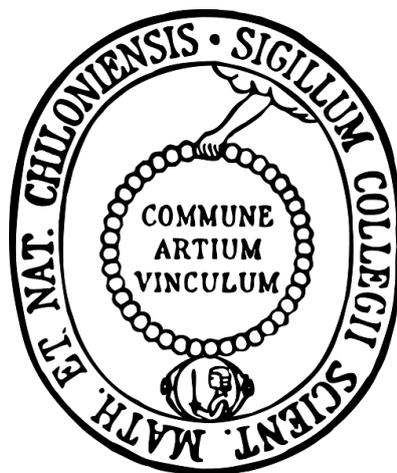


# Entwicklung neuer Inhibitoren der Enzyme Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase und Arginase



## Dissertation

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

vorgelegt von

**Ina Lunk**

Kiel 2012

Referent: Prof. Dr. Bernd Clement

Korreferent: Prof. Dr. Christian Peifer

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juli 2012

Zum Druck genehmigt: 02. Juli 2012

Prof. Dr. Lutz Kipp  
(Dekan)

*MEINER FAMILIE*

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis VII

## 1 Einleitung und Zielsetzung 1

---

1.1	Stickstoffmonoxid .....	1
1.2	L-Arginin .....	2
1.3	Regulation endogener NO-Konzentration .....	2
1.3.1	Allgemeine Übersicht .....	2
1.3.2	NO-Synthasen (NOSs).....	4
1.3.3	Arginase .....	9
1.3.4	Protein-Arginin-Methyl-Transferasen (PRMTs) .....	11
1.3.5	Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) .....	12
1.4	Therapeutische Beeinflussung der NO-Konzentration.....	14
1.4.1	Einleitung.....	14
1.4.2	NO-Donatoren und alternative NOS-Substrate .....	14
1.4.3	Hemmung der NOS .....	15
1.4.4	Hemmung der Arginase .....	15
1.4.5	Modulation der DDAH .....	17
1.4.5.1	Aktivierung .....	17
1.4.5.2	Hemmung.....	19
1.5	Zielsetzung der Arbeit .....	22
1.5.1	DDAH-Inhibitoren.....	22
1.5.2	Arginase-Inhibitoren.....	25

## 2 *Molecular Modeling* an der hDDAH-1 26

---

2.1	Einleitung und Zielsetzung .....	26
2.2	Kristallstrukturen der hDDAH-1 .....	29
2.3	Design eines Modells .....	31
2.3.1	Verbindungen für Trainingsdatensatz.....	32
2.3.2	Docking in Moloc .....	33
2.3.3	Berechnungen mit DrugScore – AFMoC .....	33

2.3.3.1	Trainingsdatensatz .....	33
2.3.3.2	Testdatensatz .....	36
2.3.4	Auswertung und Diskussion .....	38
2.4	<i>Molecular Modeling</i> mit der Schrödinger Software.....	41
2.4.1	Einleitung.....	41
2.4.2	Docking-Analyse .....	41
2.4.2.1	Vergleich der polaren Kontakte von 2JAJ und 3I4A .....	41
2.4.2.2	Berechnung von Docking-Scores.....	43
2.4.3	Abschließende Beurteilung.....	44
2.5	Zusammenfassung .....	45
<b>3</b>	<b>Hemmung der hDDAH-1</b> .....	<b>46</b>
3.1	Einleitung .....	46
3.2	Methoxyalkylamidine .....	46
3.2.1	Einleitung.....	46
3.2.2	Synthesestrategien .....	47
3.2.3	<i>In vitro</i> Hemmdaten an den Enzymen des NO-Stoffwechsels .....	54
3.2.3.1	Hemmung der DDAH .....	54
3.2.3.2	Hemmung der NOSs .....	55
3.2.3.3	Hemmung der Arginase .....	56
3.2.4	Diskussion.....	57
3.3	<i>N</i> -Aminobutyl- <i>N'</i> -3-butenylguanidin (AbBG).....	60
3.3.1	Einleitung.....	60
3.3.2	Synthese .....	60
3.3.3	<i>In vitro</i> Hemmdaten an den Enzymen des NO-Stoffwechsels .....	61
3.3.4	Diskussion.....	62
3.4	Anwendung von Prodrug-Strategien .....	63
3.4.1	Einleitung und Zielsetzung .....	63
3.4.2	Synthesestrategien .....	64
3.4.3	Spektroskopische Analytik .....	73
3.4.3.1	Einleitung .....	73
3.4.3.2	<sup>1</sup> H-NMR-Spektrum .....	73
3.4.3.3	<sup>13</sup> C-NMR-Spektrum .....	75
3.4.3.4	<sup>15</sup> N-NMR-Spektrum.....	76

