov-Reaktion das

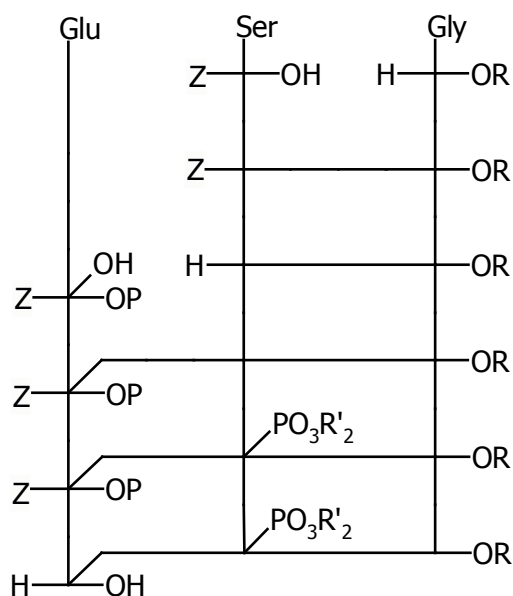
Phosphono-Analogen hergestellt werden.

Diese Synthesefolge nutzten auch Schmidt *et al.*<sup>[66]</sup>, bei der Darstellung von 2-Benzyloxycarbonylamino-2-(diethylphosphinyl)essigsäureethylester ausgehend von 2-Benzyloxycarbonylamino-2-methoxyessigsäureethylester.

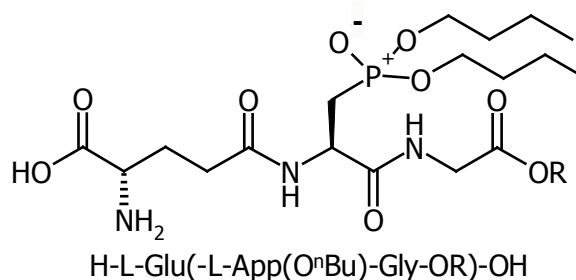
Der Vorteil des Syntheseweges über das Halogen-Derivat **26** liegt darin, dass auch gemischte Ester (**21b**) dargestellt werden können, bei denen die Phosphonsäure- und Carbonsäure-Funktion unterschiedliche Substituenten tragen. Zusätzlich sollte diese Reaktion auch auf andere Serin-Derivate, wie z.B. das Tripeptid H-L-Glu(-L-Ser-Gly)-OH (**22**), übertragbar sein.

Beim Aufbau des Tripeptids **22** gibt es zwei mögliche Strategien. Einerseits kann erst ein Dipeptid aus den entsprechend geschützten Bausteinen L-Serin und Glycin gebildet werden, das dann mit L-Glutaminsäure zum Zielpeptid verknüpft wird. Andererseits wäre auch die Synthese des L-Glu(-L-Ser) Dipeptids denkbar, das dann mit Glycin das gewünschte Tripeptid **22** bildet.

In der Literatur sind jedoch nur wenige L-Glu(-L-Ser)-Derivate<sup>[67]</sup> bekannt, während es für Derivate des Dipeptides L-Ser-Gly zahlreiche Beispiele gibt. Daher sollte erst das Tripeptid L-Glu(-L-Ser-Gly) über das Dipeptid L-Ser-Gly aufgebaut und anschließend in einer Michaelis-Arbuzov-Reaktion der Phosphor eingeführt werden. Dieser Syntheseweg ist in Schema 4 dargestellt.



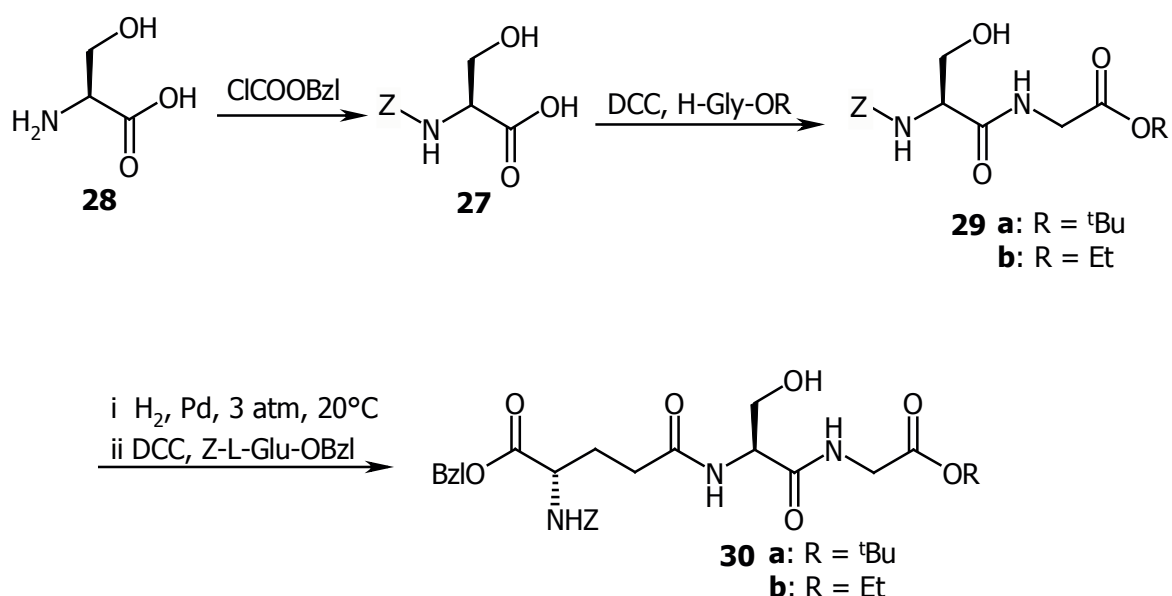
**Schema 4**



**17a:** R= H  
**b:** R= Et

## 2.2.1 GESCHÜTZTE $\gamma$ -L-GLUTAMYL-L-SERYLGLYCINESTER

Den ersten Syntheseschritt zur Darstellung des Tripeptids stellte die Synthese von *N*-terminal geschütztem L-Serin (**27**) dar. Die Reaktion von L-Serin (**28**) mit Chlorameisensäurebenzylester verläuft in ausgezeichneten Ausbeuten von über 80% und wurde daher dem käuflichem Erwerb des Z-L-Serins vorgezogen. Die Carboxylfunktion des am Stickstoff geschützten L-Serins wurde dann durch *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) aktiviert und mit Glycin-Ester kondensiert (Schema 5). Dabei wurde zur Vermeidung der Racematbildung 1-Hydroxybenzotriazol zugegeben.



### Schema 5

Die Ausbeute des Dipeptids Z-L-Ser-Gly-OR (**29**) hing stark von der Art des eingesetzten Glycinesters ab. Während der Ethylester **29b** in schlechten Ausbeuten lediglich als zähes Öl isoliert werden konnte, kristallisierte der *tert*-Butylester **29a** leicht aus. Dieser Unterschied zwischen den Estern zeigte sich auch in den weiteren Synthesen, bei denen der Umgang mit den *tert*-Butylestern stets erleichtert war.

Von den Dipeptiden **29a** und **29b** wurde die Z-Schutzgruppe hydrogenolytisch entfernt (Schema 5 i) und das Produkt ohne Aufreinigung sofort mit dem entsprechend geschützten  $\gamma$ -L-Glutaminsäure-Derivat mit Hilfe von DCC zum Tripeptid Z-L-Glu(L-Ser-Gly-OR)OBzl (**30a,b**) umgesetzt (Schema 5 ii). Auch hier

wurde 1-Hydroxybenzotriazol zur Unterdrückung der Racematbildung eingesetzt.

Die Reaktion der Hydroxy-Funktion des Serins mit einer Carbonsäure-Funktion konnte nicht beobachtet werden. Dies lässt sich durch die stärkere Basizität der freien Amino-Gruppen der eingesetzten Aminosäuren erklären. Daher wurde auf den Schutz der Hydroxy-Funktion verzichtet.

## 2.2.2 MICHAELIS-ARBUZOV-REAKTION VON SERIN-DERIVATEN

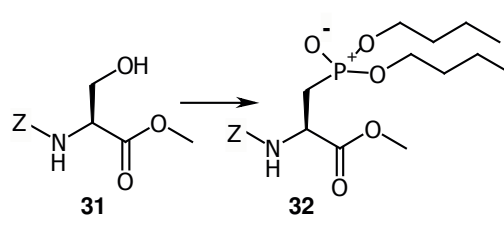
Die Umsetzung des Tripeptids **30b** unter den von Schmidt *et al.*<sup>[66]</sup> übertragenen Reaktionsbedingungen lieferte überraschenderweise sehr schlechte Ausbeuten von 6% für die Darstellung von **17b**. Die Optimierung der Synthese sollte an dem leicht zugänglichen *N*-Benzyloxycarbonylserinmethylester (**31**) durchgeführt werden, um das Tripeptid nicht zu verbrauchen.

Zum Austausch einer Hydroxy- gegen eine Halogen-Gruppe im Serin wurden verschiedene Methoden untersucht: Zuerst wurde **31** nach Schmidt *et al.*<sup>[66]</sup> in einer Eintopfreaktion in Toluol bei 70°C erst mit Phosphortrichlorid und anschließend mit Tri-*n*-butylphosphit zur Reaktion gebracht (Abb. 12, Methode A). Die Ausbeute erwies sich allerdings als sehr niedrig, wenn auch etwas höher als bei der Reaktion mit dem Tripeptid. Die entstandenen Nebenprodukte waren zu uneinheitlich, und wurden daher nicht näher charakterisiert.

Ein Wechsel zum Phosphorpentachlorid erforderte ein anderes Lösungsmittel (Abb. 12, Methode B). Die Ausbeute konnte zwar nur minimal gesteigert werden, aber im Gegensatz zu Methode A gelang die Isolierung von halogeniertem Serin-Derivat. Ein Nachteil der Reaktion stellt der Wechsel des Lösungsmittels dar, da das Chloroform auch mit dem Phosphit reagieren kann.

Eine weitere Änderung des Halogenierungsreagenzes (Abb. 12, Methode C) bewirkte eine weitere leichte Steigerung der Ausbeute. Es lag nun die Vermutung nahe, dass nicht die Einführung des Chlors, sondern die eigentliche Michaelis-Arbuzov-Reaktion erschwert sein könnte. Als zusätzlicher Nachteil der Methode C erwies sich die Verwendung verschiedener Reaktanden, die vor der eigentlichen Umsetzung mit Tri-*n*-butylphosphit abgetrennt werden mussten.

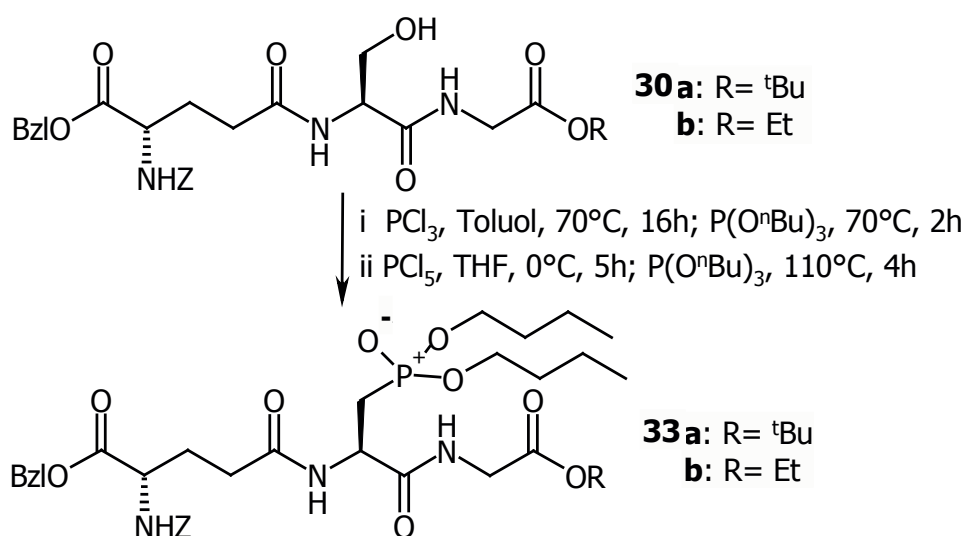
Zur weiteren Optimierung wurde Chloroform als Lösungsmittel gegen ein Gemisch aus Toluol und Tetrahydrofuran (THF) getauscht und die Reaktion des Tri-*n*-butylphosphits unter verschärften Reaktionsbedingungen durchgeführt. Durch die Verlängerung der Reaktionszeit konnte die Ausbeute deutlich erhöht werden (Abb. 12, Methode D). Zudem konnte die Synthese als Eintopfreaktion durchgeführt und daher auf die Aufreinigung der Zwischenverbindungen verzichtet werden.



Methode	Beschreibung	Ausbeute
<b>A</b>	PCl <sub>3</sub> in Toluol, 70°C, 16h; P(O <sup>n</sup> Bu) <sub>3</sub> in Toluol, 70 °C, 2h	19%
<b>B</b>	PCl <sub>5</sub> in CHCl <sub>3</sub> , 0°C, 4h; P(O <sup>n</sup> Bu) <sub>3</sub> in Toluol, 70°C, 2h	26%
<b>C</b>	CDI, Allylbromid in CH <sub>3</sub> CN; P(O <sup>n</sup> Bu) <sub>3</sub> in Toluol, 70°C, 2h	34%
<b>D</b>	PCl <sub>5</sub> in THF, 0°C, 4h; P(O <sup>n</sup> Bu) <sub>3</sub> in Toluol/THF, 110°C, 4h	67%

**Abb. 12:** Methoden zur Einführung einer Dialkoxyphosphinyl-Gruppe in **31**

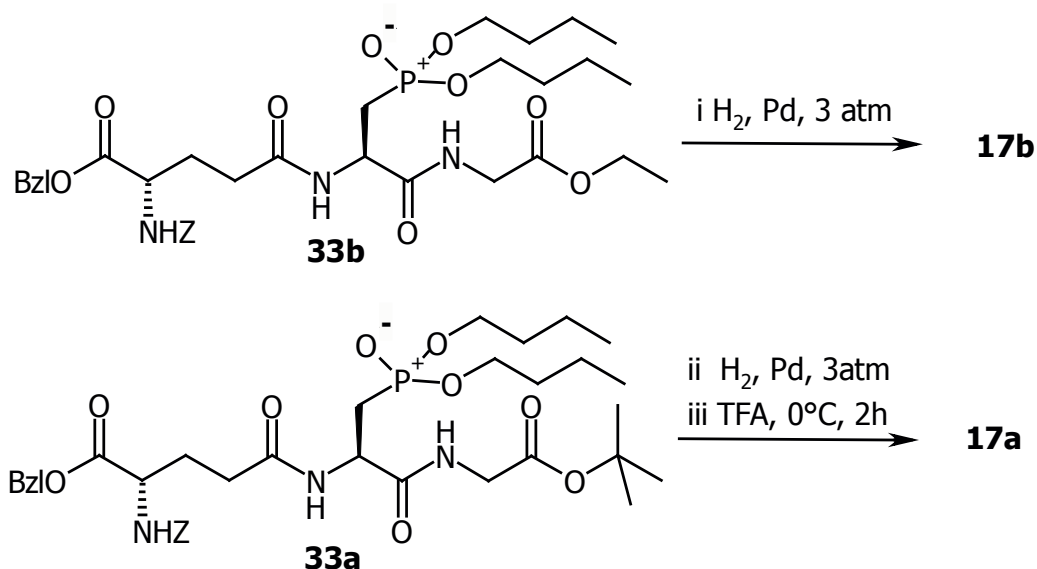
Die Tripeptide **30a** und **30b** wurden in einer Michaelis-Arbuzov-Reaktion zu Phosphono-Analoga des Glutathions (**33a**, **33b**) umgesetzt. **30b** wurde dabei, wie bereits beschrieben, nach der Methode von Schmidt *et al.*<sup>[66]</sup> umgesetzt (Schema 6 i) und lieferte sehr niedrige Ausbeuten. Die Synthese des *tert.*-Butylesters **33a** wurde unter den optimierten Bedingungen durchgeführt (Schema 6 ii).



**Schema 6**



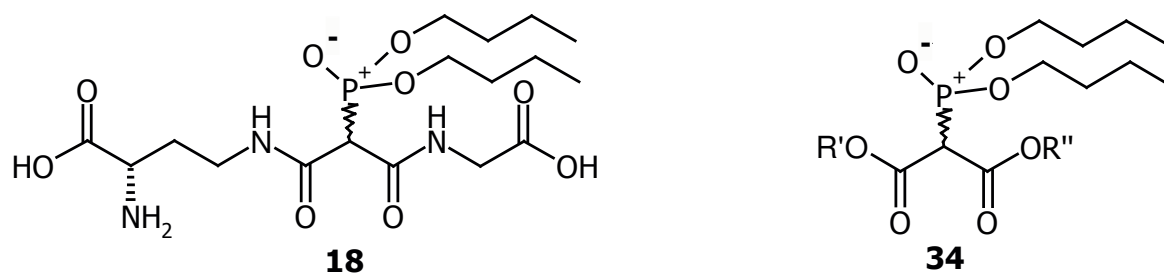
Abschließend wurde das Tripeptid **33b** ohne Aufreinigung mit Wasserstoff hydriert (Schema 7 i). Man erhielt H-L-Glu(-L-App(O<sup>n</sup>Bu)-Gly-OEt)-OH (**17b**), das nachfolgend für die Testung eingesetzt wurde. **33a** wurde ebenfalls ohne Aufreinigung erst hydriert (Schema 7 ii) und sofort mit Trifluoressigsäure (TFA) zum freien Tripeptid H-L-Glu(-L-App(O<sup>n</sup>Bu)-Gly-OH)-OH (**17a**) umgesetzt (Schema 7 iii).



Schema 7

### 2.3 RETRO-INVERSER PHOSPHONSÄUREDIESTER

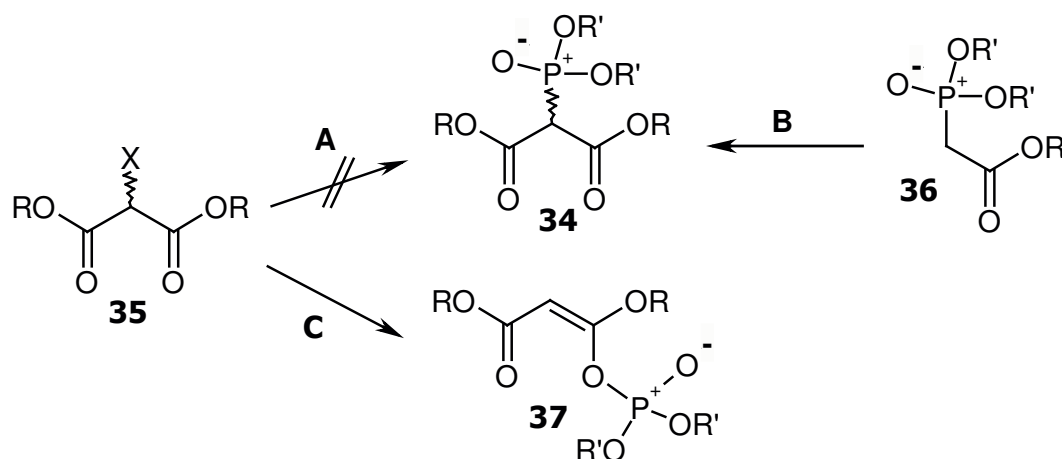
Zur Darstellung eines retro-inversen Phosphonsäurediesters (**18**) musste als zentrales Strukturelement ein unsymmetrischer 2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)-malonsäurediester (**34**) eingesetzt werden, der selektiv verseift werden kann. Aus diesem orthogonalen Diester sollte anschließend durch sukzessive Amidbildung mit in  $\alpha$ -Position geschützter L-2,4-Diaminobuttersäure und Glycinester das Peptidomimetikum **18** aufgebaut werden.



Schema 8

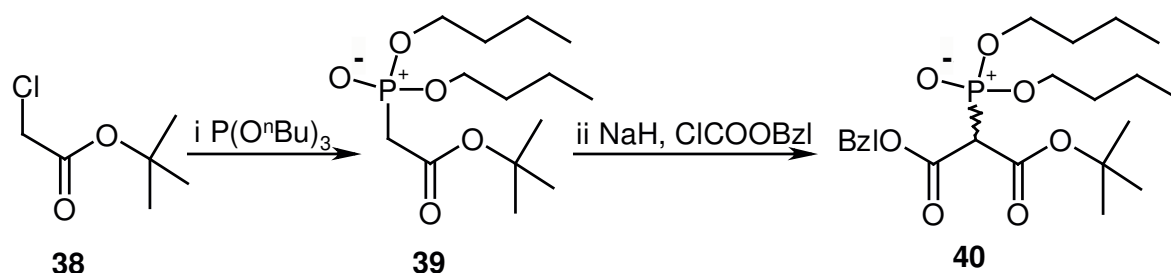
### 2.3.1 2-(DI-*n*-BUTOXYPHOSPHINYL)MALONSÄUREDIESTER

Die direkte Darstellung von 2-(Dialkoxyphosphinyl)malonsäurediestern (**34**) durch Michaelis-Arbuzov-Reaktion von 2-Halogenmalonsäurediestern (**35**) mit Trialkylphosphiten beschrieb Kosolapoff<sup>[68]</sup> erstmals 1946 (Schema 9, A). Kreuzkamp<sup>[69]</sup> wählte 1955 eine andere Methode um 2-(Dialkoxyphosphinyl)malonsäurediester herzustellen. Er ging von den CH-aziden 2-(Dialkoxyphosphinyl)essigsäure-Derivaten (**36**) aus, die nach Deprotonierung mittels Natriumamid oder Alkoholat acyliert wurden (Schema 9, B). Genauere Untersuchungen von Thompson<sup>[70]</sup> führten 1965 zu dem Ergebnis, dass die Reaktionsbedingungen von Kosolapoff nicht zu den gewünschten 2-(Dialkoxyphosphinyl)malonsäurediestern, sondern in einer Perkow-Reaktion<sup>[54]</sup> zu 3-(Dialkoxyphosphoryloxy)-3-alkoxyacrylsäureestern (**37**) führte (Schema 9, C).



**Schema 9**

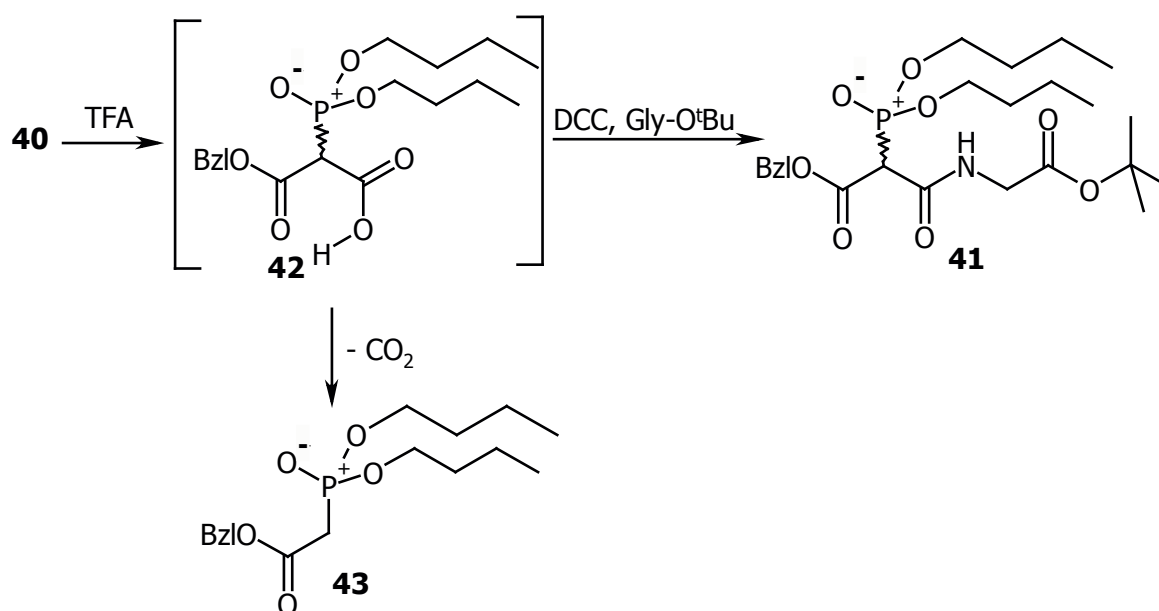
Zur Darstellung eines orthogonalen 2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)malonsäurediesters wurde daher erst Halogenessigsäure-*tert*-butylester (**38**) mit Tri-*n*-butylphosphit zu 2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)essigsäure-*tert*-butylester (**39**) umgesetzt (Schema 10 i). Die weitere Reaktion mit Natriumhydrid und Chlorameisensäurebenzylester (Schema 10 ii) führte dann in guten Ausbeuten von 70% zur Darstellung des gewünschten (2*RS*)-2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)malonsäurebenzyl-*tert*-butylesters (**40**). Aus dieser Verbindung sollte anschließend der entsprechende Monoester selektiv durch Hydrierung oder Versetzen mit TFA hergestellt werden.



Schema 10

### 2.3.2 *N*-[(2*RS*)-*O*-Benzyl-2-(di-*n*-butoxyphosphinyl)malonyl]-glycinester

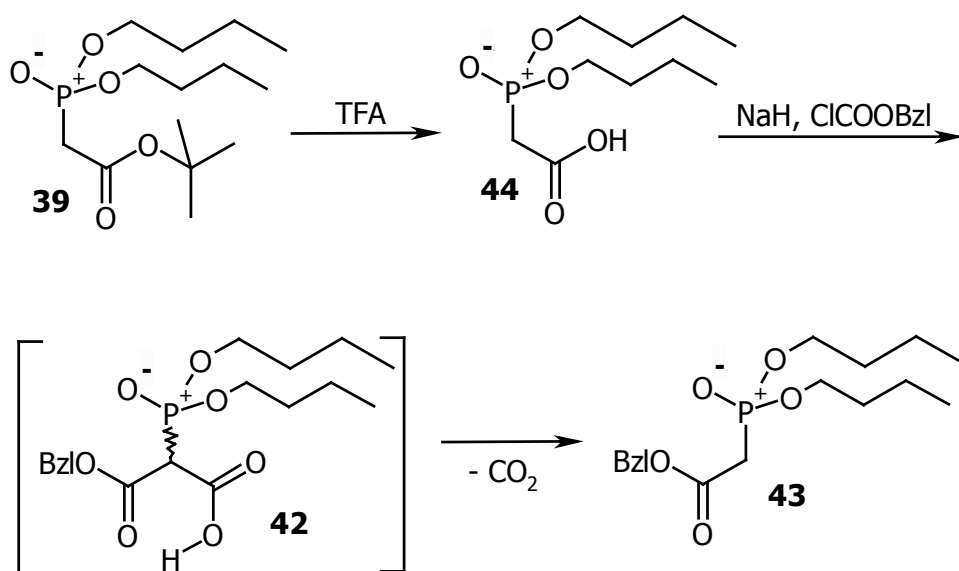
Die weitere Umsetzung von **40** mit TFA und anschließende Reaktion mit DCC und Glycin-*tert*-butylester zu *N*-[(2*RS*)-*O*-Benzyl-2-(di-*n*-butoxyphosphinyl)malonyl]-glycin-*tert*-butylester (**41**) erfolgte in niedriger Ausbeute (12%). Der Grund hierfür liegt in der leichten Decarboxylierung des intermediär freigesetzten (2*RS*)-2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)malonsäuremonobenzylesters (**42**) zu 2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)-essigsäurebenzylester (**43**) (Schema 11). Der Essigester **43** konnte in guter Ausbeute (77%) als Hauptprodukt dieser Reaktion isoliert werden.



Schema 11

Die unbefriedigende Ausbeute sowie die Tatsache, dass bei der anschließenden Umsetzung von **41** ebenfalls mit einer Decarboxylierung zu rechnen war, erforderte eine andere Synthesestrategie.

Um zu klären, ob die saure Verseifung von **40** die Decarboxylierung erleichtert, und in einem neutralen Medium der Monoester **42** stabil ist, wurde **39** mit TFA zu 2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)essigsäure (**44**) verseift und die freie Säure dann mit Natriumhydrid und Chlorameisensäurebenzylester zum Monoester **42** umgesetzt. Jedoch konnte lediglich 2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)essigsäurebenzylester (**43**) isoliert werden (Schema 12).

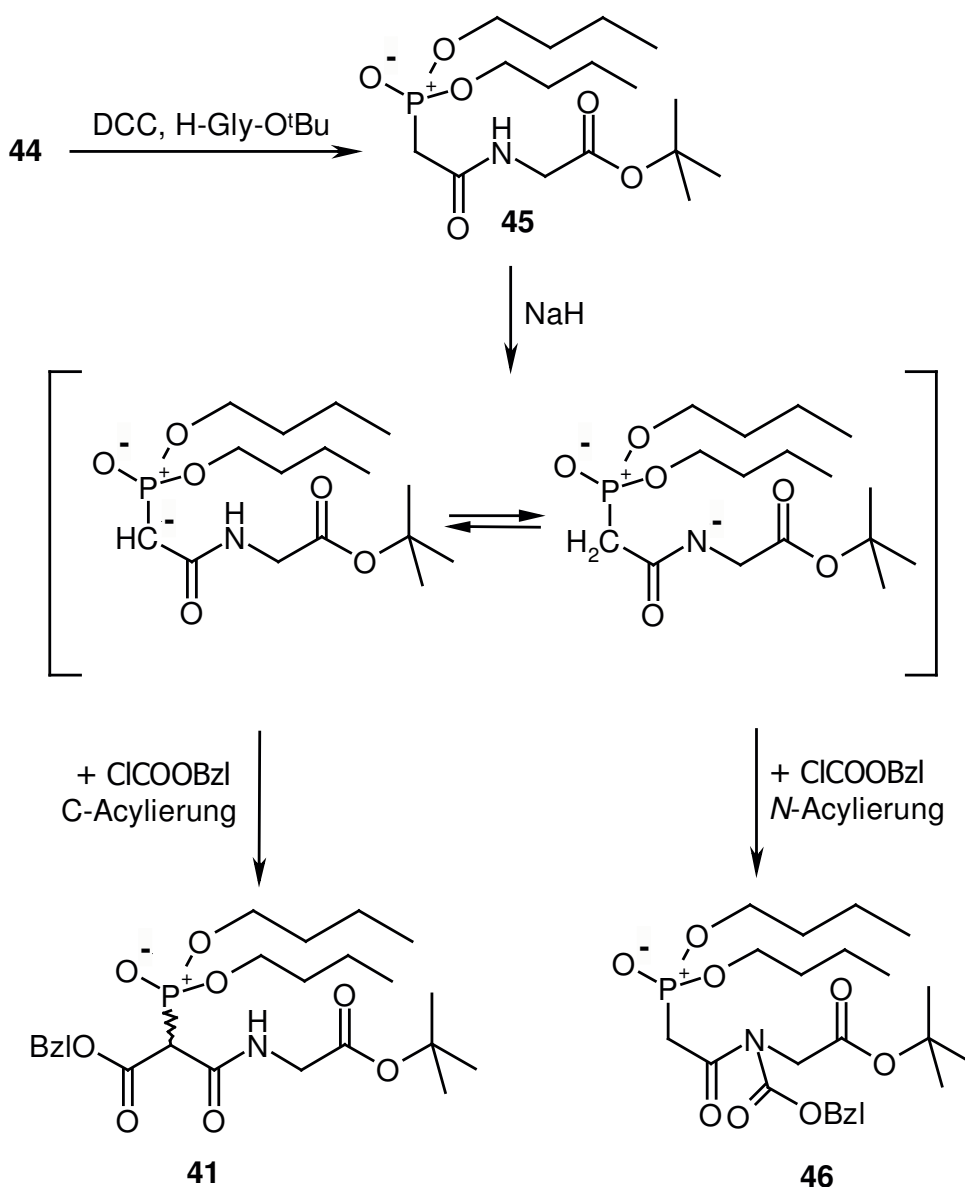


**Schema 12**

Da der Monoester **42** zu instabil zu sein scheint, sollte die Benzyloxycarbonyl-Gruppe erst nach der Amidbildung eingeführt werden, um die Decarboxylierung zu umgehen. Dazu wurde 2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)essigsäure **44** mit DCC und Glycin-*tert.*-butylester zu *N*-[2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)acetyl]glycin-*tert.*-butylester (**45**) verknüpft. Diese Verbindung wurde dann mit Natriumhydrid deprotoniert und mit Chlorameisensäurebenzylester acyliert (Schema 13). Die Ausbeute der Synthese des Amids **41** ausgehend von **39** konnte durch die veränderte Syntheseführung von 7% auf 39% gesteigert werden, obwohl die Darstellung über die Acylierung des Amids einen zusätzlichen Syntheseschritt erfordert.

Als Nebenprodukt bei der Darstellung von **41** konnte *N*-[2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)acetyl]-*N*-(Benzyloxycarbonyl)-glycin-*tert.*-butylester (**46**) isoliert werden, der durch die konkurrierende *N*-Acylierung entstand.

Eine vergleichbare elektrophile Substitution am Amidstickstoff ist bei Verbindungsklassen der Dialkylphosphinylessigsäureamide bisher nicht beschrieben, wohingegen die C-Alkylierung an der Methylen-Position von Motoyoshiwa *et al.*<sup>[71]</sup> 1980 durchgeführt wurde. Die vergleichbar hohe Ausbeute von 68% lässt allerdings die Vermutung zu, dass auch bei Motoyoshiwa *et al.* *N*-Alkyl-Produkt entstand, dass jedoch nicht isoliert wurde.



Schema 13

Die Strukturaufklärung der Verbindungen **41** und **46** lässt sich nur anhand von NMR-spektroskopischen Untersuchungen treffen. Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum fehlt bei **46** das Amid-Signal. Das Dublett der Wasserstoffatome am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom des Phosphonsäureesters **46** ist im Vergleich zur Ausgangsverbindung **45** nur um  $\Delta\delta = 0.95$  ppm diamagnetisch verschoben, während das entsprechende Signal des Phosphonsäureesters **41** um  $\Delta\delta = 1.77$  ppm zu tiefem Feld verschoben ist. Die Verschiebung des Signals beruht vermutlich auf der Auswirkung des Anisotropieeffektes der Carbonylfunktion der Z-Gruppe. Die H-P-Kopplungskonstante bleibt allerdings von der Entschirmung des Sauerstoffes unberührt. Die Differenz der Kopplungskonstanten  $\Delta J$  beträgt lediglich 1.0 Hz. Im Gegensatz dazu führt der Carbonyl-Substituent am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom der Essigsäure in **41** zu einer sehr starken Verschiebung des Signales zu tiefem Feld; auch die H-P-Kopplungskonstante ändert sich deutlich ( $\Delta J = 11.8$  Hz).

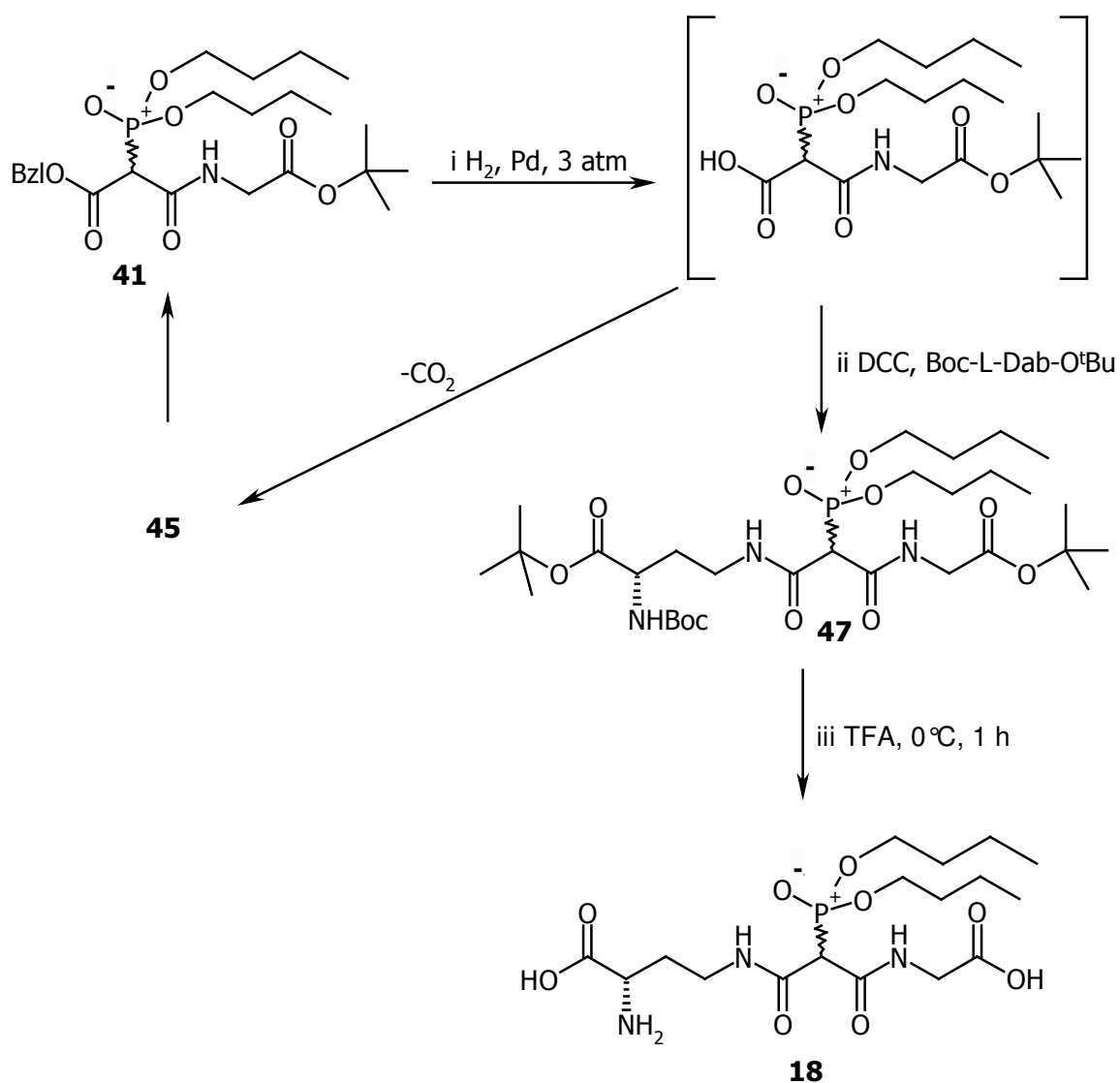
Im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum ist das Signal des  $\alpha$ -Kohlenstoffatoms der Essigsäure in **46** kaum verschoben ( $\Delta\delta = 1.8$  ppm), während der Carbonyl-Substituent eine sehr viel stärkere Verschiebung bewirkt ( $\Delta\delta = 18.8$  ppm). Für die C-P-Kopplungskonstanten zeigt sich ein komplett anderes Bild als bei den H-P-Kopplungskonstanten. Die C-P-Kopplungskonstante verändert sich bei Einführung einer Carbonylfunktion am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom nicht ( $\Delta J = 0.2$  Hz), wohl aber bei der Acylierung des Amidstickstoffes ( $\Delta J = 3.5$  Hz).

Verbindung	$^1\text{H}$ -Signal [ppm]	$^2J_{\text{H,P}}$ [Hz]	$^{13}\text{C}$ -Signal [ppm]	$^1J_{\text{C,P}}$ [Hz]
<b>45</b>	2.88	20.5	35.5	131.4
<b>41</b>	4.65	32.3	54.3	131.6
<b>46</b>	3.83	21.5	37.3	134.9

**Tab. 3:** NMR-Daten des  $\alpha$ -Kohlenstoffatoms in den Verbindungen **41**, **45** und **46**

### 2.3.3 (2*RS*)-*N*-[(3*S*)-3-AMINO-3-CARBOXYPROPYL]-*N*'-(CARBOXY-METHYL)-2-(DI-*n*-BUTOXYPHOSPHINYL)MALONSÄUREDIAMID

Die bereits für **40** beschriebene niedrige Ausbeute durch die Decarboxylierung konnte auch bei der Verseifung von **41** mit TFA (Schema 14 i) und anschließender Kupplung mit Boc-L-Dab-O<sup>t</sup>Bu (Schema 14 ii) zum Malonsäurediamid **47** beobachtet werden. Allerdings konnte der dabei entstehende *N*-[2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)-acetyl]glycin-*tert*-butylester (**45**) isoliert und wieder zur Darstellung von **41** eingesetzt werden, so dass der Verlust verringert werden konnte.



Schema 14

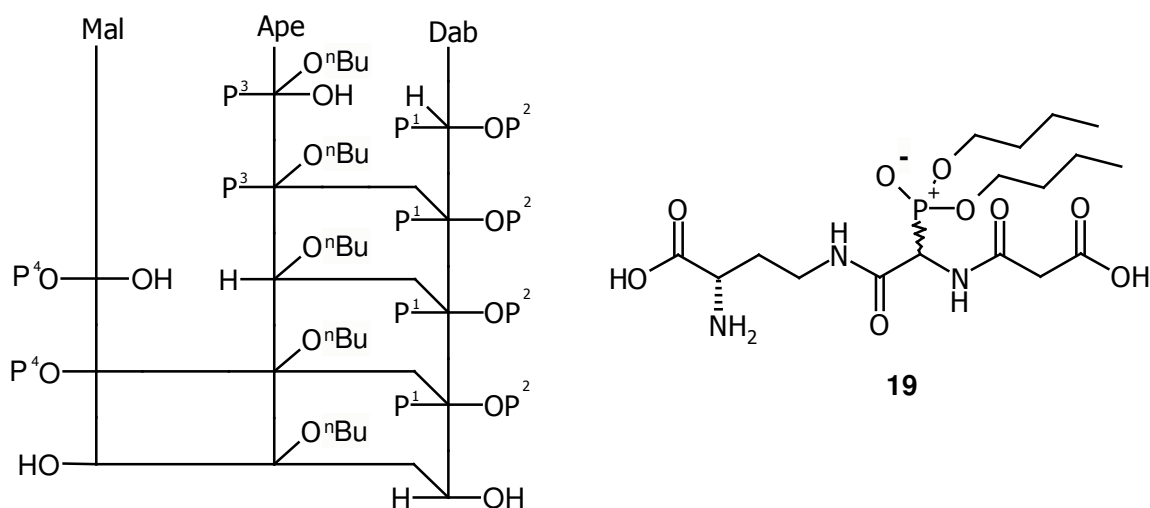
Aufgrund der schlechten Ausbeute wurde auf eine Isolierung von **47** verzichtet.

Die Freisetzung des ungeschützten retro-inversen Phosphonsäurediesters (**18**) gelang letztendlich durch Zugabe von TFA bei 0 °C (Schema 14 ii). So konnten in einer Reaktion alle Carboxy- und Amino-Schutzgruppen entfernt werden.

## 2.4 DOPPELT RETRO-INVERSER PHOSPHONSÄUREDIESTER

Bei einem doppelt retro-inversen Tripeptidomimetikum bleibt die zentrale Aminosäure erhalten, müsste aber am Stereozentrum invertiert werden, um die räumliche Anordnung von GSH zu imitieren. Da jedoch die zentrale Aminosäure der Leitstruktur **14d** nicht enantiomerenrein vorliegt, kann man in diesem Fall ebenfalls das Racemat der Aminosäure einsetzen. Diese wird dann mit geschützter 2,4-L-Diaminobuttersäure und Malonsäuremonoester zu einem Tripeptidomimetikum aufgebaut.

Da die Verseifung des Methylresters erst nach Zugabe von Natronlauge eintritt, die eine bestehende Peptidbindung spalten würde, wurde zuerst das Dipeptid mit der entsprechend geschützten L-2,4-Diaminobuttersäure hergestellt und dieses dann mit Malonsäureester umgesetzt. Nach Abspaltung der Schutzgruppen erhielt man **19**.



Schema 15<sup>2)</sup>

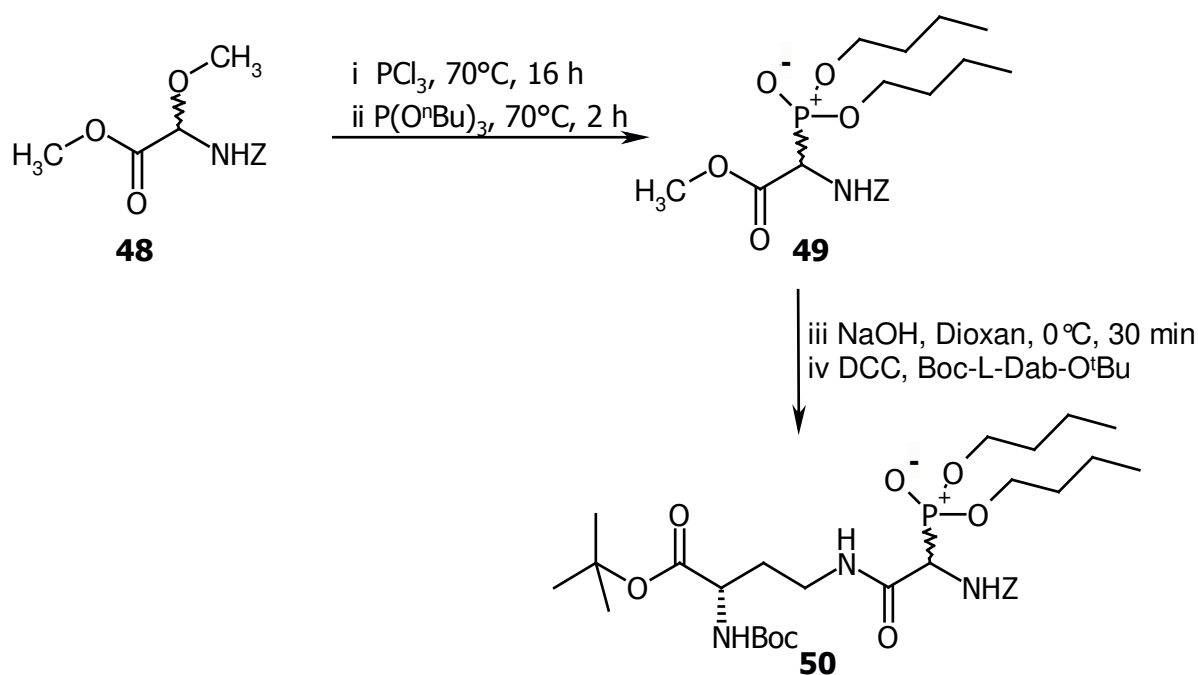
<sup>2)</sup> Das Syntheschema zeigt die Verbindung im Vergleich zur Formel spiegelverkehrt. Dies ist notwendig, um die Konventionen der Aminosäurendarstellung beizubehalten.



### 2.4.1 GESCHÜTZTE $N^{\gamma}$ -[(2*RS*)-2-AMINO-2-(DI-*n*-BUTOXY-PHOSPHINYL)ACETYL]-L-2,4-DIAMINOBTTERSÄURE

Die Reaktion des (2*RS*)-2-Benzoyloxycarbonylamino-2-methoxyessigsäuremethylesters (**48**) mit Phosphortrichlorid und Tri-*n*-butylphosphit wurde entsprechend Schmidt *et al.*<sup>[66]</sup> durchgeführt (Schema 16 i und ii) und lieferte den (2*RS*)-2-Benzoyloxycarbonylamino-2-(di-*n*-butoxyphosphinyl)essigsäuremethylester (Z-D,L-Ape(O<sup>n</sup>Bu)-OMe, **49**) in befriedigender Ausbeute.

Zum weiteren Aufbau wurde der Methylester **49** mit Natronlauge verseift und die freie Säure sofort mit DCC und L-2,4-Diaminobuttersäure zum Dipeptid Boc-L-Dab(Z-D,L-Ape(O<sup>n</sup>Bu)-)-O<sup>t</sup>Bu (**50**) umgesetzt (Schema 16 iii und iv). Auf einen Zusatz von Substanzen zur Verhinderung der Racematbildung konnte verzichtet werden, da die eingesetzten Aminosäuren racemisch vorlagen bzw. nicht am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom reagierten.



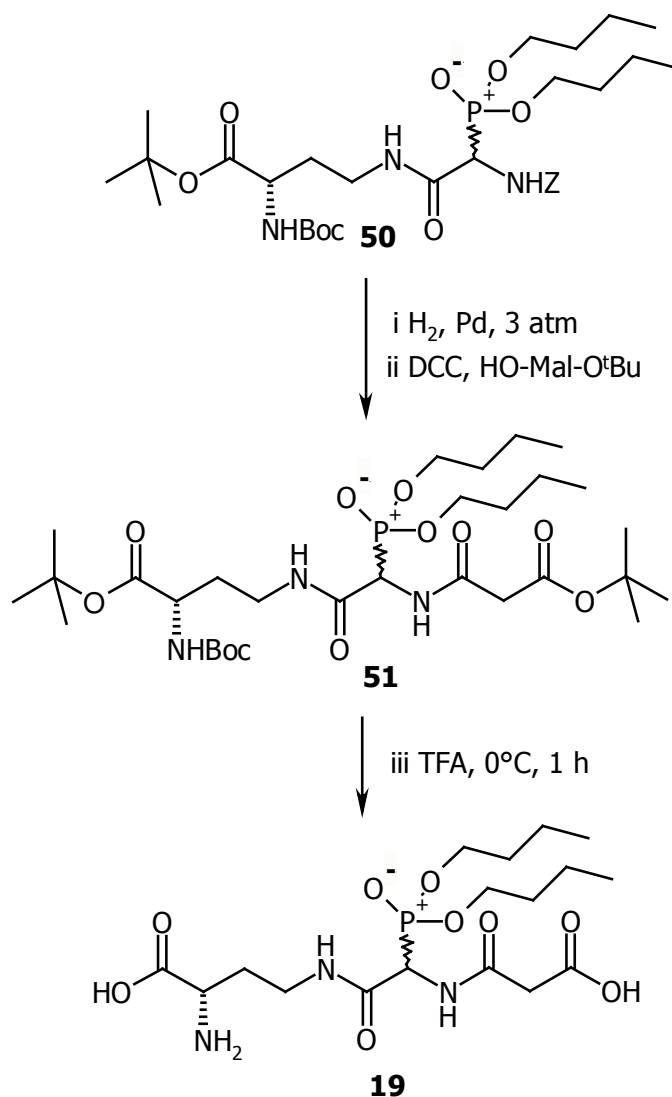
Schema 16

Die Darstellung von **48** erfolgte aus Glyoxylsäure und Benzylcarbammat und anschließender Methylierung nach Zoller und Ben-Ishai<sup>[72]</sup>.

## 2.4.2 *N*<sup>γ</sup>-[(2*RS*)-2-MALONYLAMINO-2-(DI-*n*-BUTOXYPHOSPHINYL)-ACETYL]-L-2,4-DIAMINOBUTTERSÄURE

Aus dem geschützten Dipeptid **50** wurde durch hydrolytische Spaltung das Amin freigesetzt (Schema 17 i) und dieses durch DCC mit Malonsäuremono-*tert*-butylester kondensiert (Schema 17 ii).

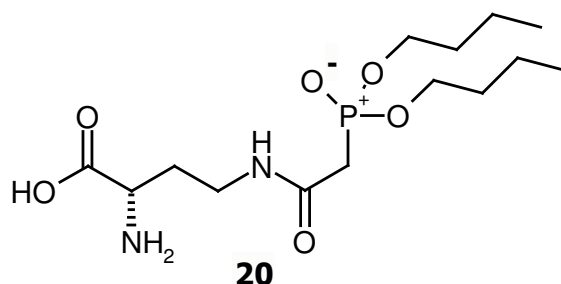
Aus dem so gewonnenen *N*<sup>α</sup>-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*<sup>γ</sup>-[(2*RS*)-2-(*O*-*tert*-Butylmalonylamino)-2-(di-*n*-butoxyphosphinyl)acetyl]-L-2,4-diaminobuttersäure-*tert*-butylester (**51**) wurde dann direkt mit TFA (Schema 17 iii) das komplett entschützte Peptidomimetikum **19** gewonnen.



Schema 17

## 2.5 RETRO-INVERSES PHOSPHONSÄUREDIESTERFRAGMENT

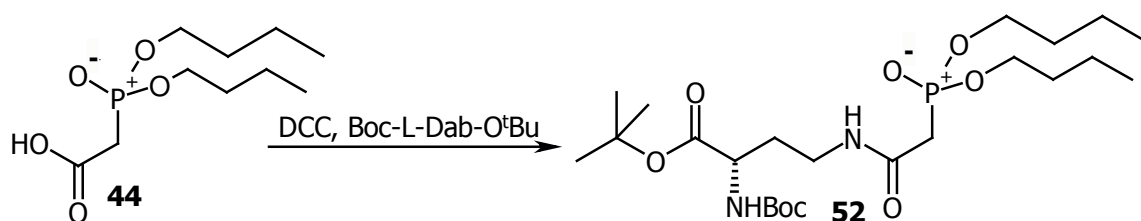
Verbindung **20** kann durch Amidbildung von geschützter L-2,4-Diaminobuttersäure mit 2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)essigsäure über die Methode der aktivierten Carbonylfunktion mit DCC und anschließender Verseifung hergestellt werden.



Schema 18

### 2.5.1 *N*<sup>α</sup>-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*<sup>γ</sup>-[2-(di-*n*-butoxyphosphinyl)acetyl]-L-2,4-diaminobuttersäure-*tert*-butylester

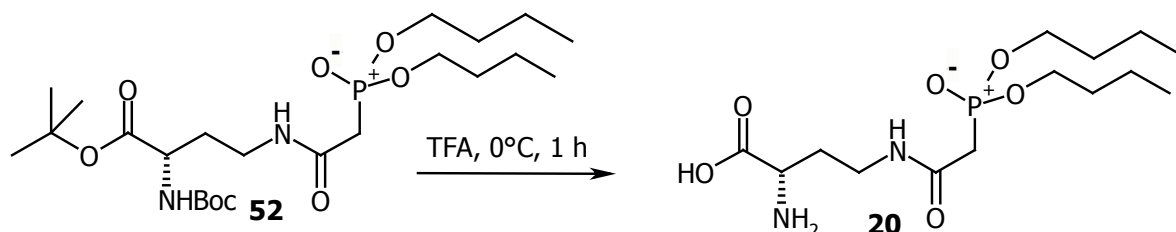
Am Anfang der Synthesesequenz stand abermals die Darstellung der 2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)essigsäure (**44**) aus Chloressigsäure-*tert*-butylester (**38**) mit anschließender Verseifung nach der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Methode. Die Aktivierung der Carbonsäure-Funktion durch DCC und Kupplung mit geschützter L-2,4-Diaminobuttersäure (Schema 19) zum *N*<sup>α</sup>-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*<sup>γ</sup>-[(2*RS*)-2-(di-*n*-butoxyphosphinyl)acetyl]-L-2,4-diaminobuttersäure-*tert*-butylester (**52**) erfolgte in Ausbeuten von 40%. Auch hier wurde auf Substanzen zur Verhinderung der Racematbildung verzichtet, da an der Reaktion kein chirales  $\alpha$ -Kohlenstoffatom beteiligt war.



Schema 19

## 2.5.2 $N^{\gamma}$ -[2-(DI-*n*-BUTOXYPHOSPHINYL)ACETYL]-L-2,4-DIAMINO-BUTTERSÄURE

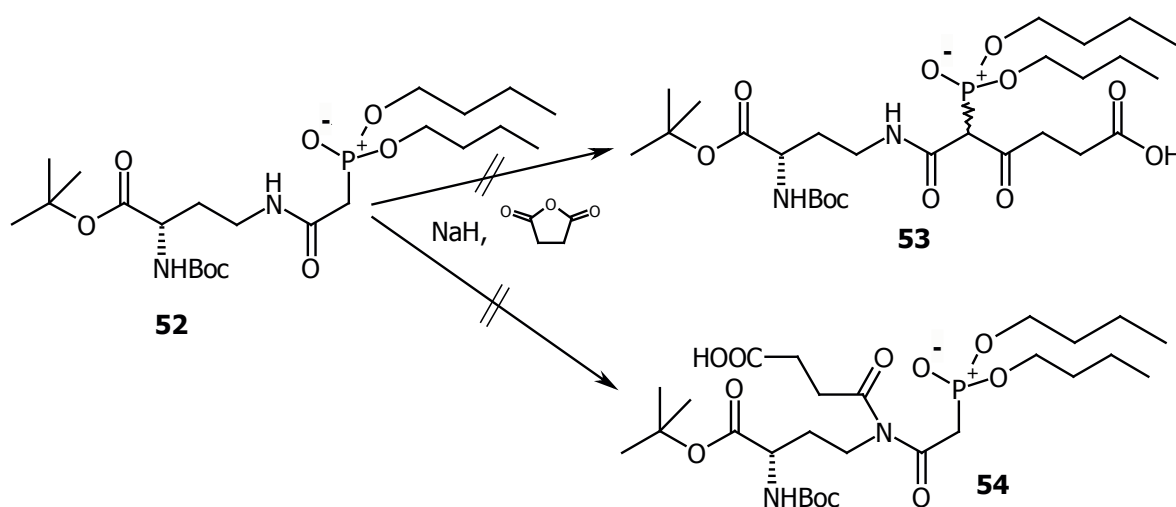
Die Verseifung mit TFA verlief glatt zur gewünschten freien Säure **20** (Schema 20).



Schema 20

## 2.5.3 VERSUCHTE UMSETZUNG ZU (2*S*,7*RS*)-2-AMINO-7-(DI-*n*-BUTOXYPHOSPHINYL)-6,8-DIOXO-5-AZAUNDECAN-1,11-DISÄURE

**52** wurde mit Natriumhydrid deprotoniert und anschließend mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt. Unter den untersuchten Bedingungen kam es allerdings zu keiner Reaktion. Weder der Angriff am Kohlenstoff zu **53**, noch die Acylierung am Stickstoff zu **54** konnte beobachtet werden (Schema 21). Dies liegt vermutlich an der zu geringen Reaktivität des Bernsteinsäureanhydrids.

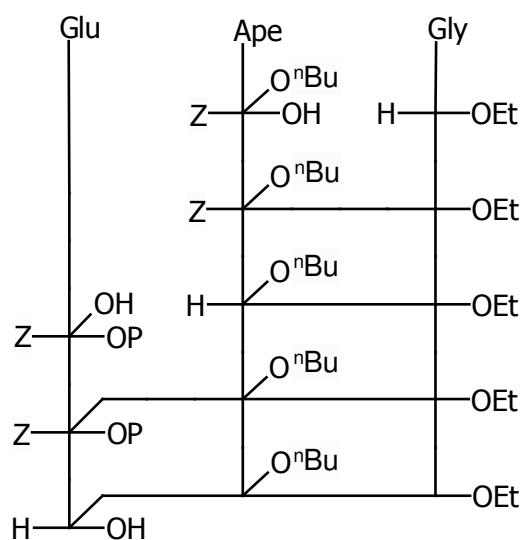


Schema 21

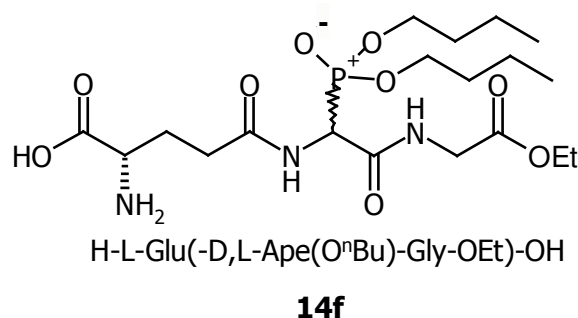
## 2.6 GLYCYL-ETHYLESTER DER PHOSPHONSÄUREDIESTER

Die selektive Darstellung von Glycyl-Estern der Phosphono-Analoga aus den freien Säuren **14d** und **17a** ist nicht möglich, da auch der Glutamyl-Rest eine Carbonsäure-Gruppe trägt. Hier mussten die Ester-Komponenten also bereits bei der Syntheseplanung der Tripeptide einbezogen werden.

Die Darstellung des Glycyl-Esters des seitenkettenverlängerten Phosphonsäure-diester **17a** wurde bereits unter 2.2 beschrieben. Die Synthesestrategie zum Aufbau des Glycyl-Esters des Phosphonsäurediester (**14f**) folgt dem Syntheschema der Darstellung des unter 2.4 beschriebenen doppelt retro-inversen Phosphonsäurediester (**19**) und wird in Schema 22 veranschaulicht. Das Tripeptid **14f** wird ausgehend von der zentralen Aminosäure Z-D,L-Ape(O<sup>n</sup>Bu)-OMe (**49**) durch sukzessive Umsetzung mit geschützter Glutaminsäure und Glycinethylester aufgebaut.



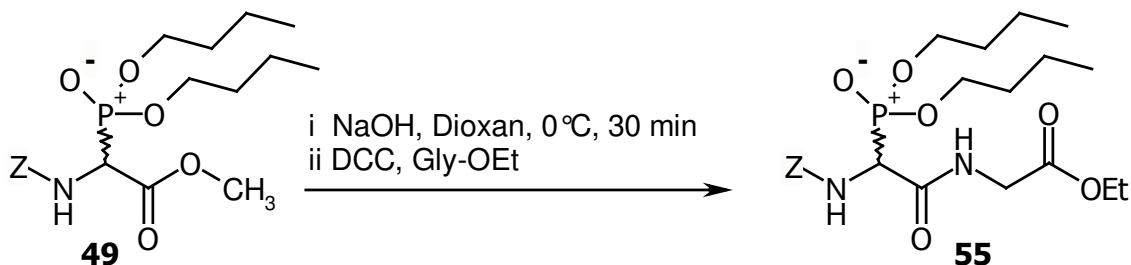
Schema 22



### 2.6.1 *N*-[(2*RS*)-2-Benzyloxycarbonylamino-2-(di-*n*-butoxyphosphinyl)acetyl]glycinethylester

Z-D,L-Ape(O<sup>n</sup>Bu)-OMe (**49**) wurde entsprechend der unter 2.4.1 beschriebenen Methode hergestellt und mit Natronlauge verseift. Die freie Säure wurde sofort mit DCC und Glycinethylester zum Dipeptid Z-D,L-Ape(O<sup>n</sup>Bu)-Gly-OEt (**55**) umgesetzt

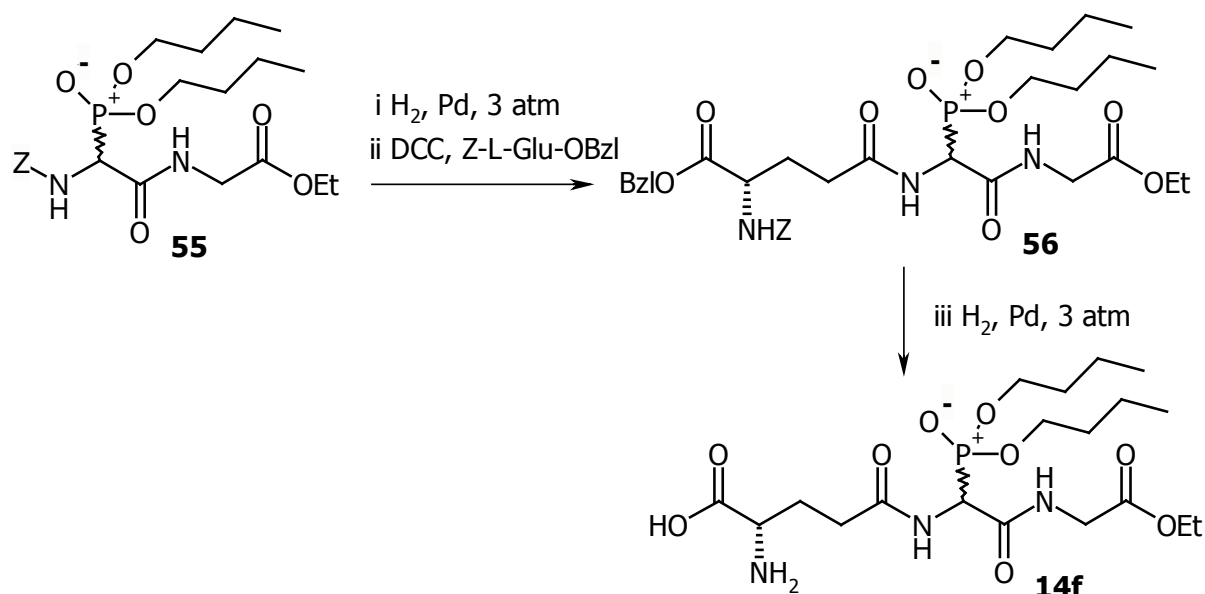
(Schema 23 i und ii). Auf einen Zusatz von Substanzen zur Verhinderung der Racematbildung konnte auch hier verzichtet werden, da die eingesetzten Aminosäuren racemisch vorlagen bzw. keine Stereoinformation am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom trugen.



Schema 23

### 2.6.2 *N*-[(2*RS*)-2- $\gamma$ -L-GLUTAMYLAMINO-2-(DI-*n*-BUTOXY-PHOSPHINYL)ACETYL]GLYCINETHYLESTER

Aus dem geschützten Dipeptid **55** wurde durch hydrolytische Spaltung das Amin freigesetzt und dieses durch DCC mit geschützter Glutaminsäure zum geschützten Tripeptid Z-L-Glu(-D,L-Ape(O<sup>n</sup>Bu)-Gly-OEt)-OBzl (**56**) kondensiert (Schema 24 i und ii). **56** wurde anschließend durch katalytische Hydrierung zu **14f** umgesetzt (Schema 24 iii).



Schema 24

## 2.7 NMR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

Aufgrund der direkten Bindung des Phosphors an einen Kohlenstoff, ergeben sich bei der Messung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren sehr hohe  $^2J_{\text{H,P}}$  und  $^1J_{\text{C,P}}$  Kopplungskonstanten. Anhand dieser Kopplungen lässt sich das Signal des phosphortragenden Kohlenstoffatoms im  $^{13}\text{C}$ - bzw. des benachbarten Wasserstoffatoms im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum leicht identifizieren. Die Signallage des  $\alpha$ -Kohlenstoffs und des daran gebundenen Wasserstoffs soll im Folgenden näher dargestellt und mit Literaturdaten verglichen werden, da sie eine leichte Abschätzung der Bindungsverhältnisse im Molekül erlauben.

### 2.7.1 2-AMINO-2-(DIALKOXYPHOSPHINYL)ESSIGSÄURE-DERIVATE

Die NMR-Daten von 2-Amino-2-(dialkoxyphosphinyl)essigsäurederivaten (**57a-l**) sind in der Literatur gut dokumentiert. Die Daten einiger ausgewählter 2-Amino-2-(dialkoxyphosphinyl)essigsäure-Derivate (**49**, **50** und **57a-l**) sind in Tab. 4 zusammengefasst und sind nach steigender  $^1\text{H}$ -NMR-Signallage aufgelistet.

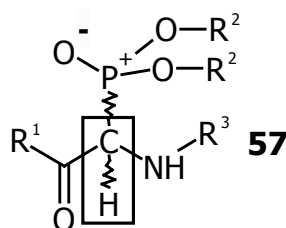
Die Art des Phosphonsäureesters wirkt sich auf die Lage des  $^1\text{H}$ -Signals kaum aus, wie man an der chemischen Verschiebung der Verbindungen **57d**, **57e**, **57f** und **49** erkennen kann. Die Ethyl-, *iso*-Propyl- und *n*-Butylester unterscheiden sich in ihrer chemischen Verschiebung nur um maximal  $\Delta\delta=0.07$  ppm.

Beim Austausch des Carbonsäureesters fällt das stark hochfeldverschobene Signal des *tert.*-Butylesters **57a** von  $\delta=4.68$  ppm auf. Die Verschiebung von 0.12-0.21 ppm beruht vermutlich auf einer Wechselwirkung zwischen Proton und Anisotropie-Effekt der voluminösen *tert.*-Butylgruppe<sup>[73]</sup>. Die anderen Alkylester **57b-f** und **49** liegen allerdings alle im Bereich von  $\delta=4.80$  - 4.89 ppm. Der einzige Wert, der sich nicht in dieses Schema einfügen lässt, ist die chemische Verschiebung von **57j**. Die angegebene Signallage von 4.97 ppm ist zu sehr ins tiefe Feld verschoben. Jedoch stimmen die Kopplungskonstanten, wie auch die Lage im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum mit den Daten entsprechender Verbindungen überein. Für dieses Verhalten konnte keine Erklärung durch besondere sterische Eigenschaften gefunden werden.

Selbst der Wechsel vom Carbonsäureester zum Amid **57g**, **57h** oder **50** wirkt sich

nur schwach aus (maximal  $\Delta\delta=0.06$  ppm von **49** zu **50**).