3.4.3.5	Auswertung und Diskussion .....	77
3.4.4	Physikochemische Eigenschaften .....	78
3.4.4.1	Einleitung .....	78
3.4.4.2	Berechnung der pK <sub>a</sub> -Werte .....	78
3.4.4.3	Berechnung der Protonierungs-Zustände ( <i>microspecies distribution</i> ).....	80
3.4.4.4	Lipinski´s <i>Rule of Five</i> .....	82
3.4.4.5	pH-Wert-abhängige hydrolytische Stabilität .....	83
3.4.4.6	Diskussion.....	85
3.4.5	Untersuchungen zur Bioaktivierung des Hydroxyguanidins 32a .....	86
3.4.5.1	Einleitung und Zielsetzung .....	86
3.4.5.2	Ergebnisse und Diskussion .....	87
3.4.5.2.1	Kalibrierung und Wiederfindung.....	87
3.4.5.2.2	<i>In vitro</i> Reduktionsassay mit subzellulären Fraktionen.....	89
3.4.5.2.3	<i>In vitro</i> Reduktionsassay mit dem rekombinantes Enzymsystem.....	90
3.4.6	Diskussion.....	91
3.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	93
<b>4</b>	<b>Hemmung der Arginase</b> .....	<b>96</b>
4.1	Einleitung und Zielsetzung.....	96
4.2	Synthese.....	96
4.3	<i>In vitro</i> -Testung an der Arginase.....	104
4.4	Diskussion und Ausblick.....	105
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil</b> .....	<b>113</b>
6.1	Synthesen.....	113
6.1.1	Geräte und Materialien .....	113
6.1.2	Synthesevorschriften.....	115
6.1.2.1	Darstellung von Methoxyalkylamidinen.....	115
6.1.2.1.1	4-Methoxybutyronitril (8) <sup>[157]</sup> .....	115
6.1.2.1.2	Methoxyalkylimidoester.....	116
6.1.2.1.2.1	2-Methoxyethanimidsäuremethylester Hydrochlorid (9a) .....	116
6.1.2.1.2.2	3-Methoxypropanimidsäuremethylester Hydrochlorid (9b) .....	117

6.1.2.1.2.3	4-Methoxybutanimidsäuremethylester Hydrochlorid (9c) .....	118
6.1.2.1.3	Methoxyalkylamidine, geschützte Vorstufen .....	119
6.1.2.1.3.1	$N^2$ -( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- $N^5$ -(1-imino-2-methoxyethyl)-L-ornithin- <i>t</i> -butylester Hydrochlorid (12a) .....	120
6.1.2.1.3.2	$N^2$ -( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- $N^5$ -(1-imino-3-methoxypropyl)-L-ornithin- <i>t</i> -butylester Hydrochlorid (12b) .....	121
6.1.2.1.3.3	$N^2$ -( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- $N^5$ -(1-imino-4-methoxybutyl)-L-ornithin- <i>t</i> -butylester Hydrochlorid (12c) .....	122
6.1.2.1.3.4	$N$ -[4-( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)-aminobutyl]methoxymethanamidin Hydrochlorid (13a) .....	123
6.1.2.1.3.5	$N$ -[4-( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)-aminobutyl]-2-methoxyethanamidin Hydrochlorid (13b) .....	124
6.1.2.1.3.6	$N$ -[4-( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)-aminobutyl]-3-methoxypropanamidin Hydrochlorid (13c) ..	125
6.1.2.1.3.7	$N^2$ -( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- $N^4$ -(1-imino-4-methoxybutyl)- <i>nor</i> -L-ornithin- <i>t</i> -butylester Hydrochlorid (20) .....	126
6.1.2.1.4	Methoxyalkylamidin - Trifluoracetate .....	127
6.1.2.1.4.1	$N^5$ -(1-Imino-2-methoxyethyl)-L-ornithinium Bis(trifluoracetat) (1a) .....	127
6.1.2.1.4.2	$N^5$ -(1-Imino-3-methoxypropyl)-L-ornithinium Bis(trifluoracetat) (1b) .....	128
6.1.2.1.4.3	$N^5$ -(1-Imino-4-methoxybutyl)-L-ornithinium Bis(trifluoracetat) (1c) .....	129
6.1.2.1.4.4	$N$ -(4-Aminobutyl)methoxymethanamidinium Bis(trifluoracetat) (2a) .....	130
6.1.2.1.4.5	$N$ -(4-Aminobutyl)-2-methoxyethanamidinium Bis(trifluoracetat) (2b) .....	131
6.1.2.1.4.6	$N$ -(4-Aminobutyl)-3-methoxypropanamidinium Bis(trifluoracetat) (2c) .....	132
6.1.2.1.4.7	$N^4$ -(1-Imino-4-methoxybutyl)- <i>nor</i> -L-ornithinium Bis(trifluoracetat) (22) .....	133
6.1.2.2	Darstellung von Methoxyalkylguanidinen .....	134
6.1.2.2.1	$N$ -Benzyloxycarbonylisothiocyanat (25) <sup>[128,168,169]</sup> .....	134
6.1.2.2.2	$N$ -[(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- $\beta$ -D-galactopyranos-1-yl)oxy]phthalimid (43) .....	134
6.1.2.2.3	1-Aminoxy-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- $\beta$ -D-galaktopyranose (35) .....	135
6.1.2.2.4	Thioharnstoffe .....	136
6.1.2.2.4.1	$N$ -Benzyloxycarbonyl- $N'$ -[4-( <i>t</i> -butoxycarbonylamino)-butyl]thioharnstoff (23) .....	136
6.1.2.2.4.2	$N$ -[4-( <i>t</i> -Butoxycarbonylamino)-butyl]- $N'$ -(2-methoxyethyl)thioharnstoff (29) .....	137
6.1.2.2.4.3	$N$ -(2-Methoxyethyl)- $N'$ -(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yloxy)thioharnstoff (36a) .....	138
6.1.2.2.4.4	$N$ -Methoxy- $N'$ -(2-methoxyethyl)thioharnstoff (36b) .....	139
6.1.2.2.5	Mehrfachsubstituierte Aminobutylguanidine, geschützte Vorstufen .....	140
6.1.2.2.5.1	$N$ -Benzyloxycarbonyl- $N''$ -(but-3-enyl)- $N'$ -[4-( <i>t</i> -butoxycarbonylamino)-butyl]- guanidin (25) .....	140