Eine deutliche Auswirkung tritt erst bei der Änderung zur Carbonsäure ein. Das Signal des Wasserstoffs am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom der freien Carbonsäure **57i** ist um  $\Delta\delta=0.12$  ppm tieffeldverschoben im Gegensatz zu dem des Esters **57d**. Hier wirkt sich der durch die Alkylgruppe im Ester abgeschwächte, induktive Effekt des Sauerstoffs aus, der zu einer Verringerung der Elektronendichte und so zur Entschirmung des Nucleus führt.



Verbindung	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	<sup>1</sup> H [ppm]	<sup>2</sup> J <sub>H,P</sub> [Hz]	<sup>13</sup> C [ppm]	<sup>1</sup> J <sub>C,P</sub> [Hz]
<b>57a</b> <sup>[74]</sup>	O <sup>t</sup> Bu	Et	Z	4.68	22.1	53.39	146
<b>57b</b> <sup>[75]</sup>	OEt	Et	Boc	4.80	22.55	52.2	-
<b>57c</b> <sup>[76]</sup>	OMe	Et	Boc	4.80	22.5	52.1	147.0
<b>57d</b> <sup>[47]</sup>	OMe	Et	Z	4.82	22.5	52.6	147.5
<b>57e</b> <sup>[47]</sup>	OMe	<sup>i</sup> Pr	Z	4.82	22.8	53.5	147.5
<b>50</b>	$\gamma$ -Boc-L-Dab-O <sup>t</sup> Bu	<sup>n</sup> Bu	Z	4.83	22.2	53.1	146.1
<b>57f</b> <sup>[76]</sup>	OMe	Et	Z	4.85	22.3	52.5	146.9
<b>57g</b> <sup>[47]</sup>	-Gly-OMe	<sup>n</sup> Bu	Z	4.87	20.5	51.8	146.4
<b>49</b> <sup>[47]</sup>	OMe	<sup>n</sup> Bu	Z	4.89	22.4	52.5	147.5
<b>57h</b> <sup>[47]</sup>	-Gly-O <sup>t</sup> Bu	<sup>n</sup> Bu	Z	4.89	22.3	52.1	148.4
<b>57i</b> <sup>[74]</sup>	OH	Et	Z	4.94	22.9	52.25	150
<b>57j</b> <sup>[75]</sup>	OEt	Et	Z	4.97	22.27	52.7	146.4
<b>57k</b> <sup>[77]</sup>	OH	Me	Z	4.99	22.9	-	-
<b>57l</b> <sup>[47]</sup>	-Gly-O <sup>t</sup> Bu	<sup>n</sup> Bu	$\gamma$ -Z-L-Glu-OBzl	5.10	-	50.1	149.2
<b>47</b>	$\gamma$ -Boc-L-Dab-O <sup>t</sup> Bu	<sup>n</sup> Bu	-MalO <sup>t</sup> Bu	5.11	22.0	51.3	151.2
<b>57m</b> <sup>[75]</sup>	OEt	Et	Ac	5.17	21.9	50.8	146.6
<b>57n</b> <sup>[47]</sup>	-Gly-OMe	<sup>n</sup> Bu	$\gamma$ -Z-L-Glu-OBzl	5.23	22.4	50.3	141.9

**Tab. 4:** NMR-Daten von 2-Amino-2-(dialkoxyphosphinyl)essigsäure-Derivaten



Der Wechsel der Z-Schutzgruppe zur Boc-Schutzgruppe bei **57c** zu **57d** zeigt kaum Auswirkungen auf die Signallage des  $^1\text{H}$ -NMR-Signals ( $\Delta\delta = -0.05$  ppm). Allerdings kann man einen deutlichen Tieffeldshift ( $\Delta\delta = 0.21$  ppm und  $\Delta\delta = 0.36$  ppm) für die Verbindungen **57i** und **57n** im Vergleich zu **57g** und **57h** beobachten, bei denen die Z-Schutzgruppe gegen  $\gamma$ -Z-L-Glu-OBzl getauscht wurde. Dies liegt an dem Wechsel eines Alkoxy-carbonyl-Substituenten zu einem Alkyl-carbonyl-Substituenten, wie auch die Lage von **57m** belegt. Auch hier wird die Elektronendichte am Wasserstoffatom verringert und so der Kern stärker entschirmt.

Die oben genannten Ausführungen sind auch auf die Änderung der Lage der  $^{13}\text{C}$ -Signale übertragbar, allerdings sind die Signaldifferenzen größer. Auch hier wirkt sich der Wechsel des Stickstoffsubstituenten von der Alkoxy-carbonyl- zur Alkyl-carbonyl-Funktion am stärksten aus.

Die  $^2J_{\text{H,P}}$ -Kopplungskonstanten von 22 Hz und die  $^1J_{\text{C,P}}$ -Kopplungskonstante von 147 Hz ist allen Verbindungen gemeinsam und bewegt sich in dem für  $^{13}\text{C}$ -Kopplungen typischen Bereich.

Eine Übersicht über die Auswirkung eines Substituentenwechsels gibt Tab. 5. Die hier aufgeführten Werte dienen als Richtwerte und stellen keine absoluten Angaben bzw. Inkremente dar.

Substituentenwechsel	$^1\text{H}:\Delta\delta$	$^{13}\text{C}:\Delta\delta$
Änderung innerhalb des Phosphonsäureesters $\text{R}^2$	Kein Einfluss	Kein Einfluss
Unverzweigter Carbonsäureester $\rightarrow$ <i>tert.</i> -Butylester	-0.15 ppm	+0.9 ppm
Unverzweigter Carbonsäureester $\rightarrow$ Carbonsäure	+0.10 ppm	+0.2 ppm
Alkoxy-carbonyl $\rightarrow$ Alkyl-carbonyl	+0.25 ppm	-2.1 ppm

**Tab. 5:** Auswirkungen eines Substituentenwechsels von 2-Amino-2-dialkoxyphosphinylessigsäure-Derivaten auf die chemische Verschiebung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Signallagen; Bezugspunkt: Verbindung **57f**;  $^1\text{H}:\delta = 4.85$  ppm;  $^{13}\text{C}:\delta = 52.5$  ppm

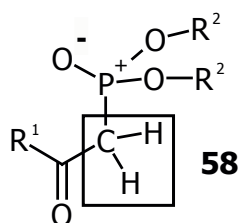
## 2.7.2 2-(DIALKOXYPHOSPHINYL)ESSIGSÄURE-DERIVATE

Die Datenlage bei 2-Dialkoxyphosphinylessigsäure-Derivaten ist etwas anders, da zwar viele Angaben existieren, aber unterschiedliche Lösungsmittel bei der Messung

der NMR-Spektren verwendet werden, die einen Einfluss auf Signallage und Kopplungskonstante haben.

Tab. 6 erlaubt eine gute Abschätzung des Einflusses der Phosphonsäuresubstituenten auf die Signallage der Protonen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum. Die Verschiebung durch die Alkyl-Reste der Phosphonester **58a,b** und **39** beträgt maximal 0.05 ppm.

Wie schon bei dem 2-Amino-2-dialkoxyphosphinylessigsäure-Derivaten **57a-n** zeigt sich hier ein Hochfeldshift des *tert.*-Butylesters **58a** im Vergleich zum Ethylester **58c** um  $\Delta\delta=0.12 - 0.15$  ppm.



Verbindung	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	<sup>1</sup> H [ppm]	<sup>2</sup> J <sub>H,P</sub> [Hz]
<b>58a</b> <sup>[78]</sup>	O <sup>t</sup> Bu	Et	2.70	-
<b>58b</b> <sup>[78]</sup>	O <sup>t</sup> Bu	<sup>i</sup> Pr	2.75	-
<b>39</b> <sup>[78]</sup>	O <sup>t</sup> Bu	<sup>n</sup> Bu	2.75	-
<b>58c</b> <sup>[78,79]</sup>	OEt	Et	2.82-2.87	23

**Tab. 6:** NMR-Daten von 2-Dialkoxyphosphinylessigsäure-Derivaten mit CCl<sub>4</sub> als Lösungsmittel

Eine umfassendere Übersicht bietet Tab. 7, in der NMR-Daten von Messungen mit deuteriertem Chloroform als Lösungsmittel aufgeführt sind.

Auch hier bleibt der Einfluss eines Wechsels des Phosphonsäureesters gering. Die chemische Verschiebung ändert sich lediglich um  $\Delta\delta=0.04$  ppm in der Reihe **58f**, **44**, **58i** und **58j**. Auch hier beobachtet man einen Hochfeldshift von  $\Delta\delta=0.14$  ppm beim *tert.*-Butylesters **39** im Vergleich zum Benzylester **43**. Überraschenderweise wirkt sich jedoch eine Änderung vom Ester zur Carbonsäure wie bei **43** zu **44** oder **58g** zu **58f** hier nicht auf die Signallage des  $\alpha$ -Kohlenstoff und dessen Wasserstoff aus.

Die Carbonsäureamide **58d**, **52**, **58e** und **45** liegen im gleichen Bereich wie die *tert.*-Butylester ( $\Delta\delta=-0.05$  bis  $+0.02$  ppm).

Verbindung	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	<sup>1</sup> H [ppm]	<sup>2</sup> J <sub>H,P</sub> [Hz]	<sup>13</sup> C [ppm]	<sup>1</sup> J <sub>C,P</sub> [Hz]
<b>58d</b> <sup>[80]</sup>	ω-Z-L-Orn-OBzl	Bzl	2.80	21	35.4	130
<b>39</b>	O <sup>t</sup> Bu	<sup>n</sup> Bu	2.85	21.5	35.5	133.2
<b>52</b>	δ-Boc-L-Dab-O <sup>t</sup> Bu	<sup>n</sup> Bu	2.86	20.8	35.4	133.7
<b>58e</b> <sup>[81]</sup>	-Asp(Nb)-ONb	CH <sub>3</sub>	2.88	21	34.1	132
<b>45</b>	-Gly-O <sup>t</sup> Bu	<sup>n</sup> Bu	2.88	20.5	35.5	131.4
<b>58f</b> <sup>[81]</sup>	OH	CH <sub>3</sub>	2.97	21	-	-
<b>58g</b> <sup>[82,83]</sup>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2.96, 2.98	21.5, 21	34.1	130
<b>44</b>	OH	<sup>n</sup> Bu	2.99	21.7	34.7	134.3
<b>43</b>	OBzl	<sup>n</sup> Bu	3.00	21.6	34.2	134.0
<b>58h</b> <sup>[84]</sup>	OBzl	Et	3.00; 3.03	18 <sup>3)</sup>	34.04; 34.93	134.4 <sup>3)</sup>
<b>58i</b> <sup>[56]</sup>	OH	Et	3.00	11.5	-	-
<b>58j</b> <sup>[80]</sup>	OH	Bzl	3.01	22	34.3	136

**Tab. 7:** NMR-Daten von 2-Dialkoxyphosphinylessigsäure-Derivaten mit CDCl<sub>3</sub> als Lösungsmittel; Nb = p-Nitrobenzyl; - = keine Angabe

Eine <sup>2</sup>J<sub>H,P</sub>-Kopplungskonstante von 21 Hz ist auch hier allen Verbindungen gleich. Lediglich die Verbindungen **58h** und **58j** weichen mit einer Aufspaltung von 18 Hz bzw. 11.5 Hz drastisch ab. Die niedrige Kopplungskonstante von **58h** ist stark fehlerbehaftet, da sie aus den angegebenen Literaturdaten berechnet wurde, und die beschriebene hohe Messfrequenz von 600 MHz zu großen Fehlern bei einer ungenauen ppm-Angabe führt (6 Hz für 0.01 ppm). Gründe für die ungewöhnlich niedrige Kopplungskonstante der Verbindung **58i** sind nicht ersichtlich.

Änderungen der <sup>13</sup>C-NMR-Signale stimmen in den Tendenzen mit den für die <sup>1</sup>H-Daten gemachten Ausführungen überein. Die <sup>1</sup>J<sub>C,P</sub>-Kopplungskonstante von ca. 133 Hz stimmt ebenfalls bei den Verbindungen überein.

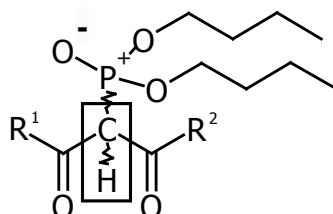
<sup>3)</sup> Die C-P- und H-P-Kopplungen wurden von den Autoren nicht angegeben, konnten aber aus Signallage und Messfrequenz errechnet.

Die Auswirkung eines Substituentenwechsels sind in Tab. 8 zusammengefasst. Die hier aufgeführten Werte dienen als Richtwerte und stellen keine absoluten Angaben bzw. Inkremente dar.

Substituentenwechsel	$^1\text{H}:\Delta\delta$	$^{13}\text{C}:\Delta\delta$
Änderung innerhalb des Phosphonsäureesters	Kein Einfluss	Kein Einfluss
Carbonsäure $\rightarrow$ <i>tert.</i> -Butylester	-0.15 ppm	+1.3 ppm
Carbonsäure $\rightarrow$ unverzweigter Carbonsäureester	Kein Einfluss	Kein Einfluss
Carbonsäure $\rightarrow$ Carbonsäurebenzylester	Kein Einfluss	Kein Einfluss
Carbonsäure $\rightarrow$ Carbonsäureamid	-0.12 ppm	+1.3 ppm

**Tab. 8:** Auswirkungen eines Substituentenwechsels von 2-Dialkoxyphosphinyllessigsäure-Derivaten auf die chemische Verschiebung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Signallagen; Bezugspunkt: Verbindung **43**;  $^1\text{H}$ :  $\delta=3.00$  ppm;  $^{13}\text{C}$ :  $\delta=34.2$  ppm

### 2.7.3 2-(DIALKOXYPHOSPHINYL)MALONSÄURE-DERIVATE



Verbindung	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	$^1\text{H}$ [ppm]	$^2\text{J}_{\text{H,P}}$ [Hz]	$^{13}\text{C}$ [ppm]	$^1\text{J}_{\text{C,P}}$ [Hz]
<b>40</b>	OBzl	O <sup>t</sup> Bu	4.56	31.2	54.7	136.2
<b>41</b>	OBzl	Gly-OtBu	4.65	32.3	54.3	131.6

**Tab. 9:** Ausgewählte NMR-Daten von 2-Dialkoxyphosphinylmalonsäure-Derivaten mit  $\text{CDCl}_3$  als Lösungsmittel

Hier gibt es nur einen Vergleichswert aus der Literatur von Polzov *et al.*<sup>[78]</sup>, die jedoch Tetrachlorkohlenstoff als Lösungsmittel verwendeten. Die Autoren gaben die chemische Verschiebung des  $^1\text{H}$ -NMR-Signals mit  $\delta=4.14$  ppm und die  $^2\text{J}_{\text{H,P}}$ -Kopplungskonstante mit 22 Hz an.

Beim Vergleich der beiden in deuteriertem Chloroform vermessenen

Verbindungen fällt der Tieffeldshift von 0.09 ppm beim Wechsel der *tert.*-Butylester-Funktion in **40** zum Amid in **41** auf. Dieser Effekt der *tert.*-Butyl-Gruppe wurde schon bei den 2-(Dialkoxyphosphinyl)essigsäure- und den 2-Amino-2-(Dialkoxyphosphinyl)essigsäure-Derivaten beobachtet und dort erklärt.

Aufgrund der geringen Datenmenge ist eine weitere Abschätzung der Substituentenauswirkungen nicht sinnvoll.

## 2.8 ZUSAMMENFASSUNG

Zusätzlich zu den bereits vorhandenen Phosphono-Analoga des Glutathions konnten weitere Verbindungen synthetisiert werden, die potentielle Inhibitoren der Glutathion S-Transferase darstellen.

Im Zuge der Entwicklung eines peptidischen homologen Phosphono-Analogons des GSH (**17a**) gelang die Synthese von Phosphono-analogen Serin-Derivaten ausgehend von Serin über 2-Amino-3-halogenpropionsäure-Derivate. Dabei konnte die Di-*n*-butoxyphosphinyl-Gruppe über eine Michaelis-Arbuzov-Reaktion in das Molekül eingeführt werden. Die aus den Arbeiten von Schmidt *et al.* übertragenen Reaktionsbedingungen führten zu niedrigeren Ausbeuten und wurden in mehreren Schritten so weit optimiert, dass sie erfolgreich auf die Tripeptide des Typs Z-L-Glu(-L-Ser-Gly-OR)-OBzl (**30**) übertragen werden konnten.

Die von Serin ausgehende Synthese der Tripeptide gelang über die Darstellung des entsprechenden Dipeptids Z-L-Ser-Gly-OR (**29**) durch konventionelle Peptidchemie in Lösung mit DCC als Kupplungsreagenz. Die Freisetzung des gewünschten Phosphono-Analogons erfolgte dann durch Abspaltung der Schutzgruppen.

Bei den peptidomimetischen Phosphono-Analoga gelang die Synthese eines retro-inversen Phosphonsäurediesters (**18**) über die Acylierung des *N*-[2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)acetyl]glycin-*tert.*-butylester (**45**). Es konnte gezeigt werden, dass auch die Darstellung über einen orthogonalen Dialkoxyphosphinyl-malonsäurediester möglich ist, wenn diese auch mit schlechteren Ausbeuten verknüpft ist.

Die Acylierung des Acetamids **46** am  $\alpha$ -Kohlenstoff zu *N*[(2*RS*)-*O*-Benzyl-2-(di-*n*-butoxyphosphinyl)malonyl]glycin-*tert*.-butylester (**41**) läuft in Konkurrenz zur Stickstoffacylierung ab, wie die Isolierung von *N*-(Benzyloxycarbonyl)-*N*-(*tert*.-butoxycarbonylmethyl)-2-(di-*n*-butoxyphosphinyl)essigsäureamid (**46**) zeigt. Die Unterscheidung sowie Strukturaufklärung der Verbindungen **41** und **46** gelang durch Zuordnung der NMR-Signale.

Die Methode von Kreuzkamp zur Darstellung eines unsymmetrischen 2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)malonsäurediesters (**40**) konnte auf die Reaktion von 2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)essigsäure-*tert*.-butylester mit Chlorameisensäurebenzylester übertragen werden. Die bisher dargestellten Diester waren stets homogene Ester, die zu einem sukzessiven Aufbau nicht geeignet waren. Der hier erstmals dargestellte orthogonale Diester stellt trotz der Decarboxylierung des Monoesters eine interessante Möglichkeit für aufbauende Synthesen dar.

Ein weiteres Peptidomimetikum stellt das doppelt invertierte Phosphono-Analogon **19** dar. Dieses konnte durch Peptidsynthese in Lösung mit DCC als Kupplungsreagenz über das Dipeptid Boc-L-Dab(Z-D,L-Ape(O<sup>n</sup>Bu)-)-O<sup>t</sup>Bu (**50**) hergestellt werden. Die weitere Umsetzung gelang mit Malonsäure-mono-*tert*.-butylester und DCC zur Aktivierung der Säure. Eine anschließende Abspaltung der Schutzgruppen in einem Schritt führte zur gewünschten Verbindung.

Das dritte peptidomimetische Phosphono-Analogon **20** enthält lediglich eine invertierte Amidbindung. Hier konnte *N* <sup>$\alpha$</sup> -(*tert*.-Butoxycarbonyl)-*N* <sup>$\gamma$</sup> -[(2*RS*)-2-(di-*n*-butoxyphosphinyl)acetyl]-L-2,4-diaminobuttersäure-*tert*.-butylester (**52**) durch die Methode der gemischten Anhydride aus der Peptidchemie, ausgehend von 2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)essigsäure (**44**) mit DCC-vermittelter Kopplung von Boc-L-Dab-O<sup>t</sup>Bu, dargestellt werden. Die anschließende Verseifung führte dann zum Phosphonsäurediester **20**.

Die Darstellung der Glycyl-Ester **14f** und **17b** gelang analog zu den Synthesemethode der entsprechenden freien Säuren **14d**<sup>[50]</sup> und **17a**. Jedoch wurde anstatt des Glycin-*tert*.-butylesters der Glycinethylester eingesetzt.

## **3 HEMMUNG DER GST-AKTIVITÄT**

---

### **3.1 EINLEITUNG**

Die in dieser Arbeit dargestellten Verbindungen sollen aufbauend auf vorhandenen Modellschubstanzen das Spektrum von potentiellen Modulatoren in der Chemotherapie maligner Erkrankungen ergänzen und möglichst selektiv einzelne Isoenzyme der menschlichen Glutathion S-Transferasen hemmen. Diese inhibitorische Wirkung lässt sich am besten an gereinigten Enzymen testen, wobei Effekte wie Verteilung im Organismus, Metabolismus, Resorption, Ausscheidung, Aufnahme in die Zelle u.a. ausgeklammert werden. Neben heterolog exprimierten humanen Isoenzymen wurden auch gereinigte Isoenzyme aus der menschlichen Placenta und der Schweineleber verwendet.

Als Testmodell wurde die GST-katalysierte Konjugatbildung von GSH mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) ausgewählt, da diese einen guten Vergleich mit Literaturdaten zulässt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Konjugation von CDNB mit der Konjugation von Zytostatika wie Melphalan eng korreliert<sup>[85]</sup>.

Ein wichtiges Element, um Ergebnisse aus Hemmstudien im Sinne einer Struktur-Wirkungsbeziehung sinnvoll zu diskutieren, sind Kristallstrukturen. Einen Überblick über Kristallstrukturen verschiedenster Enzyme gibt die Protein Data Bank<sup>[86a,b]</sup>, in der derzeit 22333 Strukturen gesammelt sind (Stand August 2003) und in der jede neu veröffentlichte Kristallstruktur durch einen vierstelligen Code (PDB-Code) identifizierbar ist. Darunter befinden sich 117 Einträge von aufgeklärten Kristallstrukturen der GST-Isoenzyme, teilweise mit Inhibitor oder Substrat, teilweise ohne Liganden. Tab. 10 gibt eine Übersicht über die 54 veröffentlichten Kristallstrukturen von menschlichen GST-Isoenzymen. Neben den natürlich vorkommenden Isoenzymen gibt es auch Kristallstrukturen einiger synthetischer Enzyme oder natürlicher Varianten. So wurden für Bindungsstudien einzelne Aminosäuren von Isoenzymen ausgetauscht<sup>[87-92]</sup> oder natürlich vorkommende Mutationen<sup>[93,94]</sup> zur Kristallisation gebracht. In zwei Fällen sind komplett neue Enzyme geschaffen worden<sup>[95,96]</sup>, bei denen auf nähere Angaben der Isoenzymmodulation verzichtet werden soll, da sie für die hier betrachteten Aspekte unbedeutend sind.

Isoenzym	PDB-Code	Ligand(en)	Veränderung	Lit.
hA1-1	1gsd, 1gsf	ohne, EA-GSH	keine	[87]
	1gse	EA	R15K	[87]
	1guh	S-Benzyl-GSH	keine	[15]
	1k3l, 1k3o, 1k3y	S-Hexyl-GSH, ohne, S-Hexyl-GSH	keine	[97]
hA4-4	1gul, 1gum	S-(2-Iodobenzyl)-GSH, ohne	keine	[98]
hM2-2	2gtu	ohne	keine	[99]
	1hna, 1hnb, 1hnc	S-(2,4-Dinitrophenyl)-GSH	W214F	[88]
hM2-3	3gtu	ohne	keine	[99]
hM4-4	4gtu	ohne	keine	[100]
hP1-1	1aqv	S-(p-Brombenzyl)-GSH	keine	[10]
	1aqw, 1aqx	GSH; S-(2,4,6-Trinitrophenyl)-GSH	keine	[101]
	1eog, 1eoh	ohne	S149A, D152A	[90]
	1gss	S-Hexyl-GSH	keine	[10]
	2gss, 3gss	EA, EA-GSH	keine	[102]
	4gss	S-Hexyl-GSH	Y108F	[89]
	5gss – 9gss	GSH, GSH, S-Hexyl-GSH	keine	[103]
	10gs, 17gs, 19gs	TER117 ( <b>13</b> ), S-Hexyl-GSH, GSH	keine	[103]
	11gs	EA-GSH	keine	[104]
	12gs, 13gs	S-Nonyl-GSH, GSH&Sulphasalazin	keine	[105]
	14gs, 16gs, 18gs	ohne, ohne, S-(2,4-Dinitrophenyl)-GSH	keine	[106]
	20gs	Cibacron Blau	keine	[107]
	21gs	Chlorambucil	keine	[108]
	22gs	ohne	Y49F	[92]
	1md3, 1md4	GSH	G146A, G146V	[91]
	1pgt, 2pgt	S-Hexyl-GSH, GPR	V104 <sup>1)</sup>	[93]
3pgt, 4pgt	(+)-anti-bpde-GSH	I104 <sup>1)</sup> , V104 <sup>1)</sup>	[94]	
hT2-2	1ljr, 2ljr, 3ljr	GSH, ohne, S-(1-Naphthylmethyl)-GSH	keine	[109]
hZ1-1	1fw1	GSH	keine	[110]
hO1-1	1eem	GSH	keine	[13]
Synthetisch	1gtu	ohne	hM1a-1a	[95]
	1lbk	GSH	hA1-1/hP1-1	[96]

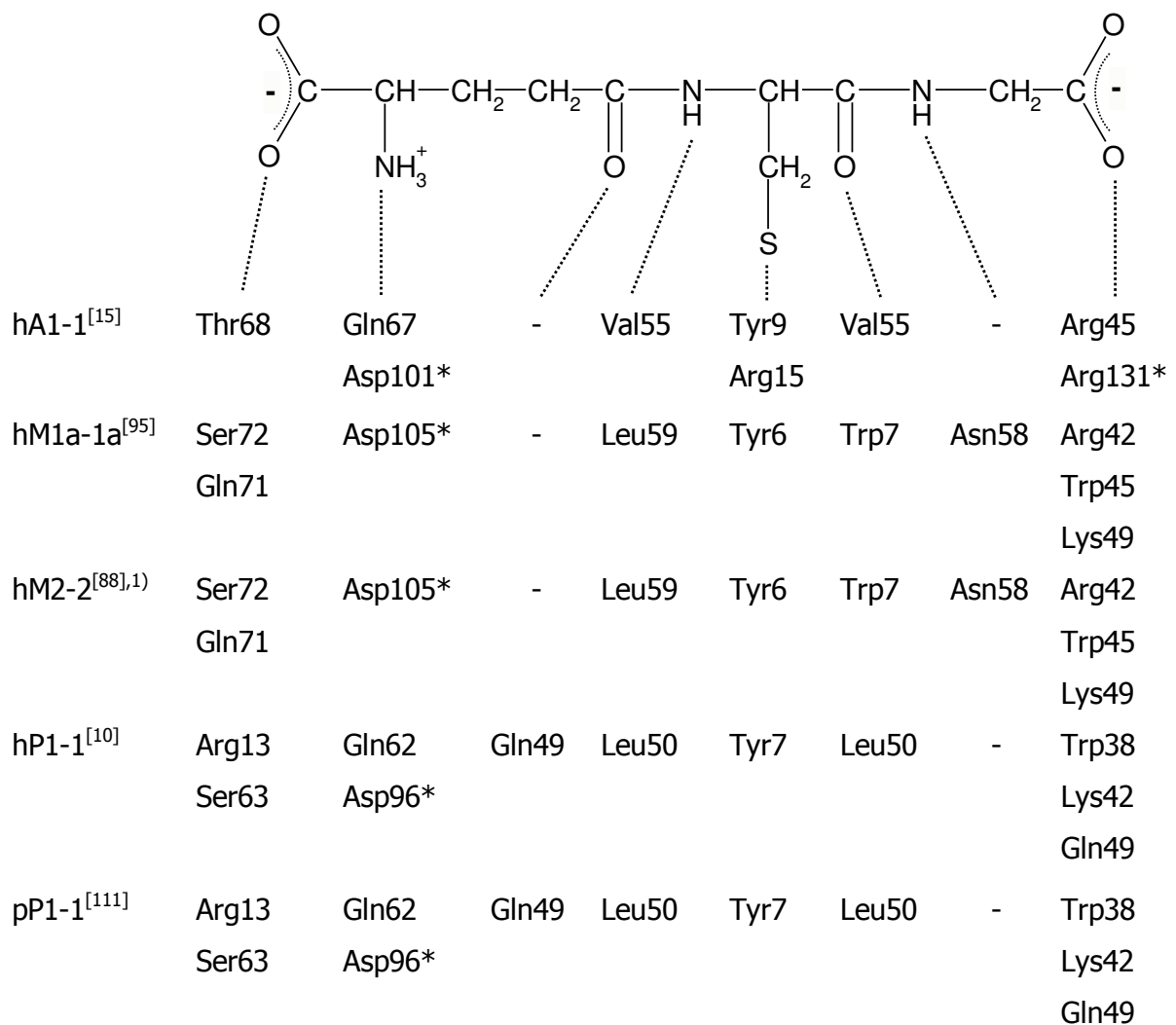
**Tab. 10:** Übersicht über Kristallstrukturen von menschlichen GST-Isoenzymen; <sup>1)</sup> natürliche Variante; GPR=(9R,10R)-9-(S-Glutathionyl)-10-hydroxy-9,10-dihydrophenanthren; EA=Etacrynsäure (+)-anti-bpde= (9-Hydroxy-7,8-dioxo-7,8,9,10-tertrahydrobenzo[def]chrysen-10-yl



Bei veränderten Enzymen ist ein Buchstaben-/Zahlencode angegeben, der beschreibt, welche Aminosäuren in welcher Position ausgetauscht wurden. So bedeutet z.B. W214F, dass Tryptophan (W) an Position 214 durch Phenylalanin (F) ersetzt worden ist.

Im Gegensatz zu den zahlreichen Kristallstrukturen von menschlichen GST-Isoenzymen gibt es bisher nur eine aufgeklärte Struktur von GSTs aus dem Schwein. pP1-1 wurde von Dirr *et al.*<sup>[111]</sup> mit GSH-Sulfat als Ligand zur Kristallisation gebracht und ist unter dem PDB-Code 2gsr in die Protein Data Bank aufgenommen.

In Abb. 13 sind die anhand der Kristallstrukturen beobachteten polaren Wechselwirkungen zwischen Glutathion und den für diese Arbeit wichtigen GST-Isoenzymen zusammengefasst.



**Abb. 13:** Vergleich der polaren Wechselwirkungen zwischen GSH und der G-Site verschiedener GST-Isoenzyme mithilfe von veröffentlichten Kristallstrukturen; \*: Aminosäure gehört zu einer benachbarten Untereinheit des Dimers; <sup>1)</sup>Mutation W214F.

Da derzeit für hM1-1 noch keine Kristallstruktur veröffentlicht wurde, sind beispielhaft für die Isoenzyme der Klasse Mu die polaren Wechselwirkungen der G-Site zu Glutathion aus den Kristallstrukturen von hM2-2<sup>[88]</sup> und dem künstlichen hM1a-1a<sup>[95]</sup> aufgeführt. Die polaren Wechselwirkungen zwischen den G-Sites der beiden Isoenzyme und Glutathion sind identisch, und daher können für das Isoenzym hM1-1 ähnliche Bindungsverhältnisse angenommen werden.

Beim Isoenzym hA1-1<sup>[15]</sup> fixieren die Hydroxyl-Gruppe und der Stickstoff der Peptidbindung (pNH) aus der Aminosäure Thr68 die Carboxyl-Gruppe des Glutamats über eine Wasserstoffbrücken-Bindung. Die geladene Amino-Gruppe des Glutamats wird von den beiden Aminosäuren Gln67 und Asp101\* durch eine Wasserstoffbrücken-Bindung bzw. über ionische Wechselwirkungen gebunden. Val55 fixiert über seine Peptid-Carbonyl-Gruppe (pCO) und die pNH-Gruppe die Amino- und Carbonyl-Funktion des Cysteins. Sowohl Tyr9 als auch Arg15 binden mit einer phenolischen OH-Gruppe bzw. der pNH-Funktion über eine Wasserstoffbrücken-Bindung an den Schwefel des Cysteins. Dabei fixiert Glu104 zusätzlich noch die Amidinfunktion des Arg15 über ionische Wechselwirkungen. Arg45 und Arg131\* binden mit ihrer jeweiligen Amidin-Gruppe ionisch an die Carboxylat-Gruppe des Glycins.

Die Wechselwirkungen von hM2-2<sup>[88]</sup> und hM1a-1a<sup>[95]</sup> mit der Carboxyl-Gruppe kommen durch die Wasserstoffbrücken-Bindung der Hydroxy-Funktion des Ser72 zustande. Asp105\* stabilisiert mit seiner Amidin-Gruppe die  $\alpha$ -Amino-Funktion des Glutamats. Eine Stabilisierung des Amid-Stickstoffs des Cysteins erfolgt durch die Wasserstoffbrücken-Bindung zur Carbonyl-Funktion des Leu59. Im Gegensatz zu hA1-1 fixiert diese Aminosäure nicht noch zusätzlich die pCO-Gruppe des Cysteins. Stattdessen wird dies durch die Wechselwirkung mit dem Indol-Stickstoff der Aminosäure Trp7 ermöglicht. Das Tyr6 bildet eine Wasserstoffbrücken-Bindung zum Schwefel des Cysteins aus. Eine Besonderheit stellt die Fixierung der pNH-Funktion des Glycins durch eine Wasserstoffbrücken-Bindung zu Asn58 dar. Die Carboxyl-Gruppe des Glycins wird durch Trp45, Lys49 und Arg42 gebunden.

Die Isoenzyme hP1-1<sup>[10]</sup> und pP1-1<sup>[111]</sup> sind in ihrer G-Site völlig identisch. Hier bindet ebenfalls wie bei hM2-2 ein Serin (hier Ser63) über seine Hydroxy-Gruppe und zusätzlich durch die pNH-Gruppe über eine Wasserstoffbrücken-Bindung an die

Carboxylat-Gruppe des Glutamats. Zusätzlich aber kommt es noch zu einer Wechselwirkung der Säurefunktion zur NH<sub>2</sub>-Gruppe des Arg13. Die  $\alpha$ -Amino-Gruppe des Glutamats wird durch Gln 62 und Asp96\* über deren pCO-Funktion fixiert. Die Carbonyl-Gruppe des Glutamats wird durch Wasserstoffbrücken-Bindung zur pNH-Funktion des Gln49 stabilisiert. Leu50 bindet über pCO und pNH mit dem pNH und pCO des Cysteins. Tyr7 fixiert über seine phenolische Hydroxyl-Funktion den Schwefel des Cysteins. Die Stabilisierung des Glycin-Carboxylats erfolgt durch den Indol-Stickstoff des Trp38 und die pNH-Gruppe bzw. NH<sub>2</sub>-Gruppe des Lys42 und Gln49.