6.1.2.2.5.2	<i>N</i> -[4-( <i>t</i> -Butoxycarbonylamino)-butyl]- <i>N</i> '-(2-methoxyethyl)- <i>N</i> ''-(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl-oxo)-guanidin (31a) .....	141
6.1.2.2.5.3	<i>N</i> -[4-( <i>t</i> -Butoxycarbonylamino)-butyl]- <i>N</i> '-methoxy- <i>N</i> '-(2-methoxyethyl)-guanidin (31b).....	142
6.1.2.2.6	Mehrfachsubstituierte Aminobutylguanidine .....	143
6.1.2.2.6.1	<i>N</i> -(4-Aminobutyl)- <i>N</i> '-but-3-enylguanidinium Bis(trifluoracetat) (26) .....	143
6.1.2.2.6.2	<i>N</i> -(4-Aminobutyl)- <i>N</i> '-hydroxy- <i>N</i> '-(2-methoxyethyl)guanidiniumdichlorid (32a) .....	144
6.1.2.2.6.3	<i>N</i> -(4-Aminobutyl)- <i>N</i> '-hydroxy- <i>N</i> '-(2-methoxyethyl)guanidiniumsulfat (32a) .....	145
6.1.2.2.6.4	<i>N</i> -(4-Aminobutyl)- <i>N</i> '-methoxy- <i>N</i> '-(2-methoxyethyl)-guanidiniumdichlorid (32b)....	146
6.1.2.3	Darstellung von <i>N</i> <sup>ω</sup> -Hydroxy- <i>N</i> <sup>γ</sup> -methyl- <i>nor</i> -L-arginin Dihydrochlorid .....	148
6.1.2.3.1	<i>N</i> <sup>α</sup> -( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- <i>nor</i> -L-ornithin (48) .....	148
6.1.2.3.2	<i>N</i> <sup>α</sup> -( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- <i>N</i> <sup>γ</sup> -benzyloxycarbonyl- <i>nor</i> -L-ornithin (49) .....	149
6.1.2.3.3	<i>N</i> <sup>α</sup> -( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- <i>N</i> <sup>γ</sup> -benzyloxycarbonyl- <i>nor</i> -L-ornithin- <i>t</i> -butylester (50) .	149
6.1.2.3.4	<i>N</i> <sup>α</sup> -( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- <i>nor</i> -L-ornithin- <i>t</i> -butylester (19) .....	150
6.1.2.3.5	<i>N</i> <sup>α</sup> -( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- <i>N</i> <sup>γ</sup> -phthalimido- <i>nor</i> -L-ornithin (63) .....	151
6.1.2.3.6	<i>N</i> <sup>α</sup> -( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- <i>N</i> <sup>γ</sup> -phthalimido- <i>nor</i> -L-ornithin- <i>t</i> -butylester (64).....	152
6.1.2.3.7	<i>N</i> <sup>α</sup> , <i>N</i> <sup>α</sup> -Bis-( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- <i>N</i> <sup>γ</sup> -phthalimido- <i>nor</i> -L-ornithin- <i>t</i> -butylester (65) .	153
6.1.2.3.8	<i>N</i> <sup>α</sup> , <i>N</i> <sup>α</sup> -Bis-( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- <i>nor</i> -L-ornithin- <i>t</i> -butylester (66).....	154
6.1.2.3.9	<i>N</i> <sup>α</sup> , <i>N</i> <sup>α</sup> -Bis-( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- <i>N</i> <sup>γ</sup> , <i>N</i> <sup>γ</sup> -dimethyl- <i>nor</i> -L-ornithin- <i>t</i> -butylester (67) .	155
6.1.2.3.10	( <i>S</i> )- <i>N</i> <sup>3</sup> - <i>t</i> -Butoxycarbonylhexahydropyrimidin-4-carbonsäure- <i>t</i> -butylester (57) ..	157
6.1.2.3.11	( <i>S</i> )- <i>N</i> <sup>3</sup> - <i>t</i> -Butoxycarbonyl- <i>N</i> <sup>1</sup> -methylhexahydropyrimidin-4-carbonsäure- <i>t</i> -butylester (58) .....	158
6.1.2.3.12	<i>N</i> <sup>α</sup> , <i>N</i> <sup>α</sup> -Bis-( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- <i>N</i> <sup>γ</sup> -cyan- <i>N</i> <sup>γ</sup> -methyl- <i>nor</i> -L-ornithin- <i>t</i> -butylester (68).....	159
6.1.2.3.13	<i>N</i> <sup>α</sup> <i>N</i> <sup>α</sup> -Bis-( <i>t</i> -butoxycarbonyl)- <i>N</i> <sup>ω</sup> -hydroxy- <i>N</i> <sup>γ</sup> -methyl- <i>nor</i> -L-arginin- <i>t</i> -butylester (69) .....	160
6.1.2.3.14	<i>N</i> <sup>ω</sup> -Hydroxy- <i>N</i> <sup>γ</sup> -methyl- <i>nor</i> -L-argininiumdichlorid ( <i>Nor</i> -NHAM, 54) .....	161
6.2	Hemmstudien an den Enzymen des NO-Stoffwechsels .....	162
6.2.1	Geräte und Materialien .....	162
6.2.2	Biochemischen Methoden .....	163
6.2.2.1	Citrullin-Plattenreader-Assay (hDDAH1) .....	163
6.2.2.1.1	Derivatisierung .....	163
6.2.2.1.2	Hemmung bei 1 mM- und 0,1 mM-Inhibitor-Konzentration.....	163
6.2.2.1.3	K <sub>i</sub> -Wert-Bestimmung.....	164

6.2.2.2	Harnstoff-Plattenreader-Assay (Arginase).....	164
6.2.2.2.1	Derivatisierung.....	164
6.2.2.2.2	Hemmung bei 1 mM- und 0,1 mM-Inhibitor-Konzentration.....	164
6.2.2.2.3	K <sub>i</sub> -Wert-Bestimmung.....	165
6.3	Untersuchungen zur hydrolytischen Stabilität und Biotransformation .....	166
6.3.1	Geräte und Materialien .....	166
6.3.2	Methoden .....	167
6.3.2.1	Derivatisierung.....	167
6.3.2.2	Biotransformationsuntersuchung an Schweineleberfraktionen .....	167
6.3.2.2.1	HPLC-Methode .....	167
6.3.2.2.2	Kalibrierung und Wiederfindung .....	168
6.3.2.2.3	<i>In vitro</i> -Reduktionsassay mit subzellulären Fraktionen.....	168
6.3.2.3	Biotransformationsuntersuchung am rekombinanten hmARC-Enzymsystem .	169
6.3.2.3.1	HPLC-Methode.....	169
6.3.2.3.2	Kalibrierung und Wiederfindung .....	169
6.3.2.3.3	<i>In vitro</i> -Reduktionsassay mit dem rekombinanten Enzymsystem .....	169
6.3.2.4	pH-abhängige, hydrolytische Stabilität.....	170
6.3.2.4.1	HPLC-Methode.....	170
6.3.2.4.2	<i>In vitro</i> -Stabilitäts-Assay.....	170
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>171</b>

<b>Anhang</b>		<b>190</b>
Strukturformelverzeichnis.....		190
Erklärung zu §10 Abs. 2 Nr. 2 der Promotionsordnung .....		204
Danksagung.....		205
Lebenslauf.....		207
Kurzfassung .....		208
Abstract.....		209

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
3D QSAR	dreidimensionale, quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen
AbMEG	<i>N</i> -(4-Aminobutyl)- <i>N'</i> -(2-methoxyethyl)guanidin
ADMA	Asymmetrisches <i>N</i> <sup>ω</sup> , <i>N</i> <sup>ω</sup> -Dimethyl-L-arginin
AFMoC	<i>Adaption of Fields for Molecular Comparison</i>
<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
Arg	L-Arginin
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BTEAC	Benzyltriethylammoniumchlorid
CaM	Calmodulin
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CDCl <sub>3</sub>	deutერიertes Chloroform
Cit	L-Citrullin
clogP	berechneter dekadischer Logarithmus des Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten
CoMFA	<i>Comparative Molecular Field Analysis</i>
CoMSIA	<i>Comparative Molecular Similarity Indices Analysis</i>
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CYP450	Cytochrom P450
D <sub>2</sub> O	Deutერიertes Wasser
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DDAH	Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMSO-d <sub>6</sub>	vollständig deutერიertes Dimethylsulfoxid
DSS	Natrium 4,4-Dimethyl-4-sila-pentansulfonat
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ESI	Elektronensprayionisierung
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
EtOH	Ethanol

F <sub>254</sub>	Fluoreszenzindikator 254 nm
FCNP	<i>ferricyanide-nitroprusside</i>
g	Gramm (mg = Milligramm)
gef.	gefunden
h	Stunden ( <i>hours</i> )
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HbO <sub>2</sub>	Oxyhämoglobin
hDDAH-1	humane Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase 1
HgCl <sub>2</sub>	Quecksilber(II)chlorid
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
Hz	Hertz
i.Vak.	im Vakuum
IC <sub>50</sub>	Konzentration für eine halbmaximale Hemmung
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IR	Infrarot
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	Kalium Hexacyanidoferrat(III)
K <sub>i</sub>	Konstante für die Affinität eines kompetitiven Inhibitors zum Enzym
K <sub>m</sub>	Michaeliskonstante
konz.	konzentriert
L-Arg	L-Arginin
L-Cit	L-Citrullin
logP	dekadischer Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten
LOO	<i>Leave One Out</i>
L-Orn	L-Ornithin
M	molar (mol/L; m = milli, μ = micro, n = nano)
m/z	Masse / Ladungsverhältnis
mARC	mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente ( <i>mitochondrial amidoxime reducing component</i> )
MeI	Methyliodid
MeOH	Methanol
min	Minuten
ml	Milliliter