### 3.2 BESTIMMUNG DER IC<sub>50</sub>-WERTE

Neben den in dieser Arbeit neu dargestellten Verbindungen sind auch inhibitorische Daten für die Leitsubstanz **14d** aufgenommen. Die Einführung der Phosphonsäurediester-Funktion in das GSH-Grundgerüst der Verbindung **14d** ist verantwortlich für dessen inhibitorische Wirkung. Der Backbone-Bereich des Moleküls sollte eine vergleichbare Wechselwirkung mit dem Enzym eingehen wie Glutathion. Änderungen in der Hemmwirkung der strukturell unterschiedlichen Inhibitoren sollten also in Bezug auf die veränderte Struktur der neuen Peptidomimetika **18**, **19** und **20** allein auf Änderungen im Backbone-Bereich beruhen. Im Gegensatz dazu ist bei dem seitenkettenverlängerten Phosphonsäurediester **17a** der Backbone-Bereich mit **14d** identisch und nur die Seitenkette um ein C-Atom verlängert.

Eine einfache Methode zur Quantifizierung einer Hemmwirkung auf ein Enzym ist die Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes. Der IC<sub>50</sub>-Wert entspricht der Konzentration des Inhibitors, welche die nicht gehemmte Aktivität des Enzyms unter Standardbedingungen um 50% senkt. Die IC<sub>50</sub>-Werte der einzelnen Verbindungen wurden bestimmt, indem die enzymatische Aktivität in An- und Abwesenheit des Inhibitors gemessen wurde (siehe Kap. 5.3).

### 3.2.1 HEMMUNG VON GLUTATHION S-TRANSFERASE A1-1

Die dargestellten neuen Phosphono-Analoga des GSH **14f**, **17a**, **17b**, **18**, **19** und **20** wurden nach der in Kapitel 5.3 beschriebenen Methode auf ihre Hemmung in Bezug auf hA1-1 und pA1-1 getestet. Die IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen sind in Tab. 11 zusammengefasst und werden mit den Ergebnissen der von Kunze<sup>[50]</sup> dargestellten Leitstrukturen **14d** und **14e** verglichen.

Substanz	IC <sub>50</sub> -Werte (μM)	
	hA1-1	pA1-1
<b>17a</b>	11.9 ± 9.9	> 1000
<b>17b</b>	nb	> 1000
<b>18</b>	454 ± 251	> 1000
<b>19</b>	> 1000	> 1000
<b>20</b>	630 ± 564	> 1000
<b>14d</b> <sup>[50]</sup>	15 ± 3.2	61±10
<b>14e</b> <sup>[50]</sup>	143±21	nb
<b>14f</b>	nb	10.7±5.8

**Tab. 11:** Übersicht über die Hemmung von GST-Isoenzymen des Typs A1-1 vom Menschen und vom Schwein durch verschiedene Phosphono-Analoga des GSH; nb=nicht bestimmt

Die beste inhibitorische Wirkung auf hA1-1 zeigen der Phosphonsäurediester **14d** und der seitenkettenverlängerte Phosphonsäurediester **17a** mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 15 bzw. 11.9 μM. Der retro-inverse Phosphonsäurediester **18** und das retro-inverse Phosphonsäurediesterfragment **20** binden mit IC<sub>50</sub>-Werten im halbmillimolaren Bereich sehr viel schlechter an das Isoenzym. Der doppelt retro-inverse Phosphonsäurediester **19** vermag das Enzym erst in millimolaren Konzentrationen zu hemmen.

Für eine Hemmung des Isoenzym pA1-1 aus dem Schwein müssen alle neu dargestellten Verbindungen im millimolaren Konzentrationsbereich vorliegen, während der Phosphonsäurediester **14d** und vor allem **14f** das Enzym mit IC<sub>50</sub>-Werten von 61 bzw. 10.7 μM bereits im unteren mikromolaren Bereich hemmen.

### 3.2.2 HEMMUNG VON GLUTATHION S-TRANSFERASE M1-1

Die dargestellten neuen Phosphono-Analoga des GSH **14f**, **17a**, **17b**, **18**, **19** und **20** wurden nach der in Kapitel 5.3 beschriebenen Methode auf ihre Hemmung in Bezug auf hM1-1 und pM1-1 getestet. Die IC<sub>50</sub>-Werte der Verbindungen sind in Tab. 12 zusammengefasst und werden mit den Ergebnissen der von Kunze<sup>[50]</sup> dargestellten Leitstrukturen **14d** und **14e** verglichen.

Substanz	IC <sub>50</sub> -Wert (µM)	
	hM1-1	pM1-1
<b>17a</b>	> 1000	351 ± 63
<b>17b</b>	nb	> 1000
<b>18</b>	> 1000	> 1000
<b>19</b>	>> 1000	> 1000
<b>20</b>	>> 1000	> 1000
<b>14d</b> <sup>[50]</sup>	4.7 ± 1.6	1.2 ± 0.1
<b>14e</b> <sup>[50]</sup>	67 ± 13	nb
<b>14f</b>	nb	18 ± 5

**Tab. 12:** Übersicht über die Hemmung von GST-Isoenzymen des Typs M1-1 durch verschiedene Phosphono-Analoga des GSH; nb=nicht bestimmt

Sowohl der seitenkettenverlängerte Phosphonsäurediester **17a** als auch die peptidomimetischen Verbindungen **18**, **19** und **20** hemmen das GST-Isoenzym hM1-1 erst im millimolaren Konzentrationsbereich. Hier zeigt sich allerdings der Phosphonsäurediester **14d** mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 4.7 µM als besonders potenter Inhibitor. Auch der Glycyl-Methylester **14e** hemmt das Isoenzym in mikromolaren Konzentrationen von lediglich 67 µM.

Die inhibitorische Wirkung auf das gleiche Isoenzym aus dem Schwein ist im Vergleich zum humanen M1-1 bei fast allen Verbindungen erhöht. Allerdings ist von den neu dargestellten Substanzen lediglich bei Verbindung **17a** in Konzentrationen unterhalb des millimolaren Bereiches eine deutliche Hemmung zu erkennen. Der Phosphonsäurediester **14d** zeigt an diesem Isoenzym seine beste inhibitorische

Wirkung und hat einen  $IC_{50}$ -Wert von nur 1.2  $\mu\text{M}$ . Auch der Glycyl-Ethylester **14f** hemmt mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 18  $\mu\text{M}$  das Isoenzym pM1-1 sehr gut.

### 3.2.3 HEMMUNG VON GLUTATHION S-TRANSFERASE P1-1

Die dargestellten neuen Phosphono-Analoga des GSH **14f**, **17a**, **17b**, **18**, **19** und **20** wurden nach der in Kapitel 5.3 beschriebenen Methode auf ihre Hemmung in Bezug auf hP1-1 getestet. Die  $IC_{50}$ -Werte der Verbindungen sind in Tab. 13 zusammengefasst und werden mit den Ergebnissen der von Kunze<sup>[50]</sup> dargestellten Leitstrukturen **14d** und **14e** verglichen.

Substanz	IC <sub>50</sub> -Wert ( $\mu\text{M}$ )
	hP1-1
<b>17a</b>	>1000
<b>17b</b>	>> 1000
<b>18</b>	>> 1000
<b>19</b>	> 1000
<b>20</b>	> 1000
<b>14d</b> <sup>[50]</sup>	15 $\pm$ 4
<b>14e</b> <sup>[50]</sup>	98 $\pm$ 12
<b>14f</b>	267 $\pm$ 103

**Tab. 13:** Übersicht über die Hemmung des GST-Isoenzym hP1-1 durch verschiedene Phosphono-Analoga des GSH

Wie bereits bei hM1-1 beobachtet, vermag keiner der neuen Phosphono-Analoga des Glutathions das Isoenzym hP1-1 in Konzentrationen unterhalb des millimolaren Bereiches zu hemmen. Auch hier ist der Phosphonsäurediester **14d** mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 15  $\mu\text{M}$  der potenteste Inhibitor unter den Phosphono-Analoga. In der Folge über den Glycyl-Methylester **14e** zum Glycyl-Ethylester **14f** nimmt die Hemmwirkung weiter ab, bleibt aber immer noch mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 98 bzw. 267  $\mu\text{M}$  weit unterhalb des millimolaren Bereiches.

### 3.3 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die hier untersuchten Verbindungen treten entsprechend ihrer strukturellen Gegebenheiten mit verschiedenen GST-Isoenzymen in unterschiedlicher Weise in Wechselwirkung. Tab. 14 fasst die Selektivität der getesteten Verbindungen auf die untersuchten GST-Isoenzyme zusammen. Dazu wurde der größte IC<sub>50</sub>-Wert einer Substanz durch deren IC<sub>50</sub>-Wert bezogen auf das jeweilige Isoenzym geteilt. Wurden zwei IC<sub>50</sub>-Werte oberhalb von 1000 µM dividiert, so wurde das Selektivitätsverhältnis gleich eins gesetzt, da oberhalb dieses Konzentrationsbereich Selektivitäten nicht aussagekräftig sind.

Für die Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes eines Inhibitors wurde die gemessene Aktivität in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration an folgende hyperbole Funktion gefittet<sup>[112]</sup>:

$$\frac{V_0}{V_I} = \frac{IC_{50}}{IC_{50} + [I]}$$

mit V<sub>0</sub> = Aktivität ohne Inhibitor;

V<sub>I</sub> = Aktivität in Anwesenheit des Inhibitors und

[I] = Konzentration des Inhibitors

Substanz	hA1-1	pA1-1	hM1-1	pM1-1	hP1-1
<b>17a</b>	> 84	1	1	1	1
<b>17b</b>	nb	1	nb	1	1
<b>18</b>	> 2.2	1	1	> 2.8	1
<b>19</b>	1	1	1	1	1
<b>20</b>	> 1.6	1	1	1	1
<b>14d</b>	4	1	13	50	4
<b>14e</b>	1	nb	2.1	nb	1.5
<b>14f</b>	nb	25	nb	15	1

**Tab. 14:** Selektivität der getesteten Verbindungen auf verschiedene GST-Isoenzyme vom Menschen und vom Schwein; nb = nicht bestimmt

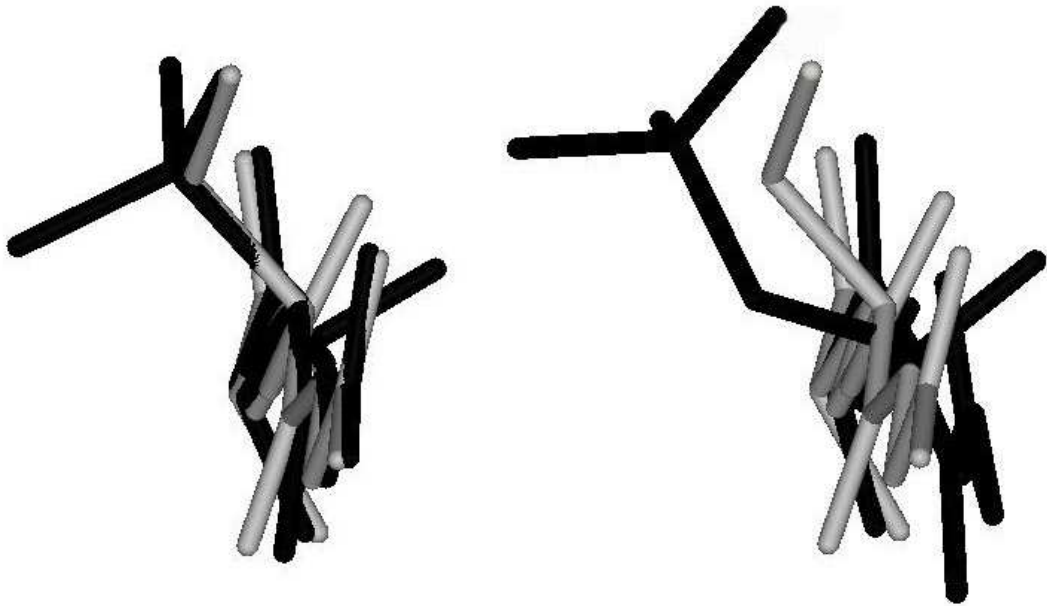
Wie Tab. 14 zu entnehmen ist, weist **17b** innerhalb der untersuchten Isoenzyme keine Selektivität auf. Dem entgegengesetzt hemmt der seitenkettenverlängerte Phosphonsäurediester **17a** das Isoenzym hA1-1 in 84fach geringerer Konzentration als die anderen untersuchten GST-Isoenzyme. Auch der retro-inverse Phosphonsäurediester **18** zeigt eine Selektivität auf hA1-1, wenn auch nicht so stark ausgeprägt wie **17a**. Zusätzlich hemmt **18** aber auch das Isoenzym pM1-1. Der doppelt retro-inverse Phosphonsäurediester **19** besitzt zu keinem Isoenzym eine besondere Affinität. Das retro-inverse Phosphonsäurediesterfragment **18** bindet wie die Verbindungen **17a** und **19** bevorzugt an das Isoenzym hA1-1.

Der Phosphonsäurediester **14d** wirkt selektiv auf die GST-Isoenzyme der Klasse Mu, während die inhibitorische Wirkung auf Isoenzyme der Klasse Alpha am geringsten ist. Dieses Muster lässt sich auf den Glycyl-Methylester **14e** übertragen, allerdings sind die Selektivitäten nicht so hoch wie bei der freien Säure **14d**. Auch **14e** hemmt das Isoenzym der Klasse Mu am besten und wirkt am schlechtesten auf das Isoenzym der Klasse Alpha. Ein etwas anderes Bild ergibt sich jedoch für den Glycyl-Ethylester **14f**, der zwar auch eine bessere Hemmung des Isoenzym der Klasse Mu als der Isoenzym-Klasse Pi bewirkt, aber noch stärker das Isoenzym der Klasse Alpha hemmt.

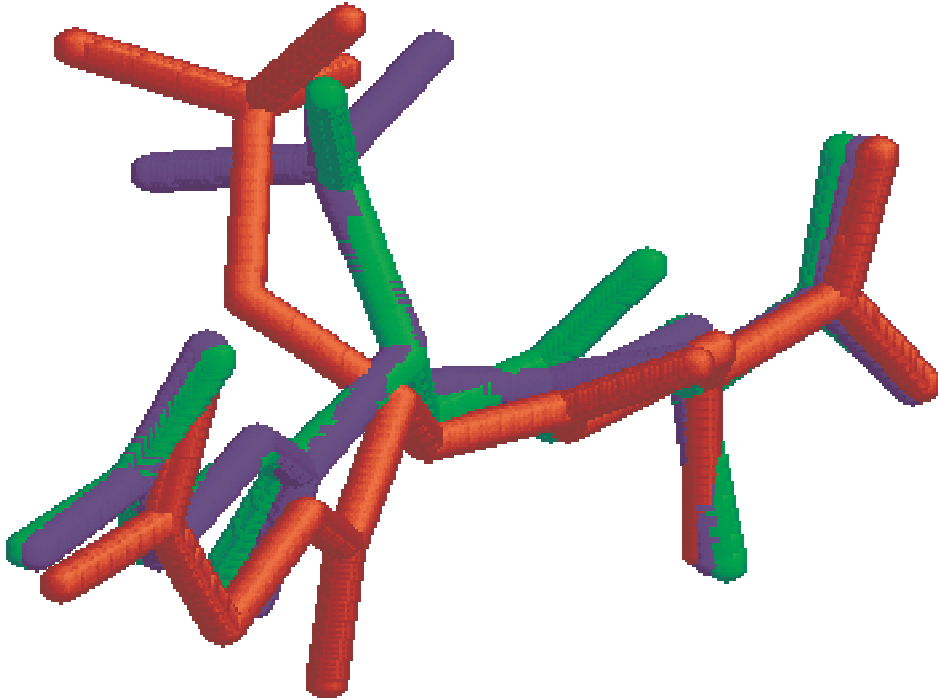
Betrachtet man nun sowohl die Selektivitäten als auch die absoluten  $IC_{50}$ -Werte zusammen mit den vorher diskutierten Kristallstrukturen, so ergeben sich folgende Struktur-Wirkungsbeziehungen:

Beim seitenkettenverlängerten Phosphonsäurediester **17a** stimmt die sterische Konformation völlig mit der des GSH überein, was bei der Darstellung der bisherigen Phosphono-Analoga nicht möglich war und die Wechselwirkung mit dem Enzym entscheidend verbessern sollte. Durch die Seitenkettenverlängerung jedoch rückt der elektronenarme, positivierte Phosphor in die Nähe der entsprechenden Stelle des elektronenreichen Schwefels des Glutathions. In Abb. 14 und Abb. 15 wird die räumliche Anordnung der Verbindungen **14d**, **17a** und des Glutathions (**1**) dargestellt.





**Abb. 14:** Vergleich zwischen den geometrieoptimierten Strukturen (AM1-Rechnung, voroptimiert mit MM2, CS Chem3D<sup>®</sup> 8.0) der Verbindungen **14d** und GSH (links) und **17a** und GSH (rechts). GSH ist grau dargestellt und die Phosphonsäurediester **14d** und **17a** sind schwarz dargestellt. Zur besseren Übersicht sind die Alkylsubstituenten an der Phosphonsäure-Gruppe nicht mit abgebildet.



**Abb. 15:** Vergleich der 3D-Strukturen der Phosphonsäurediester **14d** (blau), **17a** (rot) und GSH (grün)

Der Sauerstoff der Phosphonsäurediester-Gruppe aus **14d** kann genau die Position des Schwefels aus dem Glutathion einnehmen, und die Alkyl-Ketten des Phosphonsäurediesters können mit der H-Site die gleichen Wechselwirkungen eingehen wie Glutathion-*S*-Konjugate. Im Gegensatz dazu ist beim seitenkettenverlängerten Phosphonsäurediester **17a** nur eine Annäherung des Sauerstoffs der Phosphonsäurediester-Gruppe an die Schwefelposition möglich. Dies gelingt allerdings lediglich, wenn der Backbone-Bereich etwas verdreht wird. Der seitenkettenverlängerte Phosphonsäurediester benötigt somit mehr Platz in der Bindungstasche, und die Wechselwirkungen der Alkyl-Substituenten der Phosphonsäureester-Gruppe mit der H-Site könnten daher verringert sein. Genau diesen benötigten vergrößerten Platzbedarf scheint das Isoenzym der Klasse hA1-1 bieten zu können. Durch die im Vergleich zu den anderen Isoenzymen schwächeren Wechselwirkungen an den Säureenden des Glutathions scheint eine bessere Möglichkeit der Bindung auch von strukturabgewandelten GSH-Analoga möglich zu sein. Die doppelte Stabilisierung der Thiol-Funktion über Tyr9 und Arg15 erlaubt scheinbar auch eine Wechselwirkung zu etwas weiter entfernten Elektronendonoren, wie den Sauerstoffen der Phosphonsäureester-Gruppe der Verbindung **17a**.

Bei allen anderen untersuchten GST-Isoenzymen fehlt diese Toleranz für die Seitenkettenverlängerung und **17a** kann keine ausreichende Wechselwirkung mit den anderen Enzymen eingehen.

Der retro-inverse Phosphonsäurediester **18** bindet durchgehend schlechter an alle Isoenzyme als die Leitstruktur **14d**. Schon eine einfache Invertierung senkt offenbar die Wechselwirkungen zu dem Enzym deutlich. Eine Hemmwirkung zeigt die Substanz an dem Isoenzym hA1-1, was auch hier durch die Toleranz des Isoenzym für Strukturänderungen im Backbone-Bereich erklärt werden kann. Vermutlich kann sich der Wirkstoff so in die G-Site legen, dass die Wechselwirkungen für eine Hemmwirkung ausreichen. Stabilisierend kommt die ungehinderte Wechselwirkung der Alkyl-Gruppe aus der Phosphonsäurediester-Funktion mit der H-Site hinzu. Sowohl das Isoenzym hM1-1 als auch hP1-1 lassen eine solche Wechselwirkung nicht zu. Der Anstieg der Hemmwirkung auf das Isoenzym pM1-1 kann mangels vorhandener Kristallstruktur nicht befriedigend erklärt werden.

Der doppelt retro-inverse Phosphonsäurediester **19** zeigt auf keines der

untersuchten Isoenzyme inhibitorische Wirkung. Offensichtlich ist die doppelte Invertierung am Backbone des Inhibitors zu ungünstig für die Wechselwirkungen innerhalb der G-Site. Diese Aussage wird durch die Arbeit von Chen *et al.*<sup>[113]</sup> gestützt, die eine Umsetzung von doppelt retro-inversem Glutathion (rGSH) durch GST-Isoenzyme aus der Rattenlunge als alternatives Cosubstrat untersuchten. Zwar treffen die Autoren die Aussage, dass rGSH ein alternatives Cosubstrat für die Enzyme sei, aber sie stellten eine 72 bzw. 23fach schlechtere Umsetzungsrate des rGSH durch die Isoenzyme rM3-3 bzw. rM4-4 fest. Die Autoren ziehen daraus die Schlussfolgerung, dass die Orientierung der Amidbindungen des Glutathions zwar wichtig, jedoch nicht essentiell für die Cosubstraterkennung sei.

Auch das retro-inverse Phosphonsäurediesterfragment **20** bindet schlechter an die GST-Isoenzyme als die Leitstruktur **14d**. Allerdings ist hier eine Betrachtung erschwert, da zum einen die invertierte Amidbindung zu einer Abstoßung bzw. erschwerten Wechselwirkung führen kann. Andererseits kann aber auch die ausbleibende Bindung durch den fehlenden Glycin-Rest für die fehlende Hemmwirkung verantwortlich sein. Da der IC<sub>50</sub>-Wert von **20** mit 630 µM schlechter ist als der IC<sub>50</sub>-Wert des retro-inversen Phosphonsäurediesters **18** mit 454 µM, der über den Glycin-Rest verfügt, sind vermutlich beide Effekte daran beteiligt.

Grundsätzlich lässt sich beobachten, dass die in dieser Arbeit dargestellten Phosphono-Analoga des GSH **17a**, **18**, **19** und **20** mit dem Isoenzym hA1-1 die beste Wechselwirkung eingehen. Im Gegensatz dazu ist die Hemmwirkung von **14d** für das Isoenzym der Klasse Mu verbessert. Das führt zu dem Schluss, dass das Isoenzym hA1-1 am tolerantesten gegenüber Änderungen des GSH-Gerüsts ist, während strukturelle Variationen des GSH-Analogons bei anderen Isoenzymen zu einer drastischen Schwächung der Bindung führen.

Die Glycyl-veresterten Derivate **17b**, **14e** und **14f** wirken bis auf eine Ausnahme schlechter als die dazugehörigen freien Säuren **17a** und **14b**. Die schlechtere inhibitorische Wirkung der Ester entspricht auch den Erwartungen, da die Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen mit einem Carboxylat-Anion naturgemäß fester ist als mit einer Carbonsäureester-Gruppe.

Einzig der Glycyl-Ethylester **14f** hemmt mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 10.7 µM das Isoenzym pM1-1 deutlich besser als die freie Säure **14d** mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 61

$\mu\text{M}$ . Eine denkbare Erklärung wäre eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen einem Bereich des Enzyms außerhalb der G-Site und der Ethyl-Gruppe der Ester-Funktion.

### 3.4 ZUSAMMENFASSUNG

Die inhibitorische Wirkung der neu dargestellten Phosphono-Analoga ist abhängig von der Art der Abänderung des GSH-Grundgerüsts. Je weiter man sich davon entfernt, desto schlechter wird die Wechselwirkung zum Enzym.

So wirkt Verbindung **19**, bei der beide Amidbindungen im Vergleich zum Glutathion invertiert sind, erst in sehr hohen Konzentrationen im millimolaren Bereich auf die untersuchten Isoenzyme der Klassen Alpha, Mu und Pi.

Eine bessere Interaktion stellt man beim retro-inversen Phosphonsäurediester **18** fest, bei dem nur noch eine Amidbindung invertiert ist. Die Verbindung wirkt vor allem auf die Isoenzyme hA1-1 und pM1-1. Jedoch werden auch hier im Vergleich zum Phosphono-Analogen **14d**, dessen Backbone identisch mit dem des Glutathions ist, deutlich höhere Konzentrationen für eine inhibitorische Wirkung benötigt.

Das retro-inverse Phosphonsäurediesterfragment **20** wirkt erst in höheren Konzentrationen als Verbindung **18**, da hier zusätzlich zur invertierten Amidbindung die Wechselwirkung über den nicht vorhandenen Glycin-Rest fehlt.

Der potenteste Wirkstoff der neu dargestellten Phosphono-Analoga ist der seitenkettenverlängerte Phosphonsäurediester **17a**. In dieser Verbindung ist der Backbone-Bereich identisch mit Glutathion und nur die den Phosphonsäurediester tragende Seitenkette wurde im Vergleich zum Phosphono-Analogen **14d** um eine Methylene-Gruppe verlängert. **17a** wirkt mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $11.9 \mu\text{M}$  hoch selektiv auf das Isoenzym hA1-1. Die Besonderheit des Isoenzym hA1-1 ist, dass zwei Aminosäuren (Tyr9 und Arg15) mit dem Schwefel des Glutathions eine Wasserstoffbrücken-Bindung eingehen können. Die Aminosäuren sind offensichtlich so flexibel, dass auch der etwas weiter entfernte Sauerstoff aus der Phosphonsäurediester-Gruppe der Verbindung **17a** zur Stabilisierung des Enzym-Inhibitor-Komplexes herangezogen werden kann.

Bis auf eine Ausnahme haben die Verbindungen **17b**, **14e** und **14f** durch die

verringerte Wechselwirkung des Enzyms mit der Ester-Funktion höhere  $IC_{50}$ -Werte als die dazugehörigen freien Säuren **17a** und **14b**. Der Glycyl-Ethylester **14f** hemmt das Isoenzym pM1-1 deutlich besser als die freie Säure **14d**. Dies könnte auf eine hydrophobe Wechselwirkung der Ethyl-Gruppe aus dem Glycyl-Ester mit dem Enzym hindeuten.

### 4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

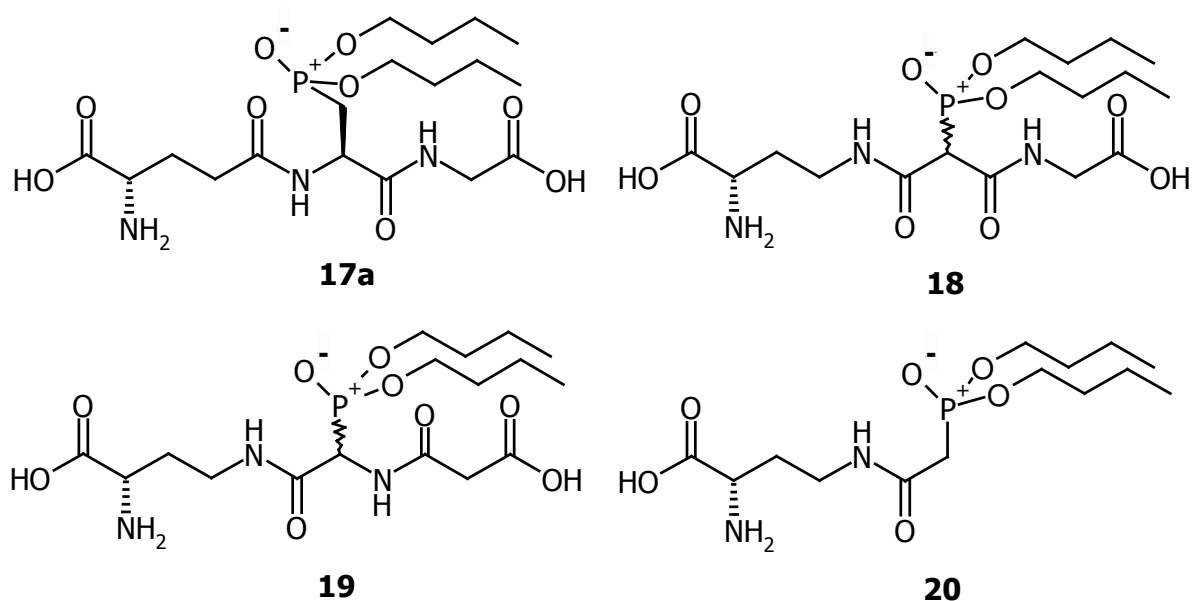
---

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stand die Entwicklung neuer Substanzen zur Hemmung von Glutathion S-Transferasen. Als Vorbild diente dabei das Wirkprinzip der von Kunze bereits dargestellten Phosphono-Analoga. Diese Verbindungen besitzen eine Phosphonsäurediester-Funktion statt der  $\text{CH}_2\text{-SH}$ -Gruppe des Glutathions und imitieren somit ein Schwefel-Konjugat des GSH. Dabei bindet der Backbone-Bereich der Phosphono-Analoga an die G-Site des Enzyms, während die Alkyl-Gruppen der Phosphonsäurediester-Funktion zusätzlich mit der H-Site wechselwirken können. Das Zusammenwirken beider Bindungsmöglichkeiten sorgt für eine hohe Affinität zum Enzym.

Die neu dargestellten Verbindungen stellen eine Abwandlung dieser Phosphono-Analoga dar und erschließen vier neue Substanzklassen mit unterschiedlichen strukturellen Voraussetzungen:

- Im seitenkettenverlängerten Phosphonsäurediester **17a** ist der Abstand zwischen der Phosphonsäure-Gruppe und dem  $\text{C}^\alpha$ -Atom der zentralen Aminosäure gegenüber den bisherigen Phosphono-Analoga um ein Kohlenstoffatom vergrößert.
- Der retro-inverse Phosphonsäurediester **18** ist im Vergleich zum Phosphonsäurediester an der Glutamyl-Cysteinyl-Amidbindung invertiert.
- Den doppelt retro-inversen Phosphonsäurediester **19** kennzeichnet die Invertierung beider Peptidbindungen.
- Das retro-inverse Phosphonsäurediesterfragment **20** ist an der Glutamyl-Cysteinyl-Amidbindung invertiert und besitzt keinen Glycin-Rest.

Abb. 16 gibt eine Übersicht über die vier in dieser Arbeit neu erschlossenen Substanzklassen der Phosphono-Analoga des Glutathions.



**Abb. 16:** In dieser Arbeit neu dargestellte Substanzklassen von Phosphono-Analoga des Glutathions

Zur Darstellung der verschiedenen neuen Phosphono-Analoga wurden, den jeweiligen Verbindungen entsprechend, neue Synthesestrategien entwickelt.

Für die Synthese des seitenkettenverlängerten Phosphonsäurediesters **17a** wurde das Tripeptid Glu-Ser-Gly durch Peptidsynthese in Lösung dargestellt. Anschließend konnte erstmalig die Phosphonsäurediester-Funktion über Halogenierung der Hydroxy-Funktion mit anschließender Michaelis-Arbuzov-Reaktion in das Molekül eingeführt werden. Diese Reaktionsfolge ist der von Smith *et al.* [55] und Patel *et al.* [56] beschriebenen Darstellungsweise von Phosphono-Analoga des Serins über 3-Amino-2-Oxetanone überlegen, da die neue Methode nicht auf intramolekulare Serin-Ester beschränkt ist. Es können verschiedene Ester und sogar Serin-Amide umgesetzt werden.

Der seitenkettenverlängerte Phosphonsäurediester **17a** stellt einen völlig neuen Ansatz als GST-Inhibitor dar, da der Abstand zwischen der Phosphonsäure-Gruppe und dem C<sup>α</sup>-Atom der zentralen Aminosäure vergrößert wurde. Die derart veränderte räumliche Anordnung der Sauerstoffatome aus der Phosphonsäure-Gruppe in Bezug auf das Aminosäure-Rückgrat führen zu veränderten Wechselwirkungen mit der G-Site der GST-Isoenzyme. Ein weiterer Unterschied zu bereits bestehenden Phosphono-Analoga ist die Stereochemie am C<sup>α</sup>-Atom der zentralen Aminosäure. Während bisher nur eine racemische Aminosäure eingesetzt werden konnte und die

entstehenden diastereomeren Phosphono-Analoga zur Testung eingesetzt wurden, konnte die Synthese des seitenkettenverlängerten Phosphonsäurediesters **17a** derart durchgeführt werden, dass das entstandene Peptid aus stereochemischer Sicht identisch mit dem Glutathion ist.

Der synthetisierte seitenkettenverlängerte Phosphonsäurediester **17a** erweist sich mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 11.9  $\mu$ M als sehr potenter Inhibitor und wirkt zudem selektiv auf das GST-Isoenzym hA1-1. Somit stellt er eine sehr gute Ergänzung zu den bereits verfügbaren Inhibitoren dar, die besonders potent Isoenzyme der Klasse Mu hemmen.

Auch die peptidomimetischen Phosphono-Analoga des Glutathions stellen einen neuen Ansatz als GST-Inhibitoren dar. Hier stand vor allem die Entwicklung und Testung von Verbindungen, die die notwendige Stabilität in biologischen Systemen aufweisen, im Vordergrund. Insbesondere die enzymatische Hydrolyse von Peptidbindungen sollte durch Variation des Rückgrates beeinflusst werden.

Die Synthese des einfach retro-inversen Phosphonsäurediesters **18** beschäftigt sich ausführlich mit dem Problem der Darstellung und Umsetzung des 2-(Dialkoxyphosphinyl)malonsäurediesters. Der Aufbau einer Amidbindung, ausgehend von dem orthogonalen 2-(Dialkoxyphosphinyl)malonsäurediester, führte wegen der zwischenzeitlichen Decarboxylierung nur in sehr schlechten Ausbeuten zum Zielprodukt. Hier konnte die Synthese durch Darstellung eines 2-(Dialkoxyphosphinyl)essigsäureamids mit anschließender C-Acylierung stark verbessert werden. Durch weitere Amiddarstellung zu **18** gelang erstmalig die Synthese eines retro-inversen Phosphono-Analogons des Glutathions. Es konnte durch Testung mit verschiedenen GST-Isoenzymen gezeigt werden, dass die Invertierung der Glutanyl-Cystein-Peptidbindung zu einer schlechteren Wechselwirkung mit der G-Site führt und es so zu einer verschlechterten inhibitorischen Wirkung im Vergleich zu **14d** kommt. Allerdings zeigt sich auch bei dieser Verbindung in Bezug auf humane Isoenzyme eine erhöhte Selektivität auf hA1-1.

Die Darstellung eines doppelt retro-inversen Phosphonsäurediesters (**19**) erfolgte durch Anwendung der Methoden aus der Peptidsynthese in Lösung. Dieses peptidomimetische Phosphono-Analogon ist allerdings im Rückgrat-Bereich im



Vergleich zum Glutathion zu sehr verändert, um noch ausreichend bindende Wechselwirkungen mit der G-Site ausbilden zu können.

Das retro-inverse Phosphonsäurediesterfragment (**20**) wurde durch Amidbildung aus 2,4-L-Diaminobuttersäure und 2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)essigsäure dargestellt. Dieses Fragment zeigt bereits Ansätze für eine Wechselwirkung mit der G-Site des Isoenzym hA1-1. Allerdings ist die Hemmwirkung nicht sehr stark ausgeprägt, da vor allem der Glycin-Rest insbesondere das Carboxylat-Anion fehlen.

Dieses Fragment bietet jedoch einen Ansatzpunkt für weitere Synthesen zur Verlängerung. Eine weitere Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid unter den für **18** verwendeten Bedingungen der C-Acylierung scheiterte. So könnte eine C-Acylierung oder C-Alkylierung zu vielversprechenden Verbindungen führen, deren Hemmwirkung erhöht werden kann, wenn die eingeführten Gruppen über eine endständige Carboxylat-Funktion verfügen.

Zur Darstellung von Substanzen, deren Membrangängigkeit gegenüber den bisher beschriebenen Verbindungen **14d** und **17a** erhöht ist, wurden Substanzen synthetisiert, die am Glycin-Rest verestert sind. Die Synthese dieser Glycyl-Ester **14f** und **17b** folgte dabei der Darstellung der jeweiligen freien Säure.

Durch die fehlende Wechselwirkung zwischen Glycin-Carboxylat und Enzym ist die Affinität der dargestellten Ethylester zu den GST-Isoenzymen gegenüber den freien Säuren generell herabgesetzt. Allerdings stellt der Glycyl-Ethylester **14f** eine Ausnahme dar, da er das Isoenzym pA1-1 deutlich besser hemmt als die freie Säure **14d**.

Die in dieser Arbeit entwickelten Verbindungen und deren Testergebnisse stellen einen Ausgangspunkt für eine Reihe weiter zu behandelnder Aspekte dar.

Für die bisher dargestellten Phosphono-Analoga besteht die Möglichkeit der Wirkungsverbesserung durch Änderung des Phosphonsäureesters. Die potentesten Inhibitoren aus der Substanzklasse der Glutathion-Konjugate besitzen *S*-Hexyl-, *S*-Nonyl- oder *S*-Benzyl-Gruppen. Entsprechend könnte eine Verlängerung der Alkylkette der Phosphonsäure-*n*-butylester eine weitere Wirkungssteigerung zur Folge haben.

Zur Klärung der Frage, inwieweit die sterische Information zur Affinität zum Enzym beiträgt, sind zwei Ansätze denkbar. Zum einen ist die Trennung der

diastereomeren Phosphono-Analoga durch geeignete chromatographische Verfahren durchführbar. Eine andere Möglichkeit eröffnet die Nachsynthese des seitenkettenverlängerten Phosphonsäurediesters ausgehend von D-Serin und racemischem D/L-Serin. Der entstehende Affinitätsverlust zum Isoenzym hA1-1 im Vergleich zu **17a** sollte ebenfalls Rückschlüsse auf den Stellenwert der Stereochemie am C<sup>α</sup>-Atom der zentralen Aminosäure zulassen.

Weiterhin sollte für die Entwicklung weiterer Inhibitoren die Möglichkeit zur konfirmativen Fixierung in Betracht gezogen werden. Um eine Bindung zum Enzym einzugehen, muss ein Substrat in der benötigten Konformation vorliegen, die jedoch nicht der energetisch günstigsten entsprechen muss. Daher sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass eine Verbindung in der für die Wechselwirkung mit dem Enzym günstigsten Konformation vorliegt, mit der Anzahl der Freiheitsgrade, die sie besitzt. Der Vorteil des Glutathions ist vermutlich die hohe Konzentration innerhalb der Zelle, die zu einer ausreichenden Population der günstigsten Konformation führt. Anhand der vorliegenden Kristallstrukturen könnten die benötigten Konformationen analysiert und im Sinne des Molecular Modelling auf ein fixiertes Phosphono-Analogen übertragen werden. Durch diese Fixierung der Konformation sollte dann eine bessere Affinität zu der G-Site des Enzyms stattfinden können. Für eine geeignete Untersuchung der benötigten Konformation wären Kristallstrukturen von GST-Isoenzymen im Komplex mit den Phosphono-Analoga unabdingbar.

Zur Beurteilung der hier dargestellten Verbindungen hinsichtlich ihres Einsatzes als Modulatoren der GST-Aktivität sind Untersuchungen an Zell-Linien unerlässlich. Die Frage der Aufnahme der neu dargestellten Phosphono-Analoga in Zellen sollte anhand geeigneter Zell-Linien überprüft werden.

Die Stabilität der Verbindungen gegenüber  $\gamma$ -Glutamyl Transferasen sollte ebenso untersucht werden, wie die Frage der Freisetzung der freien Säuren aus den hier entwickelten Glycyl-Estern durch Esterasen.

## 5 EXPERIMENTELLER TEIL

---

### 5.1 ALLGEMEINE HINWEISE

Die für die Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen verwendeten Geräte und Materialien sind in der folgenden Liste aufgeführt:

#### **Elementaranalysen:**

Institut für Anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (CHNS-Autoanalysator der Fa. HEKAtech)

#### **IR-Spektroskopie:**

Perkin-Elmer FTIR 16 PC.

#### **NMR-Spektroskopie:**

$^1\text{H}$ -NMR: Bruker ARX 300 (Messfrequenz: 300.13 MHz),  $^{13}\text{C}$ -NMR: Bruker ARX 300 (Messfrequenz: 75.47 MHz). Innerer Standard: Tetramethylsilan (TMS). Es werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, dd = doppeltes Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br = verbreitertes Signal, J = Kopplungskonstante, Bzl = Benzyl, Dab = Diaminobuttersäure, Glu = Glutamin, Gly = Glycin, Ser = Serin, Ph = Phenyl.

#### **Massenspektroskopie:**

Hewlett-Packard MS-Engine 5989A.

#### **Schmelzpunkte:**

Schmelzpunktapparatur Büchi 510. Die Angabe der Schmelzpunkte erfolgt unkorrigiert.

#### **Chemikalien:**

Alle verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim), Fluka (Neu-Ulm) und Merck (Darmstadt) bezogen und besaßen

mindestens Synthesequalität. Glycin-*tert*-butylesterhydrochlorid, Glycinethylesterhydrochlorid, *N*-Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester und *N* <sup>$\alpha$</sup> -*tert*-Butoxycarbonyl-L-2,4-diaminobuttersäure-*tert*-butylesterhydrochlorid wurden von Fa. Bachem Biochemica GmbH (Heidelberg) geliefert. Für die präparative Säulenchromatographie wurden nach Organikum<sup>[114]</sup> gereinigte Lösungsmittel eingesetzt. Wurden wasserfreie Lösungsmittel eingesetzt, so erfolgte die Trocknung ebenfalls nach Organikum<sup>[114]</sup>.

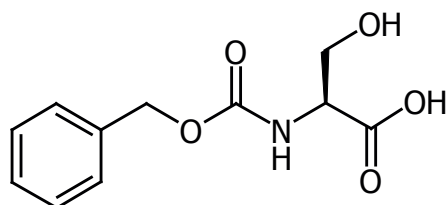
### Präparative Säulenchromatographie:

Es wurden handelsübliche Glassäulen verwendet und mit Kieselgel 60 der Fa. Merck unter Normaldruck gepackt (ca. 100 g Packungsmaterial pro 1 g Rohprodukt). Die Flussrate betrug im allgemeinen ca. 1 cm/min.

## 5.2 SYNTHESSEN

### 5.2.1 SEITENKETTENVERLÄNGERTER PHOSPHONSÄUREDIESTER

#### 5.2.1.1 *N*-BENZYLOXYCARBONYL-L-SERIN (**27**)<sup>[115]</sup>



Zu 400 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat Lösung wurden 10.5 g (0.1 mol) L-Serin (**28**) gegeben und unter kräftigem Rühren 19.8 ml (0.14 mol) Chlorameisensäurebenzylester hinzuge tropft. Nach 4h Rühren bei Raumtemperatur wurde die trübe Lösung dreimal mit je 100ml Ether gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 20ml konz. Salzsäure versetzt und der entstandene Feststoff abgesaugt. Das Filtrat wurde dreimal mit je 100ml Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der übriggebliebene Feststoff wurde mit der ersten Fraktion vereint.

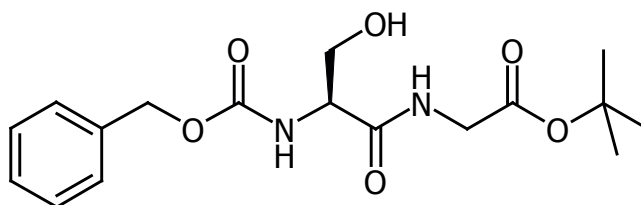
Ausbeute: 21.1 g (88%) farbloser Feststoff.

Schmp.: 117-119°C (Lit: 115-116°C<sup>[115]</sup>)

**<sup>1</sup>H-NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  in ppm = 3.68 (d,  $^3J_{\text{H,H}}=4.9$  Hz, CH<sub>2</sub>OH, 2H); 4.02-4.11 (m, CH, 1H); 4.86 (br s, CH<sub>2</sub>OH, 1H); 5.05 (s, OCH<sub>2</sub>Ph, 2H); 7.30-7.40 (m, Ph und NH, 6H); 12.65 (br s, COOH, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (75.48 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  in ppm = 56.7 (C <sub>$\alpha$</sub> ); 61.4 (C <sub>$\beta$</sub> ); 65.5 (OCH<sub>2</sub>Ph); 127.7, 127.8, 128.4 (C-2', C-3', C-4'); 137.0 (C-1'); 156.1 (NHCOO); 172.2 (COOH).

### 5.2.1.2 *N*-(*N*-Benzoyloxycarbonyl-L-Seryl)glycin-*tert*-butylester (**29A**)<sup>[116]</sup>



3.3 g (20 mmol) Glycin-*tert*-butylesterhydrochlorid wurde in 80 ml Dichlormethan suspendiert und im Eisbad gekühlt. Es wurde so lange trockener Ammoniak eingeleitet, bis kein Ammoniumchlorid mehr ausfiel. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat vorsichtig eingeeengt.

Das so erhaltene Öl wurde mit 4.8 g (20 mmol) *N*-Benzoyloxycarbonyl-L-serin (**27**) vereinigt und in 50 ml Acetonitril suspendiert. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C gekühlt und mit 3.0 g (22 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol und 4.5 g (22 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt.

Der Ansatz wurde noch 1 h bei 0°C und 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat eingeeengt, in 70ml Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit 1 N Natriumhydrogensulfat-Lösung und einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen.

Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und kurze Zeit bei -20°C aufbewahrt. Der flüssige Überstand wurde vom entstandenen Feststoff getrennt und verworfen. Der Rückstand wurde in Dichlormethan gelöst und durch Kieselgel-

Säulenchromatographie (Eluent: Ethylacetat/Cyclohexan 7:3) gereinigt.

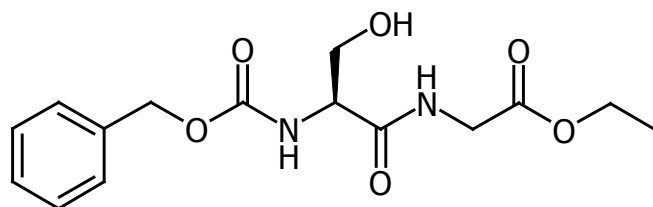
Ausbeute: 3.2 g (45%) farbloses Öl.

**IR (KBr):**  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 699 (=C-H); 1068 (O-C); 1730 (C=O); 2987 (C-H); 3349 (N-H).

**$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  in ppm = 1.61 (s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 9H); 3.49-3.67 (m, Gly-CH<sub>2</sub>, 2H); 3.72 (dd,  $^2J_{\text{H,H}}=2.45$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}}=5.8$  Hz, Ser-C <sub>$\beta$</sub> H<sub>2</sub>, 2H); 4.06-4.16 (m, Ser-C <sub>$\alpha$</sub> H, 1H); 4.82 (t,  $^3J_{\text{H,H}}=5.8$  Hz, OH, 1H); 5.04 (s, OCH<sub>2</sub>Ph, 2H), 7.20 (d,  $^3J_{\text{H,H}}=8.21$  Hz, Ser-NH, 1H); 7.29-7.45 (m, Ph, 5H); 8.17 (t,  $^3J_{\text{H,H}}=5.64$  Hz, Gly-NH, 1H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75.48 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  in ppm = 27.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 41.4 (Gly-CH<sub>2</sub>); 57.2 (Ser-C <sub>$\alpha$</sub> ); 61.7 (Ser-C <sub>$\beta$</sub> ); 65.5 (OCH<sub>2</sub>Ph); 80.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 127.7, 127.8, 128.3 (C-2', C-3', C-4'); 136.9 (C-1'); 156.6 (NHCOO); 170.5 (COO<sup>t</sup>Bu); 171.4 (CONH).

### 5.2.1.3 *N*-(*N*-Benzyloxycarbonyl-L-Seryl)Glycinethylester (**29B**)<sup>[117]</sup>



2.8 g (20 mmol) Glycinethylesterhydrochlorid wurden in 80 ml Dichlormethan suspendiert und im Eisbad gekühlt. Es wurde so lange trockener Ammoniak eingeleitet, bis kein Ammoniumchlorid mehr ausfiel. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat vorsichtig eingengt.

Das so erhaltene Öl wurde mit 4.8 g (20 mmol) *N*-Benzyloxycarbonyl-L-serin (**27**) vereinigt und in 50 ml Acetonitril suspendiert. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C gekühlt und mit 3.0 g (22 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol und 4.5 g (22 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt.

Der Ansatz wurde noch 1 h bei 0°C und 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat eingengt, in 70 ml Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit 1 N Natriumhydrogensulfat-Lösung und einmal mit

gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen.

Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und kurze Zeit bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Der flüssige Überstand wurde vom entstandenen Feststoff getrennt und verworfen. Der Rückstand wurde in Dichlormethan gelöst und durch Kieselgel-Säulenchromatographie (Eluent: Ethylacetat/Cyclohexan 7:3) gereinigt.

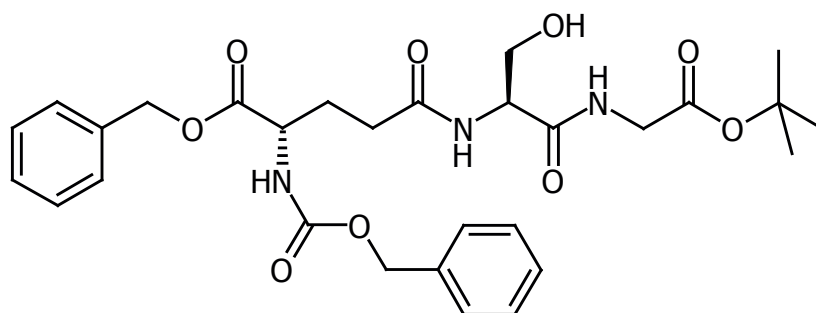
Ausbeute: 2.1 g (32%) farbloses Öl (Lit<sup>[117]</sup>: farbloser Feststoff, Schmp.:  $98-101^{\circ}\text{C}$ )

**IR (KBr):**  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 692 (=C-H); 1072 (O-C); 1736 (C=O); 2985 (C-H); 3345 (N-H).

**$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 1.21 (t,  $^3J_{\text{H,H}}=7.1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 3H); 3.47 (br s, OH, 1H); 3.66-3.72 (m+m, Gly- $\text{CH}_2$ +Ser- $\text{C}_{\beta}\text{H}_2$ , 4H); 4.03 (q,  $^3J_{\text{H,H}}=7.1$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ , 2H); 4.31 (br s, Ser- $\text{C}_{\alpha}\text{H}$ , 1H); 5.11 (s,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ , 2H), 6.04 (d,  $^3J_{\text{H,H}}=7.2$  Hz, Ser-NH, 1H); 7.26 (br s, Gly-NH, 1H); 7.29-7.33 (m, Ph, 5H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75.48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 14.1 ( $\text{CH}_3$ ); 41.3 (Gly- $\text{CH}_2$ ); 52.5 ( $\text{OCH}_2$ ); 55.9 (Ser- $\text{C}_{\alpha}$ ); 62.9 (Ser- $\text{C}_{\beta}$ ); 67.3 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ); 128.1, 128.3, 128.6 (C-2', C-3', C-4'); 136.0 (C-1'); 156.6 (NHCOO); 170.5 (COOEt); 171.4 (CONH).

#### 5.2.1.4 *N*-[*N*-(*N*-Benzyloxycarbonyl- $\text{O}^{\alpha}$ -Benzyl- $\gamma$ -L-Glutamyl)-L-Seryl]-Glycin-*tert*-Butylester (30a)



1.00 g (2.8 mmol) **29a** wurden in 20 ml Methanol gelöst, mit 0.15 g Palladium/Aktivkohle versetzt und 2 h bei 3 atm und Raumtemperatur hydriert.

Die Suspension wurde filtriert, das Filtrat vorsichtig eingeengt, in 50 ml Acetonitril gelöst und mit 1.05 g (2.8 mmol) *N*-Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde sofort auf  $0^{\circ}\text{C}$  gekühlt und mit

0.40 g (3.1 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol und 0.61 g (3.1 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Der Ansatz wurde noch 1 h bei 0°C und 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat eingengt, in 70 ml Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit 1 N Natriumhydrogensulfat-Lösung und einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, eingengt und durch Kieselgel-Säulenchromatographie (Eluent: Ethylacetat/Cyclohexan 7:3) gereinigt.

Ausbeute: 0.60 g (39%) farbloser Feststoff.

Schmp.: 103°C

**IR (KBr):**  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 695 (=C-H); 1056 (O-C); 1744 (C=O); 2973 (C-H); 3321 (N-H).

**<sup>1</sup>H-NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  in ppm = 1.39 (s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 9H); 1.81-1.84 (m, Glu-C<sub>β</sub>H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>, 1H); 2.01-2.03 (m, Glu-C<sub>β</sub>H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>, 1H); 2.27 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=7.6 Hz, Glu-C<sub>γ</sub>H<sub>2</sub>, 2H); 3.50-3.59 (m, Gly-CH<sub>2</sub>, 2H); 3.70 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=5.9 Hz, Ser-C<sub>β</sub>H<sub>2</sub>OH, 2H); 4.09-4.16 (m, Glu-C<sub>α</sub>H, 1H); 4.29-4.35 (m, Ser-C<sub>α</sub>H, 1H); 4.80 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=5.5 Hz, OH, 1H); 5.04 (s, OCH<sub>2</sub>Ph, 2H), 5.13 (s, OCH<sub>2</sub>Ph, 2H); 7.34 (m, Ph, 10H); 7.79 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=7.5 Hz, NH, 1H); 7.89 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=8.2 Hz, NH, 1H); 8.13 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=5.8 Hz, Gly-NH, 1H).

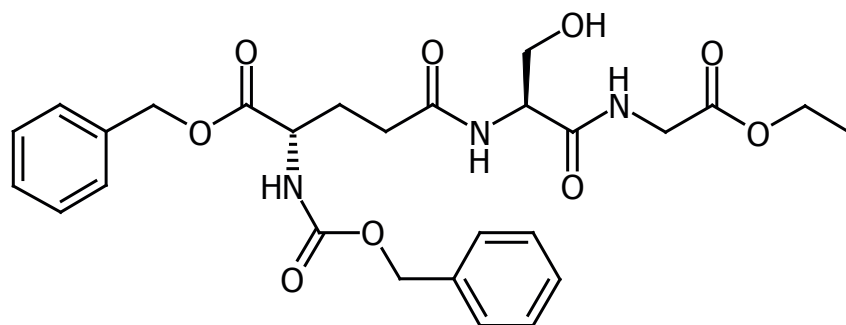
**<sup>13</sup>C-NMR (75.48 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  in ppm = 26.6 (Glu-C<sub>β</sub>); 27.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 31.4 (Glu-C<sub>γ</sub>); 41.4 (Gly-C<sub>α</sub>); 53.6, (Glu-C<sub>α</sub>); 54.9 (Ser-C<sub>α</sub>); 61.7 (Ser-C<sub>β</sub>); 65.5, 65.9 (zwei OCH<sub>2</sub>Ph); 80.6 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 127.7, 127.8, 128.0, 128.2, 128.3, 128.4 (C-2', C-3', C-4' und C-2'', C-3'', C-4''); 135.9, 136.8 (C-1' und C-1''); 156.1 (NHCOO); 168.7 (COO<sup>t</sup>Bu), 170.4 (COOBzl); 171.4, 172.0 (zwei CONH).

**MS (ESI): m/z (%) =** 594 [M+Na<sup>+</sup>] (100), 572 [M+H<sup>+</sup>] (11).

C <sub>29</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> (MW= 571.63):	ber.:	C: 60.93	H: 6.52	N: 7.35
	gef.:	C: 60.57	H: 6.74	N: 7.25



### 5.2.1.5 *N*-[*N*-(*N*-Benzyloxycarbonyl-*O*<sup>α</sup>-Benzyl- $\gamma$ -L-Glutamyl)-L-Seryl]-Glycinethylester (**30b**)



0.91 g (2.8 mmol) **29b** wurden in 20 ml Methanol gelöst, mit 0.15 g Palladium/Aktivkohle versetzt und 2 h bei 3 atm und Raumtemperatur hydriert.

Die Suspension wurde filtriert, das Filtrat vorsichtig eingeeengt, in 50 ml Acetonitril gelöst und mit 1.04 g (2.8 mmol) *N*-Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde sofort auf 0°C gekühlt und mit 0.41 g (3.1 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol und 0.60 g (3.1 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Der Ansatz wurde noch 1 h bei 0°C und 14h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat eingeeengt, in 70 ml Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit 1 N Natriumhydrogensulfat-Lösung und einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen.

Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und durch Kieselgel-Säulenchromatographie (Eluent: Ethylacetat/Cyclohexan 7:3) gereinigt

Ausbeute: 0.30 g (20%) farbloses Öl.

**IR (KBr):**  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 697 (=C-H); 1065 (O-C); 1739 (C=O); 2977 (C-H); 3299 (N-H).

**<sup>1</sup>H-NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  in ppm = 1.19 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=7.1 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 9H); 1.82-2.11 (m, Glu-C<sub>β</sub>H<sub>2</sub>, 2H); 2.27-2.45 (m, Glu-C<sub>γ</sub>H<sub>2</sub>, 2H); 3.54-3.60 (m, Gly-CH<sub>2</sub>, 2H); 3.80 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=5.8 Hz, Ser-C<sub>β</sub>H<sub>2</sub>, 2H); 4.07 (q, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=7.1 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; 2H); 4.10-4.15 (m, Ser-C<sub>α</sub>H, 1H); 4.28-4.35 (m, Glu-C<sub>α</sub>H, 1H); 4.8 (s, OH, 1H); 5.13 (s, OCH<sub>2</sub>Ph, 2H), 5.18 (s, OCH<sub>2</sub>Ph, 2H); 7.31-7.36 (m, Ph, 5H); 7.79 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=7.9 Hz, Glu-NH, 1H); 7.90 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=7.8 Hz, Ser-NH, 1H); 8.22 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=5.9 Hz, Gly-NH, 1H).

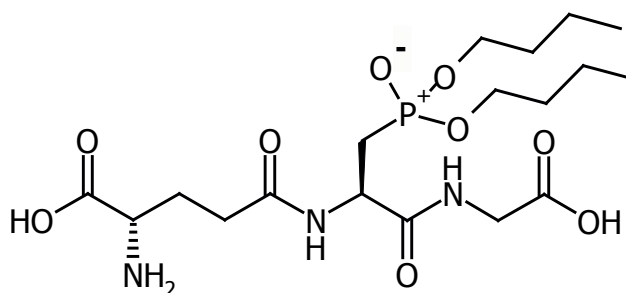
**<sup>13</sup>C-NMR (75.48 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  in ppm = 14.1 (CH<sub>3</sub>); 26.6 (Glu-C<sub>β</sub>); 31.4

(Glu-C<sub>γ</sub>); 41.3 (Gly-C<sub>α</sub>); 53.6 (Glu-C<sub>α</sub>); 54.8 (Ser-C<sub>α</sub>); 61.0 (CH<sub>2</sub>O); 61.7 (Ser-C<sub>β</sub>); 65.4, 65.9 (zwei OCH<sub>2</sub>Ph); 127.6, 127.80, 127.9, 128.1, 128.3, 128.4 (C-2', C-3', C-4' und C-2'', C-3'', C-4''); 135.9, 136.8 (C-1' und C-1''); 156.14 (NHCOO); 168.7 (COOEt); 170.4 (COOBzl); 171.3, 172.0 (zwei CONH).

**MS (ESI): m/z (%) = 544 [M+H<sup>+</sup>] (100).**

C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> (MW= 543.58):	ber.:	C:59.66	H:6.12	N:7.73
	gef.:	C:59.33	H:6.31	N:7.79

### 5.2.1.6 *N*-[(2*S*)-2- $\gamma$ -L-GLUTAMYLAMINO-3-(DI-*n*-BUTOXYPHOSPINYL)-PROPIONYL]GLYCIN (**17A**)



0.60 g (1 mmol) **30a** wurden unter Eiskühlung zu einer Suspension von 0.40 g (2 mmol) Phosphorpentachlorid in 5 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran gegeben und weitere 5 h bei 0°C gerührt. Sodann wurde eine Lösung aus 0.6 ml (2 mmol) Tri-*n*-butylphosphit in 20 ml Toluol zugetropft und der Reaktionsansatz für 2 h bei 110°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der ölige Rückstand in 100 ml Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet.

Das Lösungsmittel wurde i. Vak entfernt, der Rückstand mit 10 ml Methanol und 0.05 g Palladium/Aktivkohle versetzt und 2 h bei 3 atm und Raumtemperatur hydriert.

Die Suspension wurde filtriert, das Filtrat vorsichtig eingengt und anschließend mit 5 ml eisgekühlter TFA bei 0°C für 30 min gerührt. Das Gemisch wurde sodann i. Vak. eingengt und über Kieselgel 60 chromatographiert (Eluent: *n*-Propanol/Eisessig/Wasser 10:5:5).

Ausbeute: 0.25 g (55%) farbloses Öl

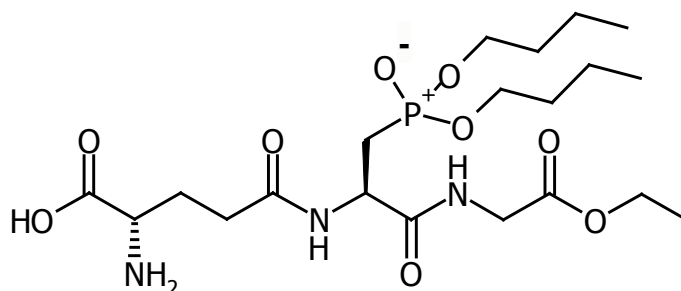
**IR (KBr):**  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 987 (P-O); 1025 (O-C); 1275 (P=O); 1739 (C=O); 2965 (C-H); 3468 (N-H).

**$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  in ppm = 0.91-0.97 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 6H); 1.36-1.48 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 4H); 1.57-1.72 (m,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ , 4H); 1.82-1.88 (m, Glu- $\text{C}_\beta\text{H}_4\text{H}_B$ , 1H); 2.00-2.04 (m, Glu- $\text{C}_\beta\text{H}_A\text{H}_B$ , 1H); 2.25-2.29 (m, Glu- $\text{C}_\gamma\text{H}_2$ , 2H); 2.35 (dd,  $^2J_{\text{H,P}}=16$  Hz und  $^3J_{\text{H,H}}=8$  Hz,  $\text{PCH}_2$ , 2H); 3.62-3.64 (m, Gly- $\text{CH}_2$ , 2H); 3.98-4.12 (m,  $\text{OCH}_2+\text{Glu-C}_\alpha\text{H}$ , 5H); 4.32-4.37 (m,  $\text{PCH}_2\text{CH}$ , 1H); 7.84 (br s, CONH, 1H); 8.13 (br s, Gly-NH, 1H); 8.67 (br s, zwei COOH und  $\text{NH}_2$ , 4H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75.48 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  in ppm = 13.6 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 18.7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 26.4 (Glu- $\text{C}_\beta$ ); 31.5 (Glu- $\text{C}_\gamma$ ); 32.4 ( $\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 41.2 (Gly- $\text{C}_\alpha$ ); 53.6 (Glu- $\text{C}_\alpha$ ); 55.2 ( $\text{PCH}_2\text{CH}$ ); 27.7 (d,  $^1J_{\text{C,P}}=142$  Hz,  $\text{PCH}_2$ ); 66.3 ( $\text{POCH}_2$ ); 171.3, 171.7, 173.1, 173.7 (zwei CONH und zwei COOH).

$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_9\text{P}$ (MW= 467.46):	ber.:	C: 46.25	H: 7.33	N: 8.99
	gef.:	C: 46.51	H: 7.21	N: 9.22

### 5.2.1.7 *N*-[(2*S*)-2- $\gamma$ -L-Glutamylamino-3-(di-*n*-butoxyphosphinyl)-propionyl]glycinethylester (17B)



0.30 g (0.5 mmol) **30a** wurden in 20 ml wasserfreiem Toluol gelöst und auf 70°C erwärmt. Bei dieser Temperatur wurden 0.1 ml (1.0 mmol) Phosphortrichlorid zugetropft und dieser Ansatz für 16 h bei 70°C gerührt. Sodann wurden 0.6 ml (1.0 mmol) Tri-*n*-butylphosphit zugetropft und die Mischung für weitere 2 h bei 70°C gerührt.

Sodann wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der ölige Rückstand in 100 ml Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet.

Das Lösungsmittel wurde i. Vak entfernt, der Rückstand mit 10 ml Methanol und 0.05 g Palladium/Aktivkohle versetzt und 2 h bei 3 atm und Raumtemperatur hydriert.

Die Suspension wurde filtriert, das Filtrat vorsichtig eingengt und über Kieselgel 60 chromatographiert (Eluent: *n*-Propanol/Eisessig/Wasser 10:5:5).

Ausbeute: 19.8 mg (8%) farbloses Öl.

**IR (KBr):**  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 699 (=C-H); 990 (P-O); 1027 (O-C); 1268 (P=O); 1735 (C=O); 2958 (C-H); 3471 (N-H).

**$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  in ppm = 0.84-0.91 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 6H); 1.18 (t,  $^3J_{\text{H,H}}=7.1$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ , 3H); 1.31-1.41 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 4H); 1.51-1.63 (m,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ , 4H); 1.81-1.84 (m, Glu-C $_{\beta}$ H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>, 1H); 1.95-2.00 (m, Glu-C $_{\beta}$ H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>, 1H); 2.27-2.32 (m, Glu-C $_{\gamma}$ H<sub>2</sub>, 2H); 2.31 (m, PCH<sub>2</sub>, 2H); 3.57 (br s, Gly-CH<sub>2</sub>, 2H); 3.68-4.01 (m, POCH<sub>2</sub>+Glu-C $_{\alpha}$ H, 5H); 4.08 (q,  $^3J_{\text{H,H}}=7.1$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ , 2H); 4.25 (br s, PCH<sub>2</sub>CH, 1H); 7.79 (br s, CONH, 1H); 8.13 (br s, Gly-NH, 1H); 8.67 (br s, zwei COOH und NH<sub>2</sub>, 4H).

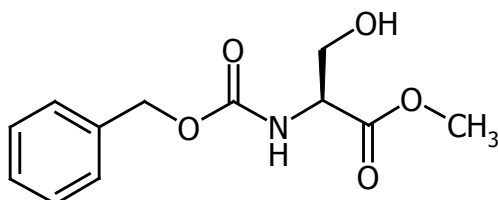
**$^{13}\text{C-NMR}$  (75.48 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  in ppm = 13.4 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 14.1 (18.7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 26.3 (Glu-C $_{\beta}$ ); 27.6 (d,  $^1J_{\text{C,P}}=143$  Hz, PCH<sub>2</sub>); 31.5 (Glu-C $_{\gamma}$ ); 32.4 (POCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 41.3 (Gly-C $_{\alpha}$ ); 53.6 (Glu-C $_{\alpha}$ ); 55.4 (PCH<sub>2</sub>CH); 60.5 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ); 66.3 (POCH<sub>2</sub>); 169.9, 171.1, 171.5, 172.5 (zwei CONH, COOH und COOEt).

**MS (ESI):** m/z (%) = 496 [M+H<sup>+</sup>] (100).

C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> P (MW= 495.51):	ber.:	C: 48.48	H: 7.73	N: 8.48
	gef.:	C: 48.29	H: 7.70	N: 8.52

## 5.2.2 VERSUCHE ZUR DARSTELLUNG VON PHOSPHONSÄUREESTERN ÜBER MICHAELIS-ARBUZOV-REAKTION UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER HALOGENIERUNG VON SERIN-DERIVATEN

### 5.2.2.1 *N*-BENZYLOXYCARBONYL-L-SERINMETHYLESTER (31)<sup>[118]</sup>

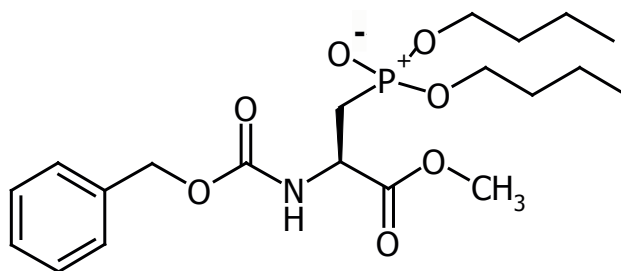


22 ml (144 mmol) Acetylchlorid wurden unter Eiskühlung zu 150 ml Methanol getropft. Nach 15 min wurden 27.12 g (114 mmol) *N*-Benzyloxycarbonyl-L-serin (**27**) in kleinen Portionen zugegeben. Dieser Ansatz rührte dann 30 min bei Raumtemperatur und wurde noch 2 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde dann i. Vak. entfernt und der ölige Rückstand in 250 ml Dichlormethan aufgenommen, zweimal mit je 100 ml 10proz. wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt.

Ausbeute: 26.46 g (91%) farbloses Öl<sup>[118,119]</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR (300.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ in ppm = 3.00 (br s, CH<sub>2</sub>OH, 1H); 3.73 (s, OCH<sub>3</sub>, 3H); 3.85 (dd, <sup>1</sup>J<sub>H,H</sub>=10.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=2.76 Hz, CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>OH, 1H); 3.94 (dd, <sup>1</sup>J<sub>H,H</sub>=10.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=2.8 Hz, CH<sub>A</sub>H<sub>B</sub>OH, 1H); 4.41 (br s, CH, 1H); 5.09 (s, OCH<sub>2</sub>Ph, 2H); 5.92 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=7.7 Hz, NH, 1H); 7.25-7.32 (br s, Ph, 5H).