mmol	Millimol
Moloc	Molecular Design Software
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NADH	$\beta$ -Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	$\beta$ -Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NHAM	$N^{\omega}$ -Hydroxy- $N^{\delta}$ -methyl-L-arginin
nm	Nanometer
NMMA	$N^{\omega}$ -Monomethyl-L-arginin
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie ( <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
nNOS	neuronaler NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid ( <i>nitric oxide</i> )
NOHA	$N^{\omega}$ -Hydroxy-L-arginin
<i>N</i> -OH-AbMEG	<i>N</i> -Hydroxy- <i>N'</i> -(4-aminobutyl)- <i>N''</i> -(2-methoxyethyl)guanidin
NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
OMV	äußere Mitochondrienmembran ( <i>outer membrane vesicles</i> )
o-PA	<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd
PDB	Proteindatenbank
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
pK <sub>i</sub>	negativer dekadischer Logarithmus des K <sub>i</sub> -Wertes
pK <sub>i</sub> calc	berechneter pK <sub>i</sub> -Wert
PLS	<i>Partial Least Squares</i>
PNS	postnuclearer Überstand ( <i>postnuclear supernatant</i> )
ppm	<i>parts per million</i>
PRESS	<i>Predictive Residual Sum of Squares</i>
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor (DC)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SDMA	Symmetrisches $N^{\omega},N^{\omega}$ -Dimethyl-L-arginin
Tab.	Tabelle
TBAHS	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat

TEA	Triethylamin
<i>tert, t</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
$V_{\max}$	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
WBB	Wasserstoffbrückenbindungen
$\delta / \text{ppm}$	chemische Verschiebung in ppm der Resonanzfrequenz der Referenzverbindung
$\lambda$	Wellenlänge
$\lambda_{\text{em}}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{\text{ex}}$	Extinktionswellenlänge
$\nu / \text{cm}^{-1}$	Wellenzahl

# 1 Einleitung und Zielsetzung

---

## 1.1 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) - ein kleines, gasförmiges, radikalisches Molekül - gewann stark an Bedeutung, als es 1987 als *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) identifiziert wurde.<sup>[1-3]</sup> 1992 wurde es von der Zeitschrift „Science“ zum Molekül des Jahres gewählt und 1998 erhielten Furchgott, Ignarro und Murad für ihre Forschung an EDRF/NO den Nobelpreis für Medizin.<sup>[4]</sup>

NO ist ein physiologischer Transmitter, der in der Regulation des Nerven-, Immun- und kardiovaskulären Systems eine wichtige Rolle spielt, aber auch an vielen pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist.<sup>[5]</sup> Diese Vielseitigkeit erklärt das große wissenschaftliche Interesse auf diesem stark beforschten Gebiet und wird durch mehr als 100.000 Publikationen unterstrichen.

Durch seine Radikaleigenschaften ist NO sehr reaktiv: so reagiert es in wässriger Lösung schnell zu Nitrit und Nitrat. Seine spontane Reaktion mit dem Superoxidradikalanion ( $O_2^{\cdot-}$ ) zu dem stärkeren Oxidanz Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) ist Teil der unspezifischen Immunabwehr.<sup>[6]</sup> Weiterhin reagiert es mit Oxyhämoglobin sofort zu Nitrat, welches im Oxyhämoglobin Assay zur Quantifizierung von NO ausgenutzt wird.<sup>[7]</sup> Trotz dieser vielen Inaktivierungsmöglichkeiten und seiner biologischen Halbwertszeit von weniger als einer Sekunde, kann NO aufgrund seiner kleinen, lipophilen Struktur und gasförmigen Eigenschaft leicht durch Membranen diffundieren und an seinen Wirkort gelangen.<sup>[6,8]</sup>

Bereits seit einem Jahrhundert sind organische Nitratre zur Behandlung und Prophylaxe von Angina Pectoris-Anfällen im Einsatz, obwohl das Wirkprinzip der NO-Freisetzung noch nicht bekannt war. Vertreter dieser Klasse sind z.B. Glyceroltrinitrat, Isosorbiddinitrat oder Molsidomin.<sup>[6]</sup> Neuere Entwicklungen ergaben sich erst durch Entdeckung des Wirkmechanismus. Die FDA erteilte 1999 die Zulassung für ein NO-haltiges Gasgemisch zur Behandlung von Neugeborenen mit pulmonaler Hypertonie. 2011 wurde die Zulassung für alle Altersklassen für peri- und postoperative pulmonale Hypertonie in Verbindung mit einer Herzoperation erweitert.<sup>[9]</sup>

## 1.2 L-Arginin

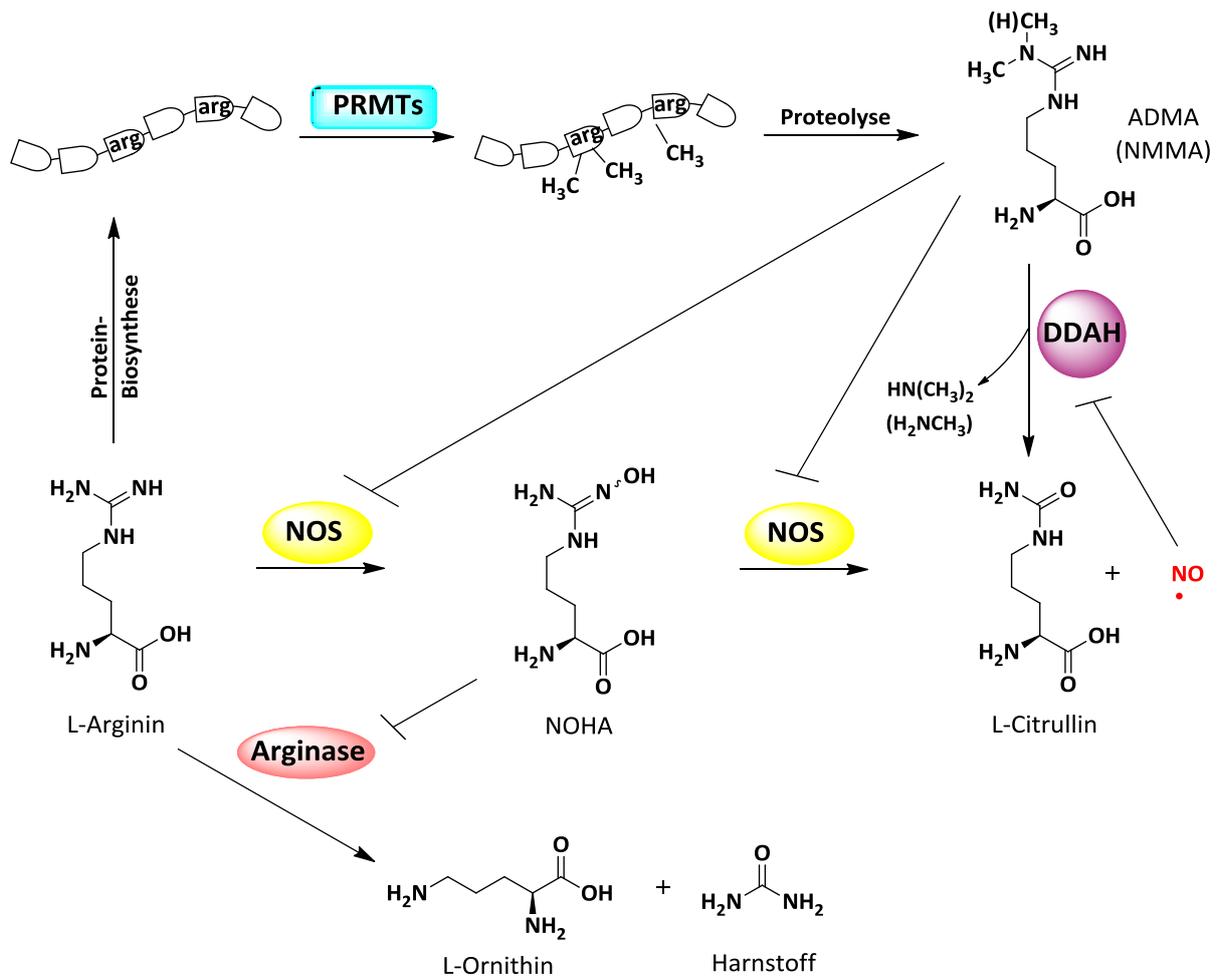
Das zentrale Substrat der physiologischen NO-Synthese ist L-Arginin, doch nur ca. 1,2% des verfügbaren Plasmaarginins werden hierfür benötigt.<sup>[10]</sup> Der größere Anteil wird im Körper auf vielfältige Weise umgesetzt. Da es sich bei L-Arginin um eine proteinogene Aminosäure handelt, spielt es einen wichtigen Part in der Proteinbiosynthese. Weiterhin ist es ein Zwischenprodukt der körpereigenen Ammoniakentgiftung im Harnstoffzyklus. Neben Harnstoff entsteht dabei L-Ornithin, welches sowohl als ein Substrat für die Synthese der Aminosäure L-Prolin, als auch für die Bildung von Polyaminen von Bedeutung ist.<sup>[11]</sup> L-Prolin ist essentiell für die Kollagenbiosynthese und Polyamine sind an Zellwachstum und -differenzierung beteiligt.<sup>[12]</sup>

Bei einem gesunden Erwachsenen ist die körpereigene L-Arginin-Synthese ausreichend, sodass er nicht supplementiert werden muss. Bei Kindern und im Falle von katabolem Stress, wie z.B. Entzündungsreaktionen, Infektionen oder auch bei Niereninsuffizienz, kann der Bedarf jedoch nicht immer ausreichend gedeckt werden und muss durch die exogene Zufuhr ergänzt werden. Somit wird L-Arginin als semiessentiell eingestuft.<sup>[11]</sup>

## 1.3 Regulation endogener NO-Konzentration

### 1.3.1 Allgemeine Übersicht

Das Schaubild in Abb. 1.1 gibt eine vereinfachte Übersicht über das Zusammenspiel verschiedener Enzyme, die in die Regulation der NO-Bioverfügbarkeit eingreifen. Isoenzyme, unterschiedliche Gewebsverteilung sowie Expressionslevel bleiben hierbei unberücksichtigt.