**<sup>13</sup>C-NMR (75.48 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ in ppm = 52.7 (CH); 56.1 (OCH<sub>3</sub>); 63.0 (CHCH<sub>2</sub>OH); 67.2 (OCH<sub>2</sub>Ph); 128.1, 128.2, 128.5 (C-2', C-3', C-4'); 136.1 (C-1'); 156.4 (NHCOO); 171.2 (COO).

**5.2.2.2 (2S)-2-BENZYLOXYCARBONYLAMINO-3-(DI-*n*-BUTOXYPHOSPHINYL)-PROPIONSÄUREMETHYLESTER (32)****Variante A (Nach der Methode von Schmidt *et al.*<sup>[66]</sup>):**

5.07 g (0.02 mol) *N*-Benzyloxycarbonyl-L-serinmethylester (**31**) wurden in 30 ml Toluol gelöst und mit 2.6 ml (0.03 mol) Phosphortrichlorid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei 70°C gerührt. Sodann wurden 8.7 ml (0.03 mol) Tri-*n*-butylphosphit zugetropft und die Reaktionslösung weitere 2 h bei 70°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der ölige Rückstand in 100 ml Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit 30 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, eingeeengt und durch Säulenchromatographie über Kieselgel 60 gereinigt (Eluent: Ethylacetat/Cyclohexan 7:3).

Ausbeute: 1.59 g (19 %) farbloses Öl

**Variante B (nach der Methode von Tamura *et al.*<sup>[63]</sup>):**

2.56 g (10 mmol) *N*-Benzyloxycarbonyl-L-Serinmethylester (**31**) wurden unter Eiskühlung zu einer Lösung von 2.11 g (11 mmol) Phosphorpentachlorid in 15 ml trockenem Chloroform gegeben. Nachdem der Ansatz 4 h bei 0°C gerührt worden war, wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und 50 ml Ethylacetat zugegeben. Die organische Phase wurde je zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet.

Nachdem das Lösungsmittel entfernt worden war, wurden 30 ml trockenes Toluol zugegeben, 4.4 ml (15 mmol) Tri-*n*-butylphosphit zugetropft und die Reaktionslösung weitere 2 h bei 70°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt,

der ölige Rückstand in 100 ml Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit 30 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, eingeengt und durch Säulenchromatographie über Kieselgel 60 gereinigt (Eluent: Ethylacetat/Cyclohexan 7:3).

Ausbeute: 1.13 g (26 %) farbloses Öl

**Variante C (nach der Methode von Kamijo *et al.*<sup>[120]</sup>):**

Zu einer Lösung von 2.56 g (0.01 mol) *N*-Benzyloxycarbonyl-L-Serinmethylester (**31**) und 1.62 g (0.01 mol) *N,N'*-Carbonyldiimidazol in 10 ml trockenem Acetonitril wurden 6.00 g (0.05 mol) Allylbromid gegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur und 1.5 h unter Rückfluss gerührt.

Sodann wurden 70 ml Ether und 30 ml Wasser hinzugegeben, die organische Schicht mit verdünnter Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet.

Nachdem das Lösungsmittel i. Vak. entfernt worden war, wurde das verbliebene Öl in 30 ml Toluol gelöst und auf 70°C erwärmt. Bei dieser Temperatur wurden 2.9 ml (0.01 mol) Tri-*n*-butylphosphit zugetropft und die Mischung für 2 h bei 70°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt, der ölige Rückstand in 100 ml Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. entfernt und das Öl durch Säulenchromatographie über Kieselgel 60 (Eluent: Ethylacetat/Cyclohexan 7:3) gereinigt.

Ausbeute: 1.46 g (34%) farbloses Öl

**Variante D:**

5.01 g (0.02 mol) *N*-Benzyloxycarbonyl-L-Serinmethylester (**31**) wurden unter Eiskühlung zu einer Suspension von 4.24 g (0.02 mol) Phosphorpentachlorid in 10 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran gegeben. Nachdem der Ansatz 5 h bei 0°C gerührt worden war, wurde eine Lösung von 8.8 ml (0.03 mol) Tri-*n*-butylphosphit in 40 ml trockenem Toluol zugetropft und die Reaktionslösung 2 h bei 110°C gerührt.

Anschließend wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der ölige Rückstand in 100 ml Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit 30 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, eingengt und durch Säulenchromatographie über Kieselgel 60 gereinigt (Eluent: Ethylacetat/Cyclohexan 7:3).

Ausbeute: 5.75 g (67%) farbloses Öl

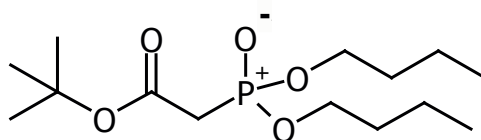
**<sup>1</sup>H-NMR (300.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ in ppm = 0.91-0.96 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=7.4 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 6H); 1.36-1.48 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 4H); 1.63-1.73 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, 4H); 2.04 (br s, PCH<sub>2</sub>, 2H); 3.74 (s, OCH<sub>3</sub>, 3H); 4.00-4.15 (m, POCH<sub>2</sub> und PCH<sub>2</sub>CH, 5H); 5.11 (s, OCH<sub>2</sub>Ph, 2H); 5.64 (br s, NH, 1H); 7.25-7.32 (br s, Ph, 5H).

**<sup>13</sup>C-NMR (75.48 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ in ppm = 13.4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 14.1 (18.7 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 27.6 (d, <sup>1</sup>J<sub>C,P</sub>=141 Hz, PCH<sub>2</sub>); 32.4 (POCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 55.4 (PCH<sub>2</sub>CH); 56.1 (OCH<sub>3</sub>); 60.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 66.3 (POCH<sub>2</sub>); 67.2 (OCH<sub>2</sub>Ph); 128.1, 128.2, 128.5 (C-2', C-3', C-4'); 136.1 (C-1'); 156.4 (NHCOO); 171.2 (COO).

**MS (ESI):** m/z (%) = 442 [M+H<sup>+</sup>] (100).

## 5.2.3 RETRO-INVERSER PHOSPHONSÄUREDIESTER

### 5.2.3.1 2-(DI-*n*-BUTOXYPHOSPHINYL)ESSIGSÄURE-*tert*-BUTYLESTER (39)<sup>[78]</sup>



Zu 18.4 ml (0.10 mol) Tri-*n*-butylphosphit wurden 20.0 ml (0.14 mol) Chloroessigsäure-*tert*-butylester (**38**) getropft. Das Gemisch wurde 3 h auf 160°C erhitzt und durch Kieselgel-Säulenchromatographie (Eluent: EtOAc/Cyclohexan 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 21.6 g (70 %) farbloses Öl<sup>[78]</sup>.

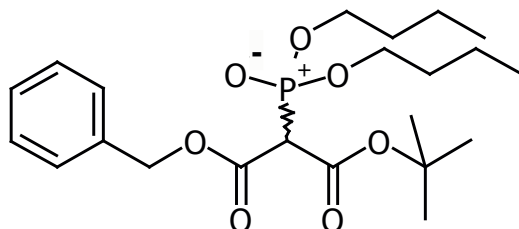


**IR (KBr):**  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 990 (P-O); 1024 (O-C); 1263 (P=O); 1734 (C=O); 2961 (C-H).

**$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 0.90 (t,  $^3J_{\text{H,H}}=7.35$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 6H); 1.43 (s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ , 9H); 1.31-1.47 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 4H); 1.57-1.68 (m,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ , 4H); 2.85 (d,  $^2J_{\text{H,P}}=21.5$  Hz,  $\text{PCH}_2$ , 2H); 3.98-4.12 (m,  $\text{OCH}_2$ , 4H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75.48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 13.6 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 18.7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 27.9 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 32.5 ( $\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 35.5 (d,  $^1J_{\text{C,P}}=133.2$  Hz,  $\text{PCH}_2$ ); 66.2 (d,  $^2J_{\text{C,P}}=6.5$  Hz,  $\text{POCH}_2$ ); 81.9 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ); 164.9 (d,  $^2J_{\text{C,P}}=6.4$  Hz,  $\text{COO}$ ).

### 5.2.3.2 (2*RS*)-2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)malonsäurebenzyl- tert.-butylester (40)



Zu einer Suspension aus 0.24 g (0.01 mol) Natriumhydrid in 10 ml trockenem Toluol wurde eine Lösung aus 3.08 g (0.01 mol) **39** in 10 ml trockenem Toluol zugetropft. Während der Zugabe wurde die Temperatur bei 20°C gehalten. Nachdem die entstandene Mischung 20 min bei Raumtemperatur rührte, wurden 0.89 ml (0.01 mol) Chlorameisensäurebenzylester zugetropft. Der Ansatz erwärmte sich leicht auf 30°C und wurde nach weiteren 15 min auf Wasser gegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Das so erhaltene Rohprodukt (11.35 g gelbes Öl) wurde durch Kieselgel-Säulenchromatographie (Eluent: EtOAc/Cyclohexan 7:3) gereinigt.

Ausbeute: 3.45 g (70%) farbloses Öl.

**IR (KBr):**  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 698 (=C-H); 1025 (O-C); 1263 (P=O); 1734 (C=O); 2959 (C-H).

**$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 0.84-0.96 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 6H); 1.16-1.39

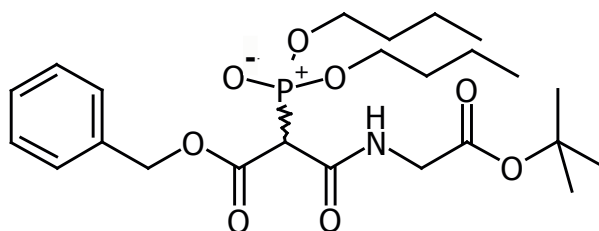
(m+s, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> und C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 13H); 1.50-1.65 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, 4H); 4.02-4.22 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, 4H); 4.56 (d, <sup>2</sup>J<sub>H,P</sub>=31.2 Hz, PCH, 2H); 5.14 (s, OCH<sub>2</sub>Ph, 2H); 7.19-7.32 (m, Ph, 5H).

<sup>13</sup>C-NMR (75.48 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ in ppm = 13.6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 18.7 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 27.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 32.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 54.7 (d, <sup>1</sup>J<sub>C,P</sub>=136.2 Hz, PCH); 66.5 (POCH<sub>2</sub>); 67.2 (OCH<sub>2</sub>Ph); 82.9 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 128.3, 128.4, 128.6 (C-2', C-3', C-4'); 137.5 (C-1'); 164.8, 166.3 (COOBzl und COO<sup>t</sup>Bu).

MS (ESI): m/z (%) = 443 [M+H<sup>+</sup>] (100).

C <sub>22</sub> H <sub>35</sub> O <sub>7</sub> P (MW= 442.49):	ber.:	C: 59.72	H: 7.97
	gef.:	C: 59.66	H: 7.55

### 5.2.3.3 *N*-[(2*RS*)-*O*-Benzyl-2-(di-*N*-butoxyphosphinyl)malonyl]glycin-*tert*-butylester (41)



**Variante A (aus 40):** 1.57 g (3.5 mmol) **40** wurden mit 20 ml eisgekühlter Trifluoressigsäure vermischt und 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Trifluoressigsäure wurde i. Vak. entfernt, und der Rückstand mit 3 N Salzsäure gewaschen und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und vorsichtig i. Vak. eingengt.

In eine eisgekühlte Suspension aus 0.54 g (3.2 mmol) Glycin-*tert*-butylesterhydrochlorid und trockenem Dichlormethan wurde bis zur vollständigen Fällung von Ammoniumchlorid trockener Ammoniak geleitet, der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat vorsichtig eingengt. Der Rückstand wurde mit der freien Säure vereinigt, in 10 ml Acetonitril gelöst und auf 0°C gekühlt. Sodann wurden 0.76 g (3.7 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid hinzugefügt und das Reaktionsgemisch 1 h unter Eiskühlung und 14 h bei Raumtemperatur gerührt.

Der anfallende Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat eingeeengt, der ölige Rückstand in 30 ml Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit 1N Natriumhydrogensulfat-Lösung und einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat eingeeengt und durch Chromatographie über Kieselgel 60 gereinigt. Es wurden zwei Fraktion aufgefangen. Fraktion 1 ( $R_f=0.53$ ) enthielt **41**, wohingegen Fraktion 2 ( $R_f=0.63$ , 0.92 g; 77%) als **43** identifiziert werden konnte.

Ausbeute: 0.16 g (10%) farbloses Öl.

**Variante B (aus 45):** Zu einer Suspension von 0.44 g (0.01 mol) 55 proz. NaH in 10ml trockenem Toluol wurde eine Lösung aus 3.65 g (0.01 mol) **45** in 10 ml trockenem Toluol zugetropft. Während der Zugabe wurde die Temperatur durch Kühlung mit einem Wasserbad unter 20°C gehalten. Die entstandene Mischung rührte 20 min bei Raumtemperatur und dann wurden 0.89 ml (0.01 mol) Chlorameisensäurebenzylester zugetropft. Nach weiteren 15 min Reaktionszeit wurde die Lösung auf Wasser gegeben, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mehrmals mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt.

Das Gemisch wurde über Kieselgel 60 chromatographiert (EtOAc/Cyclohexan 7:3). Es wurden zwei Fraktion aufgefangen. Fraktion 1 ( $R_f=0.44$ ) enthielt 1.40 g **46** (siehe 5.2.3.7), wohingegen Fraktion 2 ( $R_f=0.61$ ) als **41** identifiziert werden konnte.

Ausbeute: 3.31 g (68%) farbloses Öl.

**IR (KBr):**  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 698 (=C-H); 990 (P-O); 1026 (O-C); 1271 (P=O); 1732 (C=O); 2960 (C-H); 3469 (N-H).

**$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 0.84-0.96 (t,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 6H); 1.16-1.26 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 4H); 1.49 (s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ , 9H); 1.51-1.71 (m,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ , 4H); 3.97-4.19 (m+m,  $\text{OCH}_2+\text{Gly-C}_\alpha\text{H}_2$ , 6H); 4.65 (d,  $^2J_{\text{P,H}}=32.3$  Hz, PCH, 1H); 5.21 (d,  $J=5.0$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ , 2H); 6.88 (br s, NH, 1H); 7.26-7.39 (m, Ph, 5H).

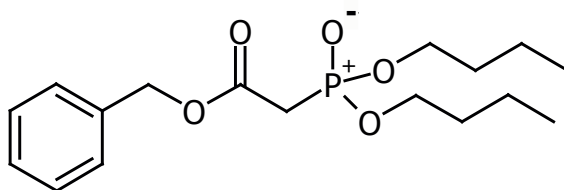
**$^{13}\text{C-NMR}$  (75.48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 14.2 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 19.2 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 28.7

(C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 32.9 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 42.7 (Gly-C<sub>α</sub>); 54.3 (d, <sup>1</sup>J<sub>C,P</sub>=131.6 Hz, CHP) 66.0 (OCH<sub>2</sub>Ph); 67.2 (POCH<sub>2</sub>); 84.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 129.0, 129.1, 129.2 (C-2', C-3', C-4'); 135.6 (C-1'); 157.3 (COOBzl); 163.45 (CONH); 167.96 (COO<sup>t</sup>Bu).

**MS (ESI): m/z (%) = 365 [M-COOBzl+H<sup>+</sup>] (100).**

C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> NO <sub>8</sub> P (MW= 499.55):	ber.:	C: 57.71	H: 7.67	N: 2.80
	gef.:	C: 57.83	H: 7.63	N: 2.88

#### 5.2.3.4 2-(DI-*n*-BUTOXYPHOSPHINYL)ESSIGSÄUREBENZYLESTER (43)



##### Variante A<sup>[121]</sup>:

Zu 26 ml (0.14 mol) Tri-*n*-butylphosphit wurden 31.4 ml (0.2 mol) 2-Bromessigsäurebenzylester gegeben. Das Gemisch wurde 3 h bei 130 °C erhitzt und dann i. Vak. fraktioniert destilliert (180-183°C im Wasserstrahlvakuum).

Ausbeute: 14.4 g (30 %) farbloses Öl

##### Variante B:

Zu einer leicht gekühlten Suspension von 0.60 g (0.02 mol) 55prz. Natriumhydrid in 20 ml trockenem Toluol wurde eine Lösung von 2.48 g (0.01 mol) 2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)essigsäure (**44**) in 20 ml trockenem Toluol zugetropft. Während der Zugabe wurde die Temperatur unter 20 °C gehalten. Nachdem der Ansatz noch 20 min bei Raumtemperatur rührte, wurden 1.78 ml (0.02 mol) Chlorameisensäurebenzylester zugetropft.

Nach weiteren 15 min Reaktionszeit wurde die Lösung auf Wasser gegeben, die org. Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das

Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

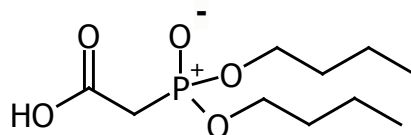
Das so erhaltene Rohprodukt wurde durch Kieselgel-Säulenchromatographie (Eluent: EtOAc/Cyclohexan 7:3) gereinigt.

Ausbeute: 1.50 g (44 %) farbloses Öl

**$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 0.9 (t,  $^3J_{\text{H,H}}=7.4$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 6H); 1.39 (sextett,  $^3J_{\text{H,H}}=7.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 4H); 1.61 (quintett,  $^3J_{\text{H,H}}=6.6$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ , 4H); 3.00 (d,  $^2J_{\text{H,P}}=21.6$  Hz,  $\text{PCH}_2$ , 2H); 4.07 (dt,  $^3J_{\text{H,P}}=^3J_{\text{H,H}}=6.6$  Hz,  $\text{POCH}_2\text{CH}_2$ , 4H); 5.17 (s,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ , 2H); 7.31-7.38 (m, Ph, 5H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75.48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 13.6 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 18.7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 32.4 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 34.2 (d,  $^1J_{\text{C,P}}=134.0$  Hz,  $\text{PCH}_2$ ); 66.4 (d,  $^2J_{\text{C,P}}=6.6$  Hz,  $\text{POCH}_2$ ); 67.3 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ); 128.4, 128.5, 128.6 (C-2', C-3', C-4'); 135.8 (C-1'); 165.7 (d,  $^2J_{\text{C,P}}=6.1$  Hz,  $\text{COOBzl}$ ).

### 5.2.3.5 2-(DI-*n*-BUTOXYPHOSPHINYL)ESSIGSÄURE (44)<sup>[121]</sup>



**Variante A:** Zu 14.8 ml (0.08 mol) Tri-*n*-butylphosphit wurden 16.5 ml (0.11 mol) Chloressigsäure-*tert*-butylester getropft. Das Gemisch wurde 3 h auf 160°C erhitzt und unverbrauchter Chloressigsäure-*tert*-butylester abdestilliert. Im Verlaufe der Destillation entstanden farblose Dämpfe (Isobuten). Der Rückstand wurde über Kieselgel 60 chromatographiert (Eluent: Ethylacetat/Cyclohexan 7:3).

Ausbeute: 6.76 g (40 %) farbloses Öl

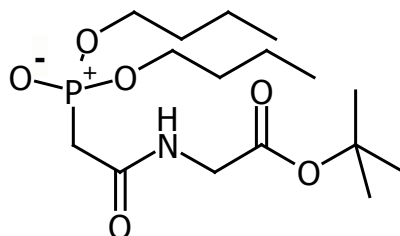
**Variante B:** 2.71 g (0.08 mol) **39** wurden auf 0°C gekühlt und mit 5 ml eisgekühlter TFA bei 0°C gerührt. Nach 30 min wurde das Gemisch i. Vak. eingeeengt und über Kieselgel 60 chromatographiert (Eluent: Ethylacetat/Cyclohexan 7:3).

Ausbeute: 1.45 g (72 %) farbloses Öl

**$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 0.93 (t,  $^3J_{\text{H,H}}=7.4$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 6H); 1.40 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 4H); 1.68 (m,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ , 4H); 2.99 (d,  $^2J_{\text{H,P}}=21.7$  Hz,  $\text{PCH}_2$ , 2H); 4.13 (dt,  $^3J_{\text{H,P}}=^3J_{\text{H,H}}=7.1$  Hz,  $\text{POCH}_2\text{CH}_2$ , 4H); 9.69 (br s,  $\text{COOH}$ , 1H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75.48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 14.2 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 19.3 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 33.1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 34.7 (d,  $^1J_{\text{C,P}}=134.3$  Hz,  $\text{PCH}_2$ ); 67.6 (d,  $^2J_{\text{C,P}}=6.6$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ); 168.6 (d,  $^2J_{\text{C,P}}=5.4$  Hz,  $\text{COOH}$ ).

### 5.2.3.6 *N*-[2-(*Di-n*-butoxyphosphinyl)acetyl]glycin-*tert*-butylester (**45**)



In eine eisgekühlte Suspension aus 1.07 g (6.4 mmol) Glycin-*tert*-butylesterhydrochlorid und Dichlormethan wurde bis zur vollständigen Fällung von Ammoniumchlorid trockener Ammoniak geleitet, der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat vorsichtig eingeeengt.

Der Rückstand wurde mit 1.76 g (7.0 mmol) **44** vereinigt, in 10 ml Acetonitril gelöst und auf 0°C gekühlt. Sodann wurden 1.48 g (7.4 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid hinzugefügt und das Reaktionsgemisch 1 h unter Eiskühlung und 14 h bei Raumtemperatur gerührt.

Der anfallende Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat eingeeengt, der ölige Rückstand in 10 ml Ethylacetat aufgenommen und mit Cyclohexan vermischt. Eventuell entstandener Feststoff wurde abgetrennt. Das Filtrat wurde zweimal mit 1N Natriumhydrogensulfat-Lösung und einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel abrotiert und nach Erkalten entstand ein Feststoff, der durch Chromatographie über Kieselgel 60 weiter gereinigt wurde (Eluent: EtOAc/Cyclohexan 7:3).

Ausbeute: 1.80 g (80%) farbloser, wachsartiger Feststoff.

Schmp.: 56-57°C

**IR (KBr):**  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 990 (P-O); 1028 (O-C); 1243 (P=O); 1733 (C=O); 2963 (C-H).

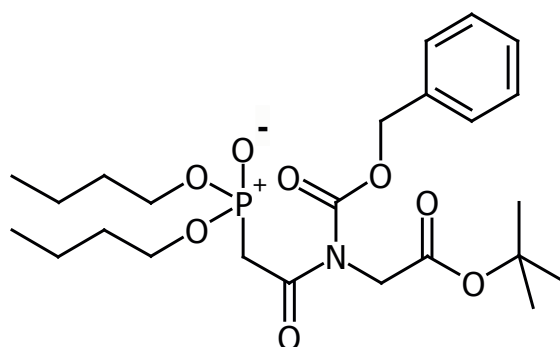
**$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 0.91 (t,  $^3J_{\text{H,H}}=7.4$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 6H); 1.25-1.43 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 4H); 1.47 (s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ , 9H); 1.61-1.71 (m,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ , 4H); 2.88 (d,  $^2J_{\text{H,P}}=20.5$  Hz,  $\text{CH}_2\text{P}$ , 2H); 3.93 (d,  $^3J_{\text{H,H}}=5.2$  Hz, Gly- $\text{C}_\alpha\text{H}_2$ , 2H); 4.04-4.16 (m,  $\text{POCH}_2$ , 4H); 7.11 (br s, NH, 1H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75.48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 14.2 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 19.4 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 28.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 33.1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 35.5 (d,  $^1J_{\text{C,P}}=131.4$  Hz,  $\text{PCH}_2$ ); 43.1 (Gly- $\text{C}_\alpha$ ); 67.2 (d,  $^2J_{\text{C,P}}=6.8$  Hz,  $\text{POCH}_2$ ); 82.9 ( $\text{O}(\text{CH}_3)_3$ ); 164.8 (CONH); 169.1 ( $\text{COO}^t\text{Bu}$ ).

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 388 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ] (100), 366 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ] (32).

$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{NO}_6\text{P}$ (MW= 365.41):	ber.:	C: 52.59	H: 8.83	N: 3.83
	gef.:	C: 52.63	H: 8.71	N: 3.77

### 5.2.3.7 *N*-[2-(di-*n*-butoxyphosphinyl)acetyl]-*N*-(benzyloxycarbonyl)-glycin-*tert*-butylester (**46**)



Der *N*-[2-(di-*n*-butoxyphosphinyl)acetyl]-*N*-benzyloxycarbonylglycin-*tert*-butylester (**46**) fällt als Nebenprodukt bei der Darstellung von *N*-[(2*RS*)-*O*-Benzyl-2-(di-*n*-butoxyphosphinyl)malonyl]glycin-*tert*-butylester (**41**) an (siehe 5.2.3.3; Variante B).

Ausbeute: 1.40 g (29%) farbloses Öl.

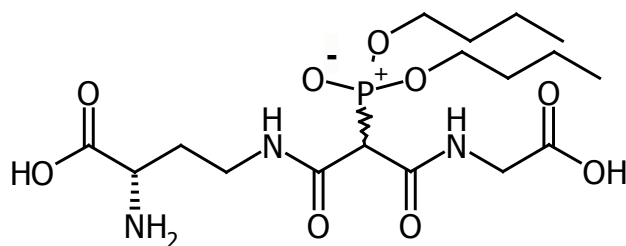
**IR (KBr):**  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 698 (=C-H); 990 (P-O); 1026 (O-C); 1271 (P=O); 1732 (C=O); 2960 (C-H).

**$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 0.91 (t,  $J=7.3$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 6H); 1.31-1.44 (m + br s,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$  und  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ , 13H); 1.62 (quintett,  $J=7.9$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ , 4H); 3.83 (d,  $^2J_{\text{P,H}}=21.5$  Hz,  $\text{PCH}_2$ , 2H); 4.06 (q,  $J=6.8$  Hz,  $\text{OCH}_2$ , 4H); 4.39 (s, Gly- $\text{C}_\alpha\text{H}_2$ , 2H); 5.22 (s,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ , 2H); 7.53-7.63 (m, Ph, 5H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75.48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 14.3 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 19.4 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 28.6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 33.1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 37.3 (d,  $^1J_{\text{C,P}}=134.9$  Hz,  $\text{PCH}_2$ ); 46.7 (Gly- $\text{C}_\alpha$ ); 66.9 (d,  $^2J_{\text{C,P}}=6.7$  Hz,  $\text{POCH}_2$ ); 69.8 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ); 82.8 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ); 128.9, 129.3, 129.4 (C-2', C-3', C-4'); 135.3 (C-1'); 154.24 (NCOOBzl); 167.9, 168.1 ( $\text{COO}^t\text{Bu}$  und  $\text{PCH}_2\text{CON}$ ).

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 500 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ] (100).

### 5.2.3.8 (2*RS*)-*N*-[(3*S*)-3-AMINO-3-CARBOXYPROPYL]-*N'*-(CARBOXYMETHYL)-2-(DI-*n*-BUTOXYPHOSPHINYL)MALONSÄUREDIAMID (18)



0.50 g (1.0 mmol) *N*-[(2*RS*)-*O*-Benzyl-2-(di-*n*-butoxyphosphinyl)malonyl]glycin-*tert*-butylester (**41**) wurden in 10 ml Methanol gelöst, mit 0.15 g Palladium/Aktivkohle versetzt und 2 h bei 3 atm und Raumtemperatur hydriert. Die Suspension wurde filtriert und das Filtrat vorsichtig i. Vak. vom Lösemittel befreit.

0.24 g (0.8 mmol) *N'*-*tert*-Butoxycarbonyl-L-2,4-diaminobuttersäure-*tert*-butylesterhydrochlorid wurde in 20 ml Dichlormethan suspendiert und im Eisbad gekühlt. Es wurde so lange trockener Ammoniak eingeleitet, bis kein Ammoniumchlorid mehr ausfiel. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat vorsichtig eingeeengt.

Das so erhaltene Öl wurde in 50 ml trockenem Acetonitril suspendiert und mit dem Öl aus der Hydrierung vereinigt. Der Reaktionsansatz wurde auf 0°C gekühlt, mit 0.24 g (1.2 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und dann noch 1 h bei 0°C



und 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat eingengt, in 70ml Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit 1 N Natriumhydrogensulfat-Lösung und einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

Das erhaltene Öl wurde unter Eiskühlung mit 5 ml Trifluoressigsäure versetzt und 1 h bei 0°C gerührt. Das Gemisch wurde sodann i. Vak. eingengt und über Kieselgel 60 chromatographiert (Eluent: *n*-Propanol/Eisessig/Wasser 10:5:5).

Ausbeute: 0.04 g (10%) farbloses Öl

**IR (KBr):**  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 953 (P-O); 1025 (O-C); 1298 (P=O); 1741 (C=O); 2929 (C-H); 3320 (N-H).

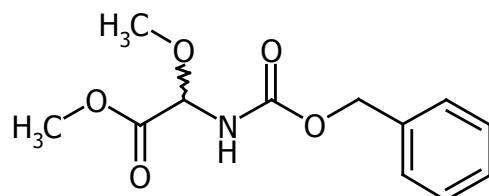
**$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  in ppm = 0.91-0.96 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 6H); 1.12-1.47 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 4H); 1.63-1.71 (m+br s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$  und Dab- $\text{C}_\beta\text{H}_A\text{H}_B$ , 5H); 2.07 (br s, Dab- $\text{C}_\beta\text{H}_A\text{H}_B$ , 1H); 3.06 (br s, Dab- $\text{C}_\gamma\text{H}_A\text{H}_B$ , 1H); 3.48 (br s, Dab- $\text{C}_\gamma\text{H}_A\text{H}_B$ , 1H); 3.62-3.74 (m, Gly- $\text{CH}_2$ , 2H); 3.83 (br s, Dab- $\text{C}_\alpha\text{H}$ , 1H); 3.99-4.15 (m,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ , 4H); 5.41 (br d,  $^2J_{\text{P,H}}=40.4$  Hz, PCH, 1H); 7.26, 7.99 (br s, Dab- $\text{N}^y\text{H}$ , Gly-NH und COOH, 4H); 8.62 (br s, zwei COOH und  $\text{NH}_2$ , 4H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75.48 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  in ppm = 14.0 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 19.1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 32.6 ( $\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 33.5 (Dab- $\text{C}_\beta$ ); 37.3 (Dab- $\text{C}_\gamma$ ); 52.7 (Dab- $\text{C}_\alpha$ ); 54.1 (d,  $^1J_{\text{C,P}}=134.1$  Hz, CHP); 66.8 ( $\text{POCH}_2$ ); 171.3, 171.7, 173.1, 173.7 (zwei CONH und zwei COOH).

$\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_9\text{P}$ (MW= 453.43):	ber.:	C: 45.03	H: 7.11	N: 9.27
	gef.:	C: 45.12	H: 7.05	N: 9.18

## 5.2.4 DOPPELT RETRO-INVERSER PHOSPHONSÄUREDIESTER

### 5.2.4.1 (2*RS*)-2-(BENZYLOXYCARBONYLAMINO)-2-METHOXYESSIGSÄURE-METHYLESTER (48)<sup>[72]</sup>



Eine Mischung aus 3.02 g (20 mmol) Benzylcarbamat und 2.02 g (22 mmol) Glyoxylsäuremonohydrat wurde in 20 ml trockenem Ether über Nacht gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abgesaugt und in 15 ml Methanol gelöst. Nach Zugabe von 0.2 ml konz. Schwefelsäure wurde 2 d bei Raumtemperatur gerührt und die Mischung in kaltgesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung gegeben.

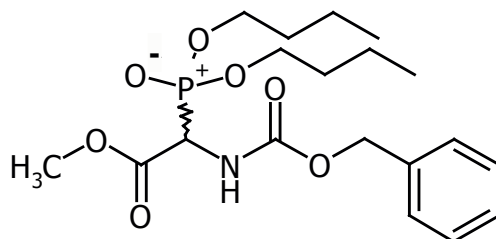
Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die organischen Extrakte über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels verblieb ein farbloses Öl, das unter Zugabe von Petrolether kristallisierte.

Ausbeute: 1.16 g (80 %) farbloser Feststoff.

Schmp.: 76-77°C (Lit.: 76-78°C<sup>[72]</sup>)

**<sup>1</sup>H-NMR (300.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  in ppm = 3.44 (s, CHOCH<sub>3</sub>, 3H); 3.89 (s, COOCH<sub>3</sub>, 3H), 5.15 (s, OCH<sub>2</sub>Ph, 2H); 5.30 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=7.4 Hz, CH, 1H); 5.91 (br s, NH, 1H); 7.27-7.35 (br s, Ph, 5H).

**5.2.4.2 (2*RS*)-2-(BENZYLOXYCARBONYLAMINO)-2-(DI-*n*-BUTOXYPHOSPHINYL)-  
ESSIGSÄUREMETHYLESTER (49)<sup>[47]</sup>**



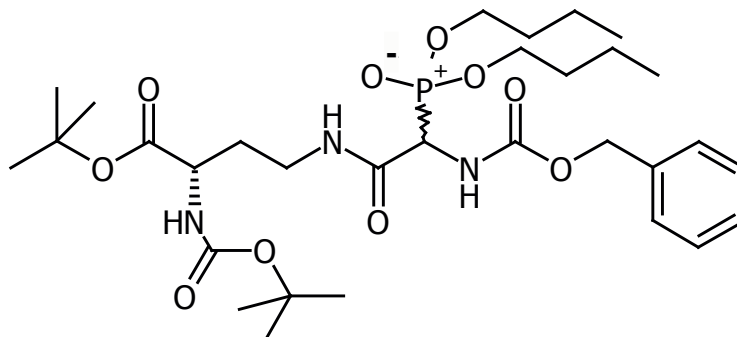
5.0 g (0.02 mol) **48** wurden in 30 ml Toluol gelöst und mit 2.6 ml (0.03 mol) Phosphortrichlorid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei 70°C gerührt. Sodann wurden 8.7 ml (0.03 mol) Tri-*n*-butylphosphit zugetropft und die Reaktionslösung weitere 2 h bei 70°C gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der ölige Rückstand in 100 ml Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit 30 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, eingeeengt und durch Säulenchromatographie über Kieselgel 60 gereinigt (Eluent: Ethylacetat/Cyclohexan 7:3).