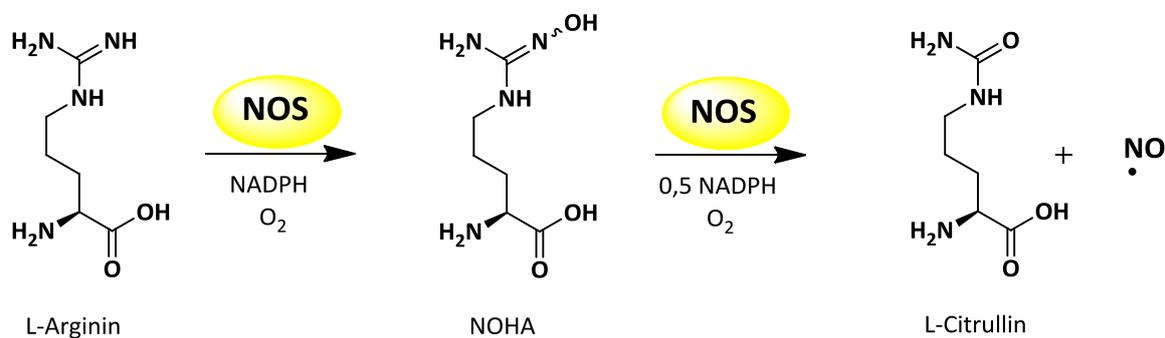


**Abbildung 1.1:** Vereinfachte schematische Darstellung der Regulation des NO-Stoffwechsels in Anlehnung an die Literatur.<sup>[13]</sup> ADMA,  $N^{\omega},N^{\omega}$ -Dimethyl-L-arginin; arg, proteingebundenes L-Arginin; DDAH, Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase; NMMA,  $N^{\omega}$ -Monomethyl-L-arginin; NOHA,  $N^{\omega}$ -Hydroxy-L-Arginin; NOS, NO-Synthase; PRMTs, Protein-Arginin-Methyltransferasen.

Das verantwortliche Enzym der endogenen NO-Produktion ist die NO-Synthase (NOS). Diese katalysiert die Bildung von NO aus L-Arginin über das Intermediat  $N^{\omega}$ -Hydroxy-L-Arginin (NOHA) zu L-Citrullin und NO. Die Arginase konkurriert mit der NOS um das gemeinsame Substrat und kann so die NO-Produktion reduzieren. Sie selbst wird durch NOHA physiologisch gehemmt.<sup>[14,15]</sup> Endogene Hemmstoffe der NOS, asymmetrisches  $N^{\omega},N^{\omega}$ -Dimethyl-L-arginin (ADMA) und  $N^{\omega}$ -Monomethyl-L-arginin (NMMA), werden über Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) gebildet, die proteingebundene Arginine methylieren. Durch Proteolyse freigesetzt, hemmen sie die NOS und können durch die Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) abgebaut werden.<sup>[16]</sup> In einer Art Rückkopplungsmechanismus kann gebildetes NO die DDAH wiederum durch Nitrosylierung hemmen.<sup>[17]</sup>

### 1.3.2 NO-Synthasen (NOSs)

Die NO-Synthase (NOS) (EC 1.14.13.39) gehört zur Klasse der Oxidoreduktasen und katalysiert in zwei Schritten die Fünf-Elektronen-Oxidation von L-Arginin. Der erste Schritt beinhaltet die Hydroxylierung eines endständigen Stickstoff-Atoms der Guanidin-Struktur unter Verbrauch eines Äquivalents Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) und Sauerstoff ( $O_2$ ) zur Bildung des Intermediates NOHA. Im zweiten Schritt wird NOHA durch Oxidation zu L-Citrullin und NO gespalten, wozu ein halbes Äquivalent NADPH und ein Äquivalent  $O_2$  benötigt werden (s. Abb. 1.2).<sup>[18]</sup>



**Abbildung 1.2:** Katalytische Umsetzung von L-Arginin zu Stickstoffmonoxid und L-Citrullin durch die NO-Synthasen. NADPH, Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat; NOHA, N<sup>ω</sup>-Hydroxy-L-arginin; NOS, NO-Synthase.

Man unterteilt die NOS in drei Isoenzyme. Die neuronale NOS (nNOS, NOS1), die induzierbare NOS (iNOS, NOS2) und die endotheliale NOS (eNOS, NOS3). Die Existenz weiterer NOS-Isoformen, wie der mitochondrialen NOS<sup>[19]</sup> oder der erythrozytären NOS,<sup>[20,21]</sup> wird diskutiert. Doch bisher ist nicht geklärt, ob es sich um eigene Isoenzyme oder um Splice-Varianten der bekannten Isoenzyme handelt.<sup>[12,22]</sup>

Die verschiedenen humanen Isoformen werden auf unterschiedlichen Genen kodiert, in unterschiedlichen Geweben exprimiert und besitzen 51-57% Sequenzhomologie. Sie variieren in ihren katalytischen Eigenschaften, Inhibitorempfindlichkeiten und Kofaktor-Abhängigkeiten.<sup>[22]</sup> Die Bezeichnungen für die eNOS und die nNOS rühren von ihren Geweben her, aus denen sie zuerst isoliert wurden und in denen sie hauptsächlich vorkommen.

In ihrem Aufbau unterscheiden sich die NOSs nur geringfügig, alle Isoformen besitzen zwei Domänen:

- Eine N-terminale Oxygenasedomäne mit einer Bindestelle für Häm, Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) und L-Arginin,
- Eine C-terminale Reduktasedomäne mit Bindestellen für Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavin-Mononukleotid (FMN) und NADPH.