Ausbeute: 4.8 g (58 %) farbloser Feststoff

Schmp.: 54-56°C (Lit.: 56°C<sup>[47]</sup>)

**<sup>1</sup>H-NMR (300.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ in ppm = 0.89-0.95 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 6H); 1.35-1.41 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 4H); 1.60-1.66 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, 4H); 3.81 (s, OCH<sub>3</sub>, 3H); 4.02-4.12 (m, OCH<sub>2</sub>, 4H); 4.89 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=9.2 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H,P</sub>=22.4 Hz, CHP, 1H); 5.10 (d, J=5.62 Hz, OCH<sub>2</sub>-Ph); 5.60 (br. d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=7.6 Hz, NH, 1H); 7.35 (s, Ph, 5H).

**<sup>13</sup>C-NMR (75.48 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ in ppm = 13.4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 18.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 32.3 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 52.5 (d, <sup>1</sup>J<sub>C,P</sub>=143.4 Hz, PCH); 53.0 (OCH<sub>3</sub>); 67.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 67.4 (OCH<sub>2</sub>Ph); 128.2 (C-2', C-3', C-4'); 135.8 (C-1'); 155.0 (NHCOO); 167.0 (COOMe).

**5.2.4.3  $N^{\alpha}$ -(*TERT.*-BUTOXYCARBONYL)- $N^{\gamma}$ -[(*2RS*)-2-(BENZYLOXYCARBONYLAMINO)-2-(*DI-N*-BUTOXYPHOSPHINYL)ACETYL]-L-2,4-DIAMINO-BUTTERSÄURE-*TERT.*-BUTYLESTER (50)**

1.7 g (4.1 mmol) **49** wurden in 10 ml Dioxan gelöst und auf 0°C gekühlt. Sodann wurden 5 ml 3 N Natronlauge. zugegeben und 30 min bei 0°C gerührt.

Der Ansatz wurde i. Vak. eingengt mit 3 N Salzsäure angesäuert. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 30 ml Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

1 g (3.2 mmol)  $N^{\alpha}$ -*tert.*-Butoxycarbonyl-L-2,4-diaminobuttersäure-*tert.*-butylesterhydrochlorid wurden in Dichlormethan gelöst, auf 0°C gekühlt und trockener Ammoniak eingeleitet, bis keine Ammoniumchloridfällung mehr zu beobachten war. Der Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat i. Vak. eingengt. Die Lösung wurde mit der freien Säure aus **49** vereint, mit 40 ml Acetonitril verdünnt und auf 0°C abgekühlt. Sodann wurden 0.73 g (3.5 mmol)  $N,N'$ -Dicyclohexylcarbodiimid hinzugegeben. Der Ansatz rührte noch 1 h bei 0°C. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde der Feststoff abfiltriert und das Filtrat i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das entstandene Öl wurde mit Ethylacetat aufgenommen, mit 1 N Natriumhydrogensulfat-Lösung und gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösemittel befreit. Die Reinigung erfolgte über Kieselgel 60 (Eluent: EtOAc/Cyclohexan 7:3).

Ausbeute: 1.56 g (58 %) farbloser Feststoff.

Schmp.: 179-181°C

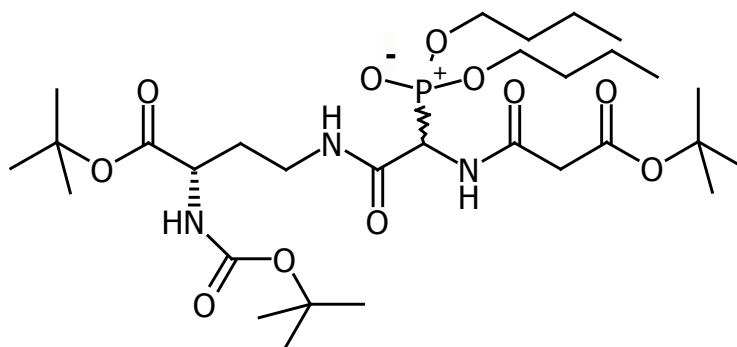
**$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 0.89-0.97 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 6H); 1.38-1.47 (m+s,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$  und  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ , 13H); 1.62-1.71 (m+br s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$  und Dab- $\text{C}_\beta\text{H}_A\text{H}_B$ , 5H); 2.05 (br s, Dab- $\text{C}_\beta\text{H}_A\text{H}_B$ , 1H); 3.10 (br s, Dab- $\text{C}_\gamma\text{H}_A\text{H}_B$ , 1H); 3.56 (br s, Dab- $\text{C}_\gamma\text{H}_A\text{H}_B$ , 1H); 4.01-4.15 (m+br s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$  und Dab- $\text{C}_\alpha\text{H}$ , 5H); 4.83 (dd,  $^2J_{\text{P,H}}=22.2$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}}=8.4$  Hz,  $\text{PCHNHCO}$ , 1H); 5.15 (d,  $J=5.0$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ , 2H); 5.19 (br s, Dab- $\text{N}^\alpha\text{H}$ ); 5.70 (br s,  $\text{PCHNHCH}_2$ , 1H); 7.16 (br s, Dab- $\text{N}^\gamma\text{H}$ , 1H); 7.27-7.36 (m, Ph, 5H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75.48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 14.2 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 19.3 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 28.7, 28.9 (Boc- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  und  $^t\text{Bu-C}(\text{CH}_3)_3$ ); 32.9 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 33.8 (Dab- $\text{C}_\beta$ ); 37.1 (Dab- $\text{C}_\gamma$ ); 52.4 (Dab- $\text{C}_\alpha$ ); 53.1 (d,  $^1J_{\text{C,P}}=146.1$  Hz, CHP); 67.8 ( $\text{POCH}_2$ ); 67.9 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ); 83.0 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ); 128.8, 128.9, 129.2 (C-2', C-3', C-4'); 135.6 (C-1'); 154.3, 156.5 (Dab- $\text{N}^\alpha\text{COO}$  und  $\text{PCHNHCOO}$ ); 165.5 (Dab- $\text{N}^\gamma\text{CO}$ ); 171.4 ( $\text{COO}^t\text{Bu}$ ).

**MS (ESI):**  $m/z$  (%) = 658 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ] (100).

$\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$ (MW= 657.75):	ber.:	C: 56.61	H: 7.97	N: 6.39
	gef.:	C: 56.59	H: 8.03	N: 6.43

**5.2.4.4  $\text{N}^\alpha$ -(*tert.*-BUTOXYCARBONYL)- $\text{N}^\gamma$ -[*(2RS)*-2-(*O-tert.*-BUTYL-MALONYLAMINO)-2-(*di-n*-BUTOXYPHOSPHINYL)ACETYL]-*L*-2,4-DIAMINOBUTTERSÄURE-*tert.*-BUTYLESTER (51)**



Eine Lösung von 1.56 g (2.4 mmol) **50** in 7 ml Methanol wurde mit Palladium/Aktivkohle 2 h bei 3 atm hydriert (DC-Kontrolle). Die Suspension wurde filtriert und vorsichtig i.Vak. eingengt.

0.58 g (3.6 mmol) Malonsäuremono-*tert.*-butylester wurden in 10 ml Acetonitril

gelöst und auf 0°C gekühlt. Sodann wurden 0.54 g (2.6 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid und das aus **50** freigesetzte Amin zugefügt. Der Ansatz wurde noch 1 h unter Eiskühlung und 14 h bei Raumtemperatur gerührt.

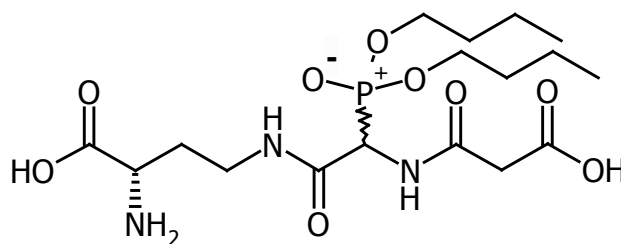
Der anfallende Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat eingeeengt, der ölige Rückstand in 10 ml Ethylacetat aufgenommen und mit Cyclohexan vermischt. Eventuell entstandener Feststoff wird abgetrennt. Das Filtrat wird zweimal mit 1 N Natriumhydrogensulfat-Lösung und einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingeeengt.

Ausbeute: 0.88 g (60 %) farbloses Öl.

**<sup>1</sup>H-NMR (300.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ in ppm = 0.86 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=7.3 Hz CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 6H); 1.24-1.48 (m+s, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> und C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 31H); 1.51-1.67 (m+br s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> und Dab-C<sub>β</sub>H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>, 5H); 2.13 (s, Dab-C<sub>β</sub>H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>, 1H); 3.10 (s, Dab-C<sub>γ</sub>H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>, 1H); 3.21 (s, COCH<sub>2</sub>CO, 2H); 3.55-3.59 (m, Dab-C<sub>γ</sub>H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>, 1H); 3.92-4.07 (m+br s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> und Dab-C<sub>α</sub>H, 5H); 5.11 (dd, <sup>2</sup>J<sub>P,H</sub>=21.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=8.7 Hz, PCHNH, 1H); 7.23 (br s, Dab-N<sup>α</sup>H und Dab-N<sup>γ</sup>H, 2H); 7.88 (br s, PCHNH, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (75.48 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ in ppm = 14.2 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 19.3 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 28.5, 28.6 (Boc-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> und <sup>t</sup>Bu-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 31.5 (Dab-C<sub>β</sub>); 33.0 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 33.4 (Dab-C<sub>γ</sub>); 43.3 (COCH<sub>2</sub>CO); 53.0 (Dab-C<sub>α</sub>); 51.3 (d, <sup>1</sup>J<sub>C,P</sub>=151.2 Hz, CHP); 68.1 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub>=6.2 Hz, POCH<sub>2</sub>); 83.0, 83.1, 83.2 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 154.3 (Dab-N<sup>α</sup>COO); 168.3, 169.1, 171.3 (PCHNHCOO, COO<sup>t</sup>Bu).

**5.2.4.5  $N^{\gamma}$ -[(2*RS*)-2-MALONYLAMINO-2-(DI-*n*-BUTOXYPHOSPHINYL)ACETYL]-L-2,4-DIAMINOBUTTERSÄURE (19)**



0.88 g (1.4 mmol) **51** wurden unter Eiskühlung mit 5 ml Trifluoressigsäure versetzt und 1 h bei 0°C gerührt. Das Gemisch wurde sodann i. Vak. eingengt und über Kieselgel 60 chromatographiert (Eluent: *n*-Propanol/Eisessig/Wasser 10:5:5).

Ausbeute: 0.04 g (10%) farbloses Öl

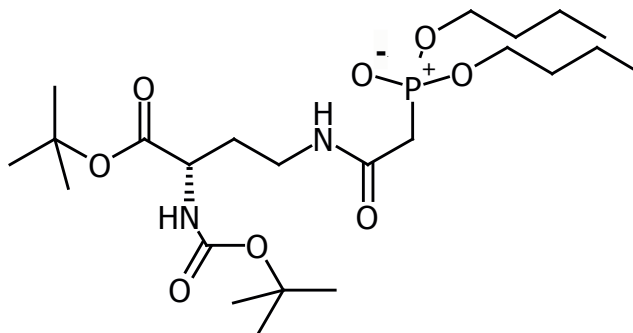
**$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  in ppm = 0.86-0.91 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 6H); 1.29-1.41 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 8H); 1.56-1.71 (m+br s,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$  und Dab- $\text{C}_\beta\text{H}_A\text{H}_B$ , 5H); 1.92 (br s, Dab- $\text{C}_\beta\text{H}_A\text{H}_B$ , 1H); 3.17 (br s, Dab- $\text{C}_\gamma\text{H}_A\text{H}_B$ , 1H); 3.42 (s,  $\text{COCH}_2\text{CO}$ , 2H); 3.56 (br s, Dab- $\text{C}_\gamma\text{H}_A\text{H}_B$ , 1H); 3.91-4.06 (m,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$  und Dab- $\text{C}_\alpha\text{H}$ , 5H); 5.03 (dd,  $^2J_{\text{P,H}}=22.8$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}}=8.8$  Hz,  $\text{PCHNH}$ , 1H); 7.95 (br s, Dab- $\text{N}^\alpha\text{H}$ ); 8.20 (br s, Dab- $\text{N}^\gamma\text{H}$ , 1H); 9.00 (d,  $^3J_{\text{H,H}}=8.7$  Hz,  $\text{PCHNH}$ , 1H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75.48 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  in ppm = 13.8 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 19.5 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 31.3 (Dab- $\text{C}_\beta$ ); 33.1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 33.2 (Dab- $\text{C}_\gamma$ ); 43.1 ( $\text{COCH}_2\text{CO}$ ); 53.3 (d,  $^1J_{\text{C,P}}=150.7$  Hz,  $\text{CHP}$ ); 53.4 (Dab- $\text{C}_\alpha$ ); 68.3 ( $\text{POCH}_2$ ); 165.5 (Dab- $\text{N}^\gamma\text{CO}$ ); 169.4, 171.4, 173.6 ( $\text{PCHNHCO}$  und  $\text{COOH}$ ).

$\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_9\text{P}$ (MW= 453.43):	ber.:	C: 45.03	H: 7.11	N: 9.27
	gef.:	C: 45.31	H: 6.97	N: 9.34

## 5.2.5 RETRO-INVERSES PHOSPHOSÄUREDIESTERFRAGMENT

### 5.2.5.1 $N^{\alpha}$ -(*tert.*-BUTOXYCARBONYL)- $N^{\gamma}$ -[2-(*DI-N*-BUTOXYPHOSPHINYL)ACETYL]-L-2,4-DIAMINOBTTERSÄURE-*tert.*-BUTYLESTER (52)



In eine eisgekühlte Suspension aus 1.00 g (3.2 mmol)  $N^{\alpha}$ -*tert.*-Butoxycarbonyl-L-2,4-diaminobuttersäure-*tert.*-butylesterhydrochlorid und Dichlormethan wurde bis zur vollständigen Fällung von Ammoniumchlorid trockener Ammoniak geleitet, der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat vorsichtig eingeeengt.

Der Rückstand wurde mit 0.88 g (3.5 mmol) **44** vereinigt, in 10ml Acetonitril gelöst und auf 0°C gekühlt. Sodann wurden 0.74 g (3.7 mmol)  $N,N'$ -Dicyclohexylcarbodiimid zugefügt und das Reaktionsgemisch 1h unter Eiskühlung und 14 h bei Raumtemperatur gerührt.

Der anfallende Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat eingeeengt, der ölige Rückstand in 10 ml Ethylacetat aufgenommen und mit Cyclohexan vermischt. Eventuell entstandener Feststoff wird abgetrennt. Das Filtrat wird zweimal mit 1 N Natriumhydrogensulfat-Lösung und einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die vereinten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat eingeeengt und durch Chromatographie über Kieselgel 60 gereinigt (Eluent: EtOAc/Cyclohexan 7:3).

Ausbeute: 0.99 g (61 %) farbloser Feststoff.

Schmp.: 86-87°C

**IR (KBr):**  $\nu/\text{cm}^{-1}$ : 1028 (O-C); 1234 (P=O); 1718 (C=O); 2963 (C-H); 3271 (N-H).

**$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 0.90-0.96 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 6H); 1.33-1.48



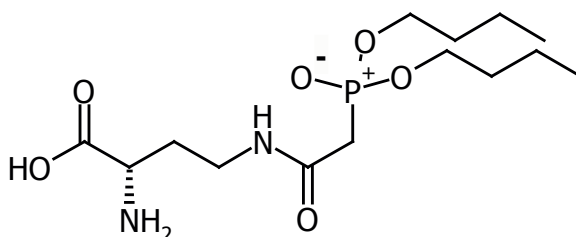
(m+s, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> und C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 13H); 1.62-1.71 (m+br s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> und Dab-C<sub>β</sub>H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>, 5H); 2.05 (br s, Dab-C<sub>β</sub>H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>, 1H); 2.86 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,H</sub>=20.8 Hz PCH<sub>2</sub>, 2H); 3.10 (br s, Dab-C<sub>γ</sub>H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>, 1H); 3.56 (br s, Dab-C<sub>γ</sub>H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>, 1H); 4.05-4.18 (m+br s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> und Dab-C<sub>α</sub>H, 5H); 5.23 (br d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=7.8 Hz, Dab-N<sup>α</sup>H, 1H); 7.06 (br s, Dab-N<sup>γ</sup>H, 1H).

**<sup>13</sup>C-NMR (75.48 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ in ppm = 14.2 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 19.3 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 28.7, 28.9 (Boc-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> und <sup>t</sup>Bu-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 33.1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 33.8 (Dab-C<sub>β</sub>); 35.4 (d, J=133.7 Hz, CH<sub>2</sub>P); 36.9 (Dab-C<sub>γ</sub>); 52.4 (Dab-C<sub>α</sub>); 67.8 (POCH<sub>2</sub>); 82.9 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 156.5 (Dab-N<sup>α</sup>COO); 164.9 (Dab-N<sup>γ</sup>HCO); 172.2 (COO<sup>t</sup>Bu).

**MS (ESI): m/z (%) =** 531 [M+Na<sup>+</sup>] (100), 509 [M+H<sup>+</sup>] (10).

C <sub>23</sub> H <sub>45</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> P (MW= 508.60):	ber.:	C: 54.32	H: 8.92	N: 5.51
	gef.:	C: 54.43	H: 9.04	N: 5.48

### 5.2.5.2 *N*<sup>γ</sup>-[2-(Di-*n*-butoxyphosphinyl)acetyl]-L-2,4-diaminobuttersäure (20)



0.99 g (1.9 mmol) **52** wurden unter Eiskühlung mit 5 ml Trifluoressigsäure versetzt und 1 h bei 0°C gerührt. Das Gemisch wurde sodann i. Vak. eingengt und über Kieselgel 60 chromatographiert (Eluent: *n*-Propanol/Eisessig/Wasser 10:5:5).

Ausbeute: 0.28 g (43%) farbloses Öl

**IR (KBr):** ν/cm<sup>-1</sup>: 1023 (O-C); 1226 (P=O); 1724 (C=O); 2943 (C-H); 3221 (N-H).

**<sup>1</sup>H-NMR (300.13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ in ppm = 0.84-0.91 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 6H); 1.23-1.47 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 4H); 1.52-1.67 (m+br s, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> und Dab-C<sub>β</sub>H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>, 5H); 1.99 (br s, Dab-C<sub>β</sub>H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>, 1H); 2.86 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,H</sub>=21.4 Hz PCH<sub>2</sub>, 2H); 3.13 (br s,

Dab-C<sub>γ</sub>H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>, 1H); 3.88 (br s, Dab-C<sub>γ</sub>H<sub>A</sub>H<sub>B</sub>, 1H); 3.92-4.01 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, 4H); 4.29 (br s, Dab-C<sub>α</sub>H, 1H); 7.38 (br s, Dab-N<sup>γ</sup>H, 1H); 8.37 (br s, Dab-N<sup>α</sup>H<sub>2</sub>, 2H); 12.11 (br s, COOH, 1H).

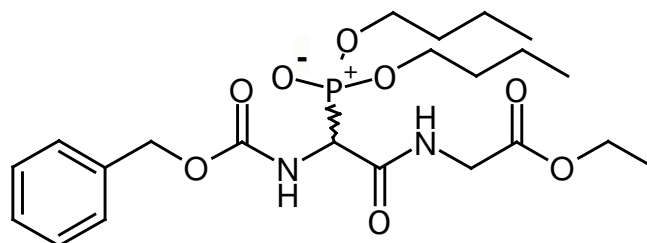
**<sup>13</sup>C-NMR (75.48 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ in ppm = 13.4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 18.1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 30.0 (Dab-C<sub>β</sub>); 31.8 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 34.8 (d, J=137.4 Hz, CH<sub>2</sub>P); 35.1 (Dab-C<sub>γ</sub>); 50.1 (Dab-C<sub>α</sub>); 65.2 (POCH<sub>2</sub>); 164.7 (Dab-N<sup>γ</sup>HCO); 171.9 (COOH).

**MS (ESI): m/z (%) = 353 [M+H<sup>+</sup>] (100).**

C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P (MW= 352.36):	ber.:	C: 47.72	H: 8.30	N: 7.95
	gef.:	C: 47.66	H: 8.15	N: 7.91

## 5.2.6 GLYCYL-ESTER DES PHOSPHONSÄUREDIESTERS

### 5.2.6.1 *N*-[(2*RS*)-2-BENZYLOXYCARBONYLAMINO-2-(DI-*n*-BUTOXYPHOSPHINYL)-ACETYL]-GLYCINETHYLESTER (56)



3.10 g (7.5 mmol) (2*RS*)-2-(Benzyloxycarbonylamino)-2-(di-*n*-butoxyphosphinyl)-essigsäuremethylester (**49**) wurden in 7.5 ml Dioxan gelöst und auf 0°C gekühlt. Sodann wurden 5 ml 3 N Natronlauge zugegeben und 30 min bei 0°C gerührt. Der Ansatz wurde i. Vak. eingengt mit 3 N Salzsäure angesäuert. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 30 ml Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt.

0.54 g (7.2 mmol) Glycinethylesterhydrochlorid wurden in Dichlormethan gelöst, auf 0°C gekühlt und trockener Ammoniak eingeleitet, bis keine Ammoniumchloridfällung mehr zu beobachten war. Der Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat i. Vak. eingengt. Die Lösung wurde mit der freien Säure aus **49** vereint, mit 20 ml Acetonitril verdünnt und auf 0°C abgekühlt. Sodann wurden 1.60 g (7.9 mmol)

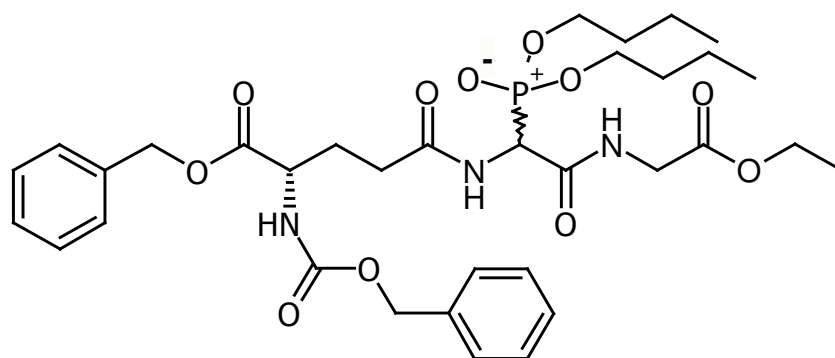
*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid hinzugegeben. Der Ansatz rührte noch 1 h bei 0°C und über Nacht bei Raumtemperatur. Dann wurde der Feststoff abfiltriert und das Filtrat i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Das entstandene Öl wurde mit Ethylacetat aufgenommen, je zweimal mit 1 N Natriumhydrogensulfat-Lösung und gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösemittel befreit. Die Reinigung erfolgte über Kieselgel 60 (Eluent: EtOAc/Cyclohexan 7:3).

**Ausbeute:** 1.30 g (36%) farbloses Öl

**<sup>1</sup>H-NMR (300.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ in ppm = 0.82-0.88 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 6H); 1.19-1.35 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> und OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 7H); 1.53-1.59 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, 4H); 3.93-4.18 (m, POCH<sub>2</sub> und OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> und Gly-CH<sub>2</sub>, 8H); 4.82 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=8.3 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H,P</sub>=20.4 Hz, CHP, 1H); 5.07 (d, J=8.7 Hz, OCH<sub>2</sub>-Ph, 2H); 5.60 (br d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub>=8.1 Hz, NHCOOPh, 1H); 7.24-7.46 (m, Ph und Gly-NH, 6H).

**<sup>13</sup>C-NMR (75.48 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ in ppm = 13.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 14.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 18.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 32.3 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 41.8 (Gly-C<sub>α</sub>); 52.1 (d, <sup>1</sup>J<sub>C,P</sub>=148.4 Hz, PCH); 61.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 67.3 (POCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 67.7 (OCH<sub>2</sub>Ph); 128.0, 128.2, 128.5 (C-2', C-3', C-4'); 136.0 (C-1'); 156.0 (NHCOO); 165.1 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub>=4.5 Hz, PCHCONH); 168.9 (COOEt).

#### 5.2.6.2 *N*-[(2*RS*)-2-(*N*-BENZYLOXYCARBONYL-*O*<sup>α</sup>-BENZYL- $\gamma$ -L-GLUTAMYL)AMINO-2-(*DI-N*-BUTOXYPHOSPHINYL)ACETYL]GLYCINETHYLESTER (57)



1.30 g (2.7 mmol) **56** wurden in 7 ml Methanol gelöst, mit 0.14 g Palladium/Aktivkohle versetzt und 2 h bei 3 atm und Raumtemperatur hydriert.

Die Suspension wurde filtriert, das Filtrat vorsichtig eingengt, in 10 ml Acetonitril gelöst und mit 0.99 g (2.7 mmol) *N*-Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde sofort auf 0°C gekühlt und mit 0.61 g (2.9 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Der Ansatz wurde noch 1 h bei 0°C und 14h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat eingengt, in 70 ml Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit 1 N Natriumhydrogensulfat-Lösung und einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen.

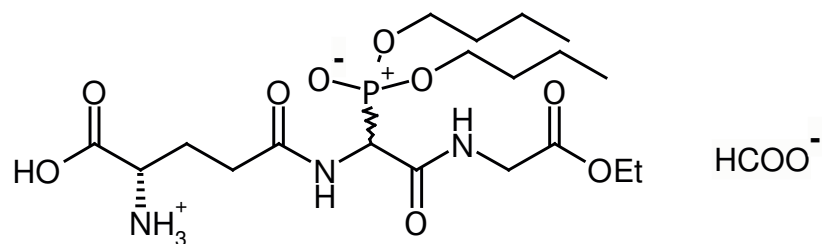
Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und durch Kieselgel-Säulenchromatographie (Eluent: Ethylacetat/Cyclohexan 7:3) gereinigt

Ausbeute: 0.51 g (26%) farbloses Öl.

**$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 0.81-0.88 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 6H); 1.19-1.23 (m,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ , 3H); 1.23-1.32 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 4H); 1.53-1.59 (m,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ , 4H); 1.87-2.09 (m, Glu- $\text{C}_\beta\text{H}_2$ , 2H); 2.23-2.38 (m, Glu- $\text{C}_\gamma\text{H}_2$ , 2H); 3.91-4.13 (m,  $\text{POCH}_2$  und  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$  und Gly- $\text{CH}_2$  8H); 4.39-4.52 (m, Glu- $\text{C}_\alpha\text{H}$ , 1H); 5.00, 5.10 (s, zwei  $\text{OCH}_2\text{-Ph}$ , 4H); 5.23 (dd,  $^3\text{J}_{\text{H,H}}=8.5$  Hz,  $^2\text{J}_{\text{H,P}}=20.4$  Hz, CHP, 1H); 5.60 (br d,  $^3\text{J}_{\text{H,H}}=8.1$  Hz,  $\text{NHCOO}$ , 1H); 7.20 (br s, Gly- $\text{NHCO}$ , 1H); 7.27 (br s, Ph, 10H); 7.40 (br s, Gly-NH, 1H).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75.48 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  in ppm = 13.5 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 14.1 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ); 18.5 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 28.5 (Glu- $\text{C}_\beta$ ); 31.9 (Glu- $\text{C}_\gamma$ ); 32.3 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 41.7 (Gly- $\text{C}_\alpha$ ); 50.1 (d,  $^1\text{J}_{\text{C,P}}=141.0$  Hz, PCH); 53.3 (Glu- $\text{C}_\alpha$ ); 61.4 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ); 67.0 ( $\text{POCH}_2\text{CH}_2$ ); 67.7 ( $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ); 128.0, 128.1, 128.2, 128.3, 128.5, 128.6 (C-2', C-2'', C-3', C-3'', C-4', C-4''); 135.2, 136.1 (C-1', C-1''); 156.2 ( $\text{NHCOO}$ ); 165.1, 165.2 ( $\text{CONH}$ ); 168.9 ( $\text{COOEt}$ ), 171.5 ( $\text{COBzl}$ ).

**5.2.6.3 *N*-[(2*RS*)-2-( $\gamma$ -L-GLUTAMYLAMINO)-2-(DI-*N*-BUTOXYPHOSPHINYL)-ACETYL]GLYCINETHYLESTER MONOFORMIAT (**14f**)**



350 mg (0.5 mmol) **57** wurden in 10 ml Methanol gelöst, mit 0.05 g Palladium/Aktivkohle versetzt und 2 h bei 3 atm und Raumtemperatur hydriert.

Die Suspension wurde filtriert, das Filtrat vorsichtig eingengt, und mit 10 ml Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 10 ml 1N Ameisensäure extrahiert, die wässrige Fraktion zweimal mit Ether gewaschen und auf ca. 5ml eingengt. Anschließend wurde die Lösung einer Gefriertrocknung unterworfen.

**Ausbeute:** 234 mg (94 %)

**$^1\text{H-NMR}$  (300.13 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  in ppm = 0.84-0.89 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 6H); 1.17 (t,  $^3J_{\text{H,H}}=7.1$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ , 3H); 1.27-1.34 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 4H); 1.49-1.57 (m,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ , 4H); 1.87-2.09 (m, Glu- $\text{C}_\beta\text{H}_2$ , 2H); 2.39 (br s, Glu- $\text{C}_\gamma\text{H}_2$ , 2H); 3.43 (br s, Glu- $\text{C}_\alpha\text{H}$ , 1H); 3.84 (br s, Gly- $\text{CH}_2$ , 2H); 3.97-4.11 (m,  $\text{POCH}_2$  und  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ , 6H); 5.13 (dd,  $^3J_{\text{H,H}}=8.1$  Hz,  $^2J_{\text{H,P}}=20.4$  Hz,  $\text{CHP}$ , 1H); 8.30 (s,  $\text{HCOOH}$ , 1H); 8.57-8.66 (m, NH, OH).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (75.48 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  in ppm = 13.4 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 14.1 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ); 18.1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); 26.9 (Glu- $\text{C}_\beta$ ); 31.9 (Glu- $\text{C}_\gamma$ ); 32.3 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 41.1 (Gly- $\text{C}_\alpha$ ); 50.3 (d,  $^1J_{\text{C,P}}=146.5$  Hz,  $\text{PCH}$ ); 53.1 (Glu- $\text{C}_\alpha$ ); 60.5 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ); 66.3 ( $\text{POCH}_2\text{CH}_2$ ); 163.6, 165.9 ( $\text{CONH}$ ); 169.3 ( $\text{COOEt}$ ), 171.5 ( $\text{COOH}$ ).

**MS (ESI):  $m/z$  (%)** = 520 [ $\text{M}+\text{K}^+$ ] (7), 504 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ] (63), 482 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ] (100).

## 5.3 HEMMUNG DER GST-AKTIVITÄT

### 5.3.1 GERÄTE UND CHEMIKALIEN

- Zweistrahl-Photometer: Uvicon 930 der Fa. Kontron, Neufahrn,
- Demineralisiertes und durch die Destillationsanlage Finn-Aqua 75 mehrfach destilliertes Wasser (Fa. Santasalo – Sohlberg Cor., Helsinki)
- Rekombinante, humane Isoenzyme hA1-1, hP1-1, HM1-1 der Fa. Sigma
- Aus dem Schwein gereinigte Isoenzyme pP1-1, pA1-1<sup>[50]</sup>

### 5.3.2 BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT

Die Aktivität der Isoenzyme gegenüber 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) wurde nach der Methode von Habig *et al.*<sup>[122]</sup> bei 25°C und einem pH-Wert von 6.5 (0.1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer) spektralphotometrisch bestimmt. Die Endkonzentration von Glutathion und 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol betrug jeweils 1mM. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet und die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 340 nm ( $\Delta\epsilon=9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### 5.3.3 BESTIMMUNG DER IC<sub>50</sub>-WERTE

Die IC<sub>50</sub>-Werte der einzelnen Verbindungen wurden bestimmt, indem die enzymatische Aktivität in An- und Abwesenheit des potentiellen Inhibitors gemessen wurde<sup>[50]</sup>. Dazu wurde die jeweilige Verbindung, gelöst in DMSO, in einer Endkonzentration von 0.005 µM, 0.1 µM, 1.0 µM, 10 µM, 100 µM und 500 µM eingesetzt. Für sämtliche Reaktionsansätze wurde eine konstante DMSO-Konzentration von 2% eingehalten. Die Reaktion wurde stets durch Zugabe der GST-Enzyme gestartet.

Für die Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes eines Inhibitors, wurde die gemessene Aktivität in Abhängigkeit der Inhibitor-Konzentration an folgende hyperbole Funktion gefittet:

$$\frac{V_0}{V_I} = \frac{IC_{50}}{IC_{50} + [I]}$$

mit  $V_0$  = Aktivität ohne Inhibitor;

$V_I$  = Aktivität in Anwesenheit des Inhibitors und

$[I]$  = Konzentration des Inhibitors

Für den Kurvenfit wurde das Programm SigmaPlot 5.0 von Jandel Scientific, Erkrath, benutzt.

Um Effekte des DMSO auszuschließen, wurde eine Leerprobe mit dem Lösungsmittel gemessen. Dabei konnte kein Einfluss des Lösungsmittels auf die gemessene Enzymaktivität beobachtet werden

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

---

- [1] S. M. DENEKE, B. L. FANBURG; Regulation of cellular glutathione, *Am. J. Physiol.* **257**, L163-L173 (1989).
- [2] R. N. ARMSTRONG; Structure, Catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases, *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 2-18 (1997).
- [3] K. D. TEW, R. ABHIJIT: Glutathione S-transferases. In: Drug resistance; W. N. HAIT (Hrsg.); Boston/Dordrecht/London; Kluwert Academic Publishers; (1996): S.83-122.
- [4] A. MEISTER; Glutathione metabolism and its selective modification, *J. Biol. Chem.* **263**, 17205-17208 (1988).
- [5] P. G. PENKETH, K. SHYAM, A.C. SARTORELLI: Mechanisms of resistance to alkylating agents. In: Drug Resistance; W. N. Hait (Hrsg.); Boston/Dordrecht/London; Kluwert Academic Publishers; (1996): S.65-81.
- [6] T. ISHIKAWA; The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump, *Trends Biochem. Sci.* **17**, 463-468 (1992).
- [7] M. HEIJN, R. P. J. OUDE ELFERINK, P. M. L. JANSEN; ATP-dependent multispecific organic anion transport system in rat erythrocyte membrane Vesicles, *Am. J. Physiol.* **262**, C104-C110 (1992).
- [8] M. M. GOTTERSMAN, I. PASTAN; Biochemistry of multidrug-resistance mediated by the multidrug transporter, *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 385-427 (1993).
- [9] G. LITWACK, B. KETTERER, I. M. ARIAS; Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions, *Nature* **234**, 466-467 (1971).



- [10] P. REINEMER, H. W. DIRR, R. LADENSTEIN, R. HUBER, M. LO BELLO, G. FEDERICI, M. W. PARKER; Three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase from human placenta in complex with S-hexylglutathione at 2.8 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **227**, 214-226 (1992).
- [11] A. E. SALINAS, M. G. WONG; Glutathione S-transferases - a review, *Curr. Med. Chem.* **6**, 279-309 (1999).
- [12] J. D. HAYES, R. C. STRANGE; Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences, *Pharmacol.* **61**, 154-166 (2000).
- [13] P. G. BOARD, M. COGGAN, G. CHELVANAYAGAM, S. EASTEAL, L. S. JERMIIN, G. K. SCHULTE, D. E. DANLEY, L. R. HOTH, M. C. GRIFFOR, A. V. KAMATH, M. H. ROSNER, B. A. CHRUNYK, D. E. PERREGAUX, C. A. GABEL, K. F. GEOGHEGAN, J. PANDIT; Identification, characterization, and crystal structure of the omega class glutathione transferases, *J. Biol. Chem.* **275**, 24798-24806 (2000).
- [14] D. SHEENAN, G. MEADE, V. M. FOLEY, C. A. DOWD; Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily, *Biochem. J.* **360**, 1-16 (2001).
- [15] I. SINNING, G. J. KLEYWEGT, S. W. COWAN, B. OLIN, B. MANNERVIK, P. G. BOARD, P. REINEMER, H. W. DIRR, R. HUBER, R. N. ARMSTRONG, G. L. GLLILAND, T. A. JONES; Structure determination and refinement of human alpha class glutathion S-transferase A1-1, and a comparison with the mu and pi class enzymes, *J. Mol. Biol.* **232**, 192-212 (1993).
- [16] B. MANNERVIK, Y. AWASHTI, P. G. BOARD, J. HAYES, D. LLIO, B. KETTERER, I. LISTOWSKY, R. MORGENSTERN, M. MURAMATSU, W. PEARSON, C. PICKETT, K. SATO, M. WIDERSTEN, C. WOLF; Nomenclature for human glutathione transferases, *Biochem. J.* **282**, 305-306 (1992).

- [17] B. KETTERER, D. J. MEYER, A. G. CLARK: Soluble glutathione transferase isozymes. In: Glutathione conjugation; B. KETTERER, H. SIES (Hrsg.); London; Academic Press; (1988): S.73-135.
- [18] C. ANDERSSON, E. MOSIALOU, R. WEINANDER, R. MORGENSTERN; Enzymology of microsomal glutathione S-transferase, *Adv. Pharmacol.* **27**, 19-35 (1994).
- [19] G. F. GRAMINSKI, P. ZHANG, M. A. SESAY, H. L. AMMON, R. N. ARMSTRONG; Formation of the 1-(S-glutathionyl)-2,4,6-trinitrocyclohexadienate anion at the active site of glutathione S-transferase: evidence for enzymic stabilization, *Biochemistry* **28**, 6252-6258 (1989).
- [20] G. F. GRAMINSKI, Y. KUBO, R. N. ARMSTRONG; Spectroscopic and kinetic evidence for the thiolate anion of glutathione at the active site of glutathione S-transferase, *Biochemistry* **28**, 3562-3568 (1989).
- [21] L. YENGI, A. INSKIP, J. GILFORD, J. ALLDERSEA, L. BAILEY, A. SMITH, J. T. LEAR, A. H. HEAGERTY, B. BOWERS, P. HAND, J. D. HAYES, P. W. JONES, R. C. STRANGE, A. A. FRYER; Polymorphism at the glutathione S-transferase locus GSTM3: interactions with cytochrome P450 and glutathione S-transferase genotypes as risk factors for multiple cutaneous basal cell carcinoma. *Cancer Res.* **56**, 1974-1977 (1996).
- [22] P. J. SHERRATT, D. J. PULFORD, D. J. HARRISON, T. GREEN, J. D. HAYES; Evidence that human class Theta glutathione S-transferase T1-1 can catalyse the activation of dichloromethane, a liver and lung carcinogen in the mouse. Comparison of the tissue distribution of GSTT1-1 with that of classes Alpha, Mu and Pi GST in human, *Biochem. J.* **326**, 837-846 (1997).
- [23] R. GARNIER, M. O. RAMBOURG-SCHEPENS, A. MÜLLER, E. HALLIER; Glutathione transferase activity and formation of macromolecular adducts in two cases of acute methyl bromide poisoning, *Occ. Environn. Med.* **53**, 211-215 (1996).

- [24] S. S. THORGEIRSSON, J. A. SILVERMAN, T. W. GANT, P. A. MARINO; Multidrug resistance gene family and chemical carcinogens, *Pharmacol. Ther.* **49**, 283-292 (1991).
- [25] C. S. MORROW, K. COWAN: The underlying molecular, cellular and immunological factors in cancer and aging. In: Drug resistance and cancer; S. S. YANG, H. R. WARNER (Hrsg.); New York; Plenum Press; (1993): S.287-305.
- [26] A. L. HARRIS: Mechanisms of anticancer drug resistance. In: Glutathione S-transferases and drug resistance; J. D. HAYES, C. B. PICKETT, T. J. MANTLE (Hrsg.); London; Taylor & Francis; (1990): S.283-293.
- [27] A. G. HALL, M. J. TILBY; Mechanisms of action of, and modes of resistance to, alkylating agents used in the treatment of haematological malignancies, *Blood Review* **6**, 163-173 (1992).
- [28] K. UEDA, C. CARDARELLI, M. GOTTESMAN, I. PASTAN; Expression of a full-length cDNA for the human MDR1 gene confers resistance to colchicine, doxorubicin and vinblastine, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **84**, 3004-3008 (1987).
- [29] K. NOOTER, H. HERWEIJER; Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer, *Br. J. Cancer* **63**, 663-669 (1991).
- [30] J. L. NITISS, W. T. BECK: Antitopoisomerase drug action and resistance. In: Special Issue: Multidrug resistance in cancer; M. LEHNERT, P. TWENTYMAN (Hrsg.); Pergamon Press; (1996): S.958-966.
- [31] R. A. KRAMER, J. ZAKHER, G. KIM; Role of the glutathione redox cycle in acquired and de novo multidrug resistance, *Science* **241**, 694-697 (1988).
- [32] K. D. TEW; Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance, *Cancer Res.* **54**, 4313-4320 (1994).

- [33] J. HUANG, M. GU, C. CHEN; Expression of glutathione S-transferase-pi in operative specimens as marker of chemoresistance in patients with ovarian cancer, *Thonghua Fu Chan Ke Za Zhi* **32**, 458-461 (1997).
- [34] P. R. KEARNS, Z. M. A. CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS, R. PIETERS, A. VEERMAN, A. G. HALL; Mu class glutathione S-transferase mRNA isoform expression in acute lymphoblastic leukaemia, *Br. J. Haematol.* **120**, 80-88 (2003).
- [35] C. S. MORROW, P. K. SMITHERMAN, S. K. DIAH, E. SCHNEIDER, A. J. TOWNSEND; Coordinated Action of Glutathione S-transferases (GSTs) and multidrug resistance protein 1 (MRP1) in antineoplastic drug detoxification, *J. Biol. Chem.* **273**, 20114-20120 (1998).
- [36] G. CHEN, D. J. WAXMAN; Role of cellular glutathione and glutathione S-transferase in the expression of alkylating agent cytotoxicity in human breast cancer cells, *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1079-1087 (1994).
- [37] K. D. TEW, A. M. BOMBER, S. J. HOFFMAN; Ethacrynic acid and piriprost as enhancers of cytotoxicity in drug resistant and sensitive cell lines, *Cancer Res.* **48**, 3622-3625 (1988).
- [38] J. K. HANSSON, K. BERHANE, V. M. CASTRO, U. JUNGNELIUS, B. MANNERVIK, U. RINGBORG; Sensitization of human melanoma cells to the cytotoxic effect of melphalan by the glutathione transferase inhibitor ethacrynic acid, *Cancer Res.* **51**, 94-98 (1991).
- [39] P. B. CAFFREY, M. ZHU, Y. ZHANG, N. CHINEN, G. D. FRENKEL; Rapid development of glutathione-S-transferase-dependent drug resistance in vitro and its prevention by ethacrynic acid, *Cancer Letters* **136**, 47-52 (1999).
- [40] P. J. O'DWYER, F. LACRETA, S. NASH, P. W. TINSLEY, R. SCHILDER, M. L. CLAPPER, K. D. TEW, L. PANTING, S. LITWIN, R. COMIS, R. F. OZOLS; Phase I study of thiotepa in combination with the glutathione transferase inhibitor ethacrynic acid, *Cancer Res.* **51**, 6059-6065 (1991).

- [41] V. GUPTA, J. P. JANI, S. JACOBS, M. LEVITT, L. FIELDS, S. AWASTHI, B. H. XU, M. SREEVARDHAN, Y. C. AWASTHI, S. V. SINGH; Activity of melphalan in combination with the glutathione transferase inhibitor sulfasalazine, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **36**, 13-19 (1995).
- [42] F. P. LACRETA, J. M. BRENNAN, S. L. NASH, R. L. COMIS, K. D. TEW, P. J. O'DWYER; Pharmacokinetics and bioavailability study of ethacrynic acid as a modulator of drug resistance in patients with cancer, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**, 1186-1191 (1994).
- [43] H. SHEN, S. RANGANATHAN, S. KUZMICH, K. D. TEW; Influence of ethacrynic acid on glutathione *S*-transferase pi transcript and protein half-lives in human colon cancer cells, *Biochem. Pharmacol.* **50**, 1233-1238 (1995).
- [44] S. KUZMICH, L. A. VANDERVEER, E. L. WALSH, F. P. LACRETA, K. D. TEW; Increased levels of glutathione *S*-transferase pi transcript as a mechanism of resistance to ethacrynic acid, *Biochem. J.* **281**, 219-224 (1992).
- [45] J. H. T. M. PLOEMEN, B. van OMMEN, P. J. VAN BLADEREN; Inhibition of rat and human glutathione *S*-transferase isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathione conjugation, *Biochem. Pharmacol.* **40**, 1631-1635 (1990).
- [46] A.-S. JOHANSSON, M. RIDDERSTRÖM, B. MANNERVIK; The human glutathione transferase p1-1 specific inhibitor TER 117 designed for overcoming cytostatic-drug resistance is also a strong inhibitor of glyoxalase I, *Mol. Pharmacol.* **57**, 619-624 (2000).
- [47] T. KUNZE; Phosphono analogues of glutathione as new inhibitors of glutathione *S*-transferases, *Arch. Pharm.* **329**, 503-509 (1996).
- [48] A. E. P. ADANG, J. BRUSSEE, A. VAN DER GEN, G. J. MULDER; Inhibition of RAT LIVER GLUTATHIONE *S*-transferase isoenzymes by peptides stabilized against degradation by g-glutamyl transpeptidase, *J. Bio. Chem.* **266**, 830-836 (1991).

- [49] S. OUWERKERK-MAHADEVAN, R. G. TIRONA, R. A. RIPPING, J. H. T. PLOEMEN, P. J. VAN BLADEREN, K. S. PANG, J. H. VAN BOOM, G. J. MULDER; Inhibition of glutathione conjugation by glutathione analogues in the perfused rat liver. Effect of esterification on the potency of  $\gamma$ -L-glutamyl- $\alpha$ -(D-2-aminoadipyl)-*N*-2-heptylamine, *Drug Metabolism and Disposition* **25**, 1137-1143 (1997).
- [50] T. KUNZE, S. HEPS; Phosphono analogs of glutathione: inhibition of glutathione transferases, metabolic stability, and uptake by cancer cells, *Biochem. Pharmacol.* **59**, 973-981 (2000).
- [51] A. GIANNIS, T. KOLTER; Peptidmimetica für Rezeptorliganden - Entdeckung, Entwicklung und medizinische Perspektiven, *Angew. Chem.* **105**, 1303-1326 (1993).
- [52] H.-J. BÖHM, G. KLEBE, H. KUBINYI: Wirkstoffdesign; Heidelberg/Berlin/Oxford; Spektrum Verlag; (1996): S.494-504.
- [53] D. Burg, P. Wielinga, N. Zelcker, T. Saeki, G. J. Mulder, P. Borst; Inhibition of the multidrug resistance protein (MRP1) by peptidomimetic Glutathione-conjugate analogs, *Molecular Pharmacology* **62**, 1160-1166 (2002).
- [54] B. A. ARBUSOW; Michaelis-Arbusow- und Perkow-Reaktionen, *Pure Appl. Chem.* **9**, 307-335 (1967).
- [55] E. C. R. SMITH, L. A. MCQUAID, J. W. PASCHAL, J. DEHONIESTO; An enantioselective synthesis of D-(-)- and L-(+)-2-amino-3-phosphonopropanoic Acid, *J. Org. Chem.* **55**, 4472-4474 (1990).
- [56] D. V. PATEL, R. J. SCHMIDT, S. A. BILLER, E. M. GORDON, S. S. ROBINSON, V. MANNE; Farnesyl diphosphate-based inhibitors of ras farnesyl protein transferase, *J. Med. Chem.* **38**, 2906-2921 (1995).
- [57] M. E. GELBIN, J. KROHN; Synthesis and polymerization of *N*-Z-L-serine- $\beta$ -lactone and serine hydroxybenzotriazole Active Esters, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 3962-3965 (1992).

- [58] L. D. ARNOLD, T. H. KALANTAR J. C. VEDERAS; Conversion of serine to stereochemically pure  $\beta$ -substituted  $\alpha$ -amino acids via  $\beta$ -lactones, *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7105-7109 (1985).
- [59] G. SUN; Synthesis of chiral 1-(2'-amino-2'-carboxyethyl)-1,4-dihydro-6,7-quinoxaline-2,3-diones:  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor agonists and antagonists, *J. Med. Chem.* **39**, 4430-4438 (1996).
- [60] T. YOKOMATSU, M. SATO, S. SHIBUYA; Lipase-catalyzed enantioselective acylation of prochiral 2-( $\omega$ -phosphono)alkyl-1,3-propanediols: application to the enantioselective synthesis of  $\omega$ -phosphono- $\alpha$ -amino acids, *Tetrahedron Asymmetry* **7**, 2743-2754 (1996).
- [61] G. T. OLSON, M. FU, S. LAU, K. L. RIENHART, R. B. SILVERMAN; An aromatization mechanism of inactivation of  $\gamma$ -aminobutyric acid aminotransferase for the antibiotic L-cycloserine, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 2256-2267 (1998).
- [62] E. HARDEGGER, F. SZABO, P. LIECHTI, Ch. ROSETTER, W. ZANKOWSKA-JASINSKA; Zwischenprodukte zur Synthese von Verbindungen der Lycomarasin-Reihe aus Glycin und L-Serin, *Helv. Chim. Acta* **51**, 78-85 (1968).
- [63] N. TAMURA, Y. MATSUSHITA, K. YOSHIOKA, M. OCHIAI; Synthesis of lactivicin analogues, *Tetrahedron* **44**, 3231-3240 (1988).
- [64] J. J. GOODSON, C. J. WHARTON, R. WRIGGLESWORTH; Inhibitors of pyrimidine biosynthesis. part 1. synthesis of potential transition-state analogues of aspartate transcarbamylase, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1*, 2721-2727 (1980).
- [65] D. L. JAKEMAN, A. J. IVORY, M. P. WILLIAMSON, G. M. BLACKBURN; Highly potent bisphosphonate ligands for phosphoglycerate kinase, *J. Med. Chem.* **41**, 4439-4452 (1998).

- [66] U. SCHMIDT, A. LIEBERKNECHT, J. WILD; Amino acids and peptides; XLIII. dehydroaminoacids; XVIII. Synthesis of dehydroamino acids and amino acids from *N*-acyl-2-(dialkyloxyphosphinyl) , *Synthesis*, 53-60 (1984).
- [67] G. CAMPIANI, M. DE ANGELIS, S. ARMAROLI, C. FATTORUSSO, B. CATALANOTTI, A. RAMUNNO, V. NACCI, E. NOVELLINO, C. GREWER, D. IONESCU, T. RAUEN, R. GRIFFITHS, C. SINCLAIR, E. FUMAGALLI, T. MENNINI; A rational approach to the design of selective substrates and potent nontransportable inhibitors of the excitatory amino acid transporter EAAC1 (EAAT3). New glutamate and aspartate analogues as potential neuroprotective agents, *J. Med. Chem.* **44**, 2507-2510 (2001).
- [68] G. M. KOSOLAPOFF; Isomerization of alkyl phosphites. V. The synthesis of phosphonoacetic and phosphonomalonic esters, *J. Amer. Chem. Soc.* **68**, 1103-1105 (1946).
- [69] N. KREUTZKAMP; Über Carbonyl- und Cyan-phosphonsäure-ester. I. Mitteil.: Darstellung von Phosphono-acetessigester und -malonester durch Acylierungsreaktionen, *Chem. Ber.* **88**, 195-198 (1955).
- [70] J. E. THOMPSON; Enol and acyl phosphates as intermediates in the synthesis of nonrandom triglycerides, *J. Org. Chem.* **30**, 4276-4280 (1965).
- [71] J. MOTOYOSHIYA, A. TERANISHI, R. MIKOSHIBA, I. YAMAMOTO, H. GOTOH; *C*-Phosphonoketenimines, characterization and synthetic application to heterocycles, *J. Org. Chem.* **45**, 5385-5387 (1980).
- [72] U. ZOLLER, D. BEN-ISHAI; Amidoalkylation of mercaptans with glyoxylic acid derivatives, *Tetrahedron* **31**, 863-866 (1975).
- [73] H. FRIEBOLIN: Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: eine Einführung; Weinheim/Basel/Cambridge/New York; VCH; (1992).
- [74] R. Shankar, A. I. Scott; A convenient synthesis of 2-(diethoxyphosphonyl)glycine and its derivatives, *Tetrahedron Letters* **34**, 231-234 (1993).



- [75] L. FERRIS, D. HAIGH, C. J. MOODY; N-H Insertion reactions of rhodium carbenoids. Part 2. Preparation of *N*-substituted amino(phosphoryl)acetates (*N*-substituted phosphorylglycine esters), *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1* **24**, 2885-2888 (1996).
- [76] T. FUCHSS, R. R. SCHMIDT; Synthesis of the C-analog of 2-acetylamino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl L- and D-serine, *Synthesis* **5**, 753-758 (1998).
- [77] N. SUBASINGHE, M. SCHULTE, M. Y.-M. CHAN, R. J. ROON, J. F. KOERNER, R. L. JOHNSON; Synthesis of acyclic and dehydroaspartic acid analogues of Ac-Asp-Glu-OH and their inhibition of rat brain *N*-acetylated  $\alpha$ -linked dipeptidase (NAALA dipeptidase), *J. Med. Chem.* **33**, 2734-2744 (1990).
- [78] W. YE, X. LIAO; Synthesis of dialkyl alkoxycarbonylmethanephosphonates (alkyl dialkoxyphosphinylacetates) using phase-transfer catalysis, *Synthesis*, 986-988 (1985).
- [79] A. M. POLZOV, N. A. POLZEHAIEVA, A. H. MUSTAPHIN, A. V. KHOTIONEN, B. A. ARBUZOV; A new one-pot synthesis of dialkyl phosphonates from diazo compounds and dialkyl hydrogen phosphites, *Synthesis* **6**, 515-517 (1990).
- [80] P. F. ALEWOOD, R. B. JOHNS; An improved synthesis of *N* <sup>$\delta$</sup> -(phosphonoacetyl)-L-ornithine, *Synthesis* **5**, 403-404 (1984).
- [81] J. GLOEDE, H. GROSS, P. HENKLEIN, N. NIEDRICH, ST. TANNEBERGER, B. TSCHIERSCHE; Synthese von *N*-(Phosphonoacetyl)-L-asparaginsäure (PALA), *Pharmazie* **43**, 434 (1998).
- [82] D. J. GUSTIN, D. HILVERT; Chemoenzymatic synthesis of isotopically labeled chorismic acids, *J. Org. Chem.* **64**, 4935-4938 (1999).
- [83] D. HELLWINKEL, T. KOSACK; Zur sukzessiven Umhüllung des Benzolkerns mit gesättigten Ringen, *Liebigs Ann. Chem.* **2**, 226-238 (1985).

- [84] B. M. O'LEARY, T. SZABO, N. SVENSTRUP, C. A. SCHALLEY, A. LÜTZEN, M. SCHÄFER, J. REBEK; "Flexiball" toolkit: A modular approach to self-assembling capsules, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 11519-11533 (2001).
- [85] S. HEPS; Die Modulation der Zytostatikawirkung durch Phosphono-Analoga des Glutathions, Dissertation, Universität Kiel (1998).
- [86] a) H. M. BERMAN, J. WESTBROOK, Z. FENG, G. GILLILAND, T. N. BHAT, H. WEISSIG, I. N. SHINDYALOV, P. E. BOURNE; The protein data bank, *Nucleic Acids Research* **28**, 235-242 (2000). b) <http://www.rcsb.org/pdb/>
- [87] A. D. CAMERON, I. SINNING, G. L'HERMITE, B. OLIN, P. G. BOARD, B. MANNERVIK, T. A. Jones; Structural analysis of human alpha-class glutathione transferase A1-1 in the apo form and in complexes with ethacrynic acid and its glutathione, *Structure* **3**, 717-727 (1995).
- [88] S. RAGHUNATHAN, R. J. CHANDROSS, R. H. KRETSINGER, T. J. ALLISON, C. J. PENINGTON, G. S. RULE; Crystal structure of human class mu glutathione transferase GSTM2-2. Effects of lattice packing on conformational heterogeneity, *J. Mol. Biol.* **238**, 815-832 (1994).
- [89] M. LO BELLO, A. J. OAKLEY, A. BATTISTONI, A. P. MAZZETTI, M. NUC CETELLI, G. MAZZARESE, J. ROSSJOHN, M. W. PARKER, G. RICCI; Multifunctional role of Tyr 108 in the catalytic mechanism of human glutathione transferase P1-1. Crystallographic and kinetic studies on the Y108F mutant enzyme, *Biochemistry* **36**, 6207-6217 (1997).
- [90] J. ROSSJOHN, W. J. MCKINSTY, A. J. OAKLEY, M. W. PARKER, G. STENBERG, B. MANNERVIK, B. DRAGANI, R. COCCO, A. ACETO; Structures of thermolabile mutants of human glutathione transferase P1-1, *J. Mol. Biol.* **302**, 295-302 (2000).

- [91] G. K.-W. KONG, B. DRAGANI, A. ACETO, R. COCCO, B. MANNERVIK, G. STENBERG, W. J. MCKINSTRY, G. POLEKHINA, M. W. PARKER; Contribution of glycine 146 to a conserved folding module affecting stability and refolding of human GstP1-1, *To be Published*, (2002).
- [92] A. J. OAKLEY, M. LO BELLO, A. M. CACCURI, G. FEDERICI, M. W. PARKER; The structure of the human pi class glutathione transferase P1-1 Tyr 49-Phe mutant, *To be Published* (1999).
- [93] X. JI, M. TORDOVA, R. O'DONNELL, J. F. PARSONS, J. B. HAYDEN, G. L. GILLILAND, P. ZIMNIAK; structure and function of the xenobiotic substrate-binding site and location of a potential non-substrate-binding site in a class pi glutathione S-transferase, *Biochemistry* **36**, 9690-9702 (1997).
- [94] X. JI, J. BLASZCZYK, B. XIAO, R. O'DONNELL, X. HU, C. HERZOG, S. V. SINGH, P. ZIMNIAK; Structure and function of residue 104 and water molecules in the xenobiotic substrate-binding site in human glutathione S-transferase P1-1, *Biochemistry* **38**, 10231-10238 (1999).
- [95] Y. V. PATSKOVSKY, L. N. PATSKOVSKA, I. LISTOWSKY; Functions of His107 in the catalytic mechanism of human glutathione S-transferase hGSTM1a-1a, *Biochemistry* **38**, 1193-1202 (1999).
- [96] G. K.-W. KONG, C. MICALONI, A. P. MAZZETTI, M. NUC CETELLI, G. ANTONINI, L. STELLA, W. J. MCKINSTRY, G. POLEKHINA, J. ROSSJOHN, G. FEDERICI, G. RICCI, M. W. PARKER, M. LO BELLO; Engineering a new C-terminal tail in the H-site of human glutathione transferase P1-1: structural and functional consequences, *To be Published* (2002).
- [97] I. LE TRONG, R. E. STENKAMP, C. IBARRA, W. M. ATKINS, E. T. ADMAN; 1.3-Å Resolution structure of human glutathione S-transferase with S-hexyl glutathione bound reveals possible extended ligandin binding site, *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **48**, 618-627 (2002).

- [98] C. M. BRUNS, I. HUBATSCH, M. RIDDERSTRÖM, B. MANNERVIK, J. A. TAINER; Human glutathione transferase A4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products, *J. Mol. Biol.* **288**, 427-439 (1999).
- [99] Y. V. PATSKOVSKY, L. N. PATSKOVSKA, I. LISTOWSKY; Homo and heterodimeric human Mu-class glutathione S-transferases: structure- function relationships, *To be Published* (1999).
- [100] Y. V. PATSKOVSKY, L. N. PATSKOVSKA, I. LISTOWSKY; An asparagine-phenylalanine substitution accounts for catalytic differences between hGSTM3-3 and other human class mu glutathione S-transferases, *Biochemistry* **38**, 16187-16194 (1999).
- [101] L. PRADE, R. HUBER, T. H. MANOHARAN, W. E. FAHL, W. REUTER; Structures of class pi glutathione S-transferase from human placenta in complex with substrate, transition-state analogue and inhibitor, *Structure* **5**, 1287-1295 (1997).
- [102] A. J. OAKLEY, J. ROSSJOHN, M. LO BELLO, A. M. CACCURI, G. FEDERICI, M. W. PARKER; The three-dimensional structure of the human Pi class glutathione transferase P1-1 in complex with the inhibitor ethacrynic acid and its glutathione conjugate, *Biochemistry* **36**, 576-585 (1997).
- [103] A. J. OAKLEY, M. L. BELLO, A. BATTISTONI, G. RICCI, J. ROSSJOHN, H. O. VILLAR, M. W. PARKER; The structures of human glutathione transferase P1-1 in complex with glutathione and various inhibitors at high resolution, *J. Mol. Biol.* **274**, 84-100 (1997).
- [104] A. J. OAKLEY, M. LO BELLO, A. P. MAZZETTI, G. FEDERICI, M. W. PARKER; The glutathione conjugate of ethacrynic acid can bind to human pi class glutathione transferase P1-1 in two different modes, *FEBS Lett.* **419**, 32-36 (1997).

- [105] A. J. OAKLEY, M. W. PARKER; Novel binding sites on glutathione S-transferase P1-1, *To be Published* (1999).
- [106] A. J. OAKLEY, M. LO BELLO, G. RICCI, G. FEDERICI, M. W. PARKER; Evidence for an induced-fit mechanism operating in Pi class glutathione transferases, *Biochemistry* **37**, 9912-9917 (1998).
- [107] A. J. OAKLEY, M. W. PARKER; The Structure of the glutathione S-transferase P1-1, *To be Published* (1998).
- [108] A. J. OAKLEY, M. LO BELLO, A. M. CACCURI, G. FEDERICI, M. W. PARKER; The structure of the human Pi class glutathione transferase P1-1 in complex with the anti-cancer drug chlorambucil, *To be Published* (1999).
- [109] J. ROSSJOHN, W. J. MCKINSTRY, A. J. OAKLEY, D. VERGER, J. FLANAGAN, G. CHELVANAYAGAM, K. L. TAN, P. G. BOARD, M. W. PARKER; Human theta class glutathione transferase: the crystal structure reveals a sulfate-binding pocket within a buried active site, *Structure* **6**, 309-322 (1998).
- [110] G. POLEKHINA, P. G. BOARD, A. C. BLACKBURN, M. W. PARKER; Crystal structure of maleylacetoacetate isomerase/glutathione transferase zeta reveals the molecular basis for its remarkable catalytic promiscuity, *Biochemistry* **40**, 1567-1576 (2001).
- [111] H. DIRR, P. REINEMER, R. HUBER; Refined crystal structure of porcine class Pi glutathione S-transferase (pGST P1-1) at 2.1 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **243**, 72-92 (1994).
- [112] M. K. TAHIR, B. MANNERVIK; Simple inhibition studies for distinction between homodimeric and heterodimeric isoenzymes of glutathione transferase, *J. Biol. Chem.* **261**, 1048-1051 (1986).
- [113] W.-J. CHEN, D. Y. LEE, R. N. ARMSTRONG; *N*<sup>4</sup>-(Malonyl-D-cysteinyl)-L-2,4-diamino-butyrates: The end-group-modified retro-inverso isomer of glutathione, *J. Org. Chem.* **51**, 2848-2850 (1986).

- [114] Autorenkollektiv: Organikum, 18. Aufl.; Berlin; Deutscher Verlag der Wissenschaften; (1990): S.638-659.
- [115] D-R. HWANG, P. HELQUIST, M. S. SHEKHANI; Total synthesis of (+)-sparsomycin. Approaches using cysteine and serine inversion, *J. Org. Chem.* **50**, 1264-1271 (1985).
- [116] J. Sander, H. Waldmann; Enzymatic protection group techniques for glyco- and phosphopeptide chemistry: Synthesis of a glycophosphopeptide from human serum response factor, *Chem. Europ. J.* **6**, 1564 – 1577 (2000).
- [117] E. SCHNABEL; Die Aktivierung von Acylaminosäuren und Acylpeptiden mit Dicyclohexylcarbodiimid, *Liebigs Ann. Chem.* **688**, 238-249 (1965).
- [118] G. D. MONACHE, M. C. DI GIOVANNI, F. MAGGIO, D. MISITI; G. Zappia; Convenient preparation of *O*-benzyl-*N*-cbz-D-serinol, an intermediate in  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acid synthesis; *Synthesis*, 1155-1158 (1995).
- [119] P. A. EVANS, A. B. HOLMES, K. J. RUSSELL; New synthetic methodology for the synthesis of 7-substituted tetrahydroazepin-2-ones; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **23**, 3397-3410 (1994).
- [120] T. KAMIJO, H. HARADA, K. IIZUKA; A novel one step conversion of alcohols into alkyl bromides or iodides, *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 4189-4192 (1983).
- [121] D. J. MARTIN, C.E. GRIFFIN; The determination of polar substituent constants for the dialkoxy- and diarylphosphono and trialkyl- and triarylphosphonium groups, *J. Org. Chem.* **30**, 4034-4038 (1965).
- [122] W. H. HABIG, M. J. PABST, W. B. JAKOBY; Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation; *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139 (1974).

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazeutische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter Leitung von

**Herrn HD. Dr. T. Kunze.**

Für die mir in verschiedenen Diskussionen gebotenen Anregungen und die Möglichkeit zur Bearbeitung des interessanten Themas möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater bedanken.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. B. Clement herzlich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis danken. Seine Unterstützung von Fortbildungsmöglichkeiten und Übertragung von Verantwortungen hat mir den Einstieg in die Pharmazie sehr erleichtert.

Herrn Prof. Dr. D. Heber danke ich für die vielen Anregungen zu Themen der organischen Synthese und des Internets im Rahmen der wöchentlichen „wichtigen Besprechung“.

Ich möchte mich bei Maren für ihre praktische Unterstützung und ihr großes Engagement bei den nicht immer einfachen Synthesen ganz herzlich bedanken.

Für die Aufnahme der verschiedenen Spektren danke ich Susan, Maren und Melissa. Uli G. danke ich darüber hinaus für seine stete Bereitschaft zur fundierten Analyse von Problemen und seine alljährlichen spektroskopischen Übungen.

Inga B., Inga C., Inga Z., Jacek, Jens und insbesondere Ullvi und Martin möchte ich für die gute Zusammenarbeit im 2. Semester meinen Dank aussprechen.

Mein Dank richtet sich auch an alle Kollegen des Pharmazeutischen Institutes, insbesondere den AK Clement, für das gute und freundschaftliche Arbeitsklima sowie die mir erwiesene Hilfsbereitschaft. Besonders dankbar bin ich für die neu entstandenen Freundschaften zu Ilka, Kikki, Steffi, Uli W. und vor allem Katrin.

Für die sorgfältige Durchsicht des Manuskriptes möchte ich mich bei Ilka, Kirstin und besonders Katrin bedanken.

Unter meinen Freunden außerhalb der Naturwissenschaften geht mein Dank besonders an Marco dafür, dass er mich zum Sport brachte, an Stephen für seinen Humor und das DAB, an Diane für das zwischen uns entstandene Band und vor allem an Lothar und Markus für die vielen Jahre der Freundschaft auch über die großen Entfernungen hinweg.

Mein tiefster Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester Bettina für ihr Verständnis und ihre nicht nachlassende Unterstützung.

## LEBENS LAUF

---

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Vor- und Familienname	Andreas Andersen
Geburtsdatum	31. Oktober 1968
Geburtsort	Kiel
Staatsangehörigkeit	deutsch

### SCHULAU SBILDUNG

---

<i>1974 bis 1978</i>	Hans-Christian Andersen Grundschule, Kiel
<i>1978 bis 1988</i>	Hans-Geiger-Gymnasium, Kiel
<i>25. Mai 1988</i>	Allgemeine Hochschulreife

### WEHRDIENST

---

<i>Okt. 1988 bis Dez. 1989</i>	FlakKanonier in Lütjenburg
--------------------------------	----------------------------

### STUDIUM

---

<i>SS 1990 bis WS 1997/98</i>	Studium der Chemie an der Christian-Albrechts-Universität, Kiel
<i>Nov. 1993</i>	Diplom-Vorprüfungen
<i>April 1996</i>	Diplom-Hauptprüfungen
<i>Mai 1996 bis Dez. 1997</i>	Diplomarbeit mit dem Thema „Untersuchungen der Rotationshinderung um die P-C-Bindungen in <i>peri</i> -Naphthylen-diphosphinen“ am Institut für Organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Anleitung von Prof. Dr. G. P. Schiemenz
<i>WS 1998/1999</i>	Weiterführendes Studium der Mineralogie

### TÄTIGKEITEN

---

<i>Aug. 1996 bis Okt. 1996 und April bis Juli 1997</i>	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Organische Chemie
<i>April 1999 bis März 2003</i>	Wissenschaftlicher Angestellter am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
<i>Juli 2003 bis Nov. 2003</i>	Werkvertrag mit der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

### ANFERTIGUNG DER DISSERTATION

---

<i>01. April 1999</i>	Beginn der vorliegenden Dissertation unter Leitung von HD Dr. T. Kunze.
-----------------------	---