Zwischen beiden Domänen befindet sich ein Bindemotiv für das Protein Calmodulin.<sup>[22]</sup> In ihrer aktiven Form liegen die Isoenzyme als Homodimer vor, von denen jedes Monomer ein Calmodulin gebunden hat.<sup>[23]</sup> Die Monomere sind katalytisch inaktiv, weil die Elektronenübertragung vermutlich über Kreuz erfolgt und der Elektronenfluss von der Reduktasedomäne eines Monomers auf die Oxygenasedomäne des anderen Monomers erfolgt.<sup>[24]</sup>

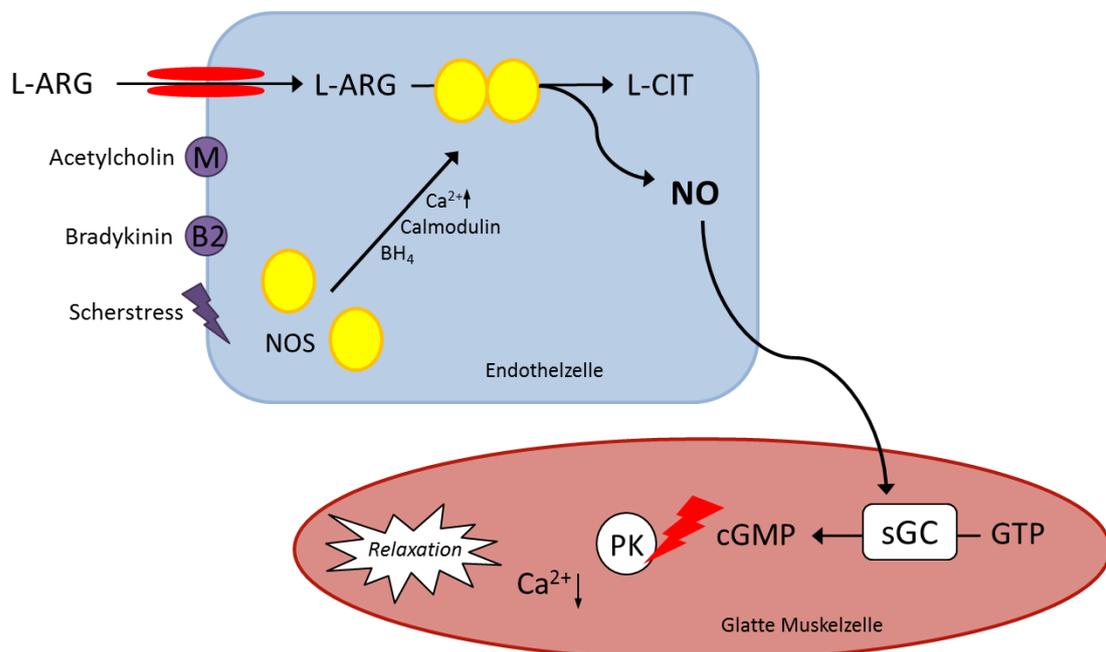
Bei der NOS-Entkopplung handelt es sich um einen Zustand, bei dem Superoxidradikalanionen an Stelle von NO produziert werden. In diesem Fall ist die enzymatische Reduktion des Sauerstoffs von der katalytischen Reaktion mit L-Arginin entkoppelt. Dieser Zustand tritt vor allem dann ein, wenn zu wenig BH<sub>4</sub> vorhanden ist. Dieses gebildete Superoxidradikalanion reagiert schnell mit NO zu Peroxynitrit, welches wiederum BH<sub>4</sub> abbaut.<sup>[22,25]</sup>

### **Endotheliale NOS (eNOS)**

Die eNOS ist ein konstitutiv exprimiertes Enzym, das in Endothelzellen, Thrombozyten und bestimmten Gehirnarealen vorkommt. Unter bestimmten Umständen, beispielsweise bei chronischer körperlicher Anstrengung oder während der Schwangerschaft, kann sie zusätzlich induziert werden.<sup>[26,27]</sup> Durch Palmitoylierung von Cystein-Resten des Proteins werden posttranslational Lipidanker ausgebildet, über die die eNOS fest an die Zellmembran gebunden vorliegt.<sup>[28]</sup> Der kationische Aminosäuren-Transporter CAT-1 ist vermehrt in der Nähe großer eNOS-Vorkommen lokalisiert, wodurch diese direkt mit dem Substrat L-Arginin versorgt werden können.<sup>[29]</sup>

Transmitterstoffe wie Acetylcholin oder Bradykinin sowie Scherstress der Gefäße aktivieren Ca<sup>2+</sup>-vermittelt die eNOS. Das gebildete NO diffundiert in benachbarte glatte Muskelzellen. Dort entfaltet es seine Wirkung durch die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC), die aus Guanosintriphosphat (GTP) cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) bildet. Dieses

aktiviert verschiedene Proteinkinasen, in deren Folge die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abnimmt und die glatte Gefäßmuskulatur dilatiert (s. Abb. 1.3).<sup>[8,30]</sup>



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung der Bildung von NO im Endothel und seiner Wirkung auf die glatte Muskulatur.  $\text{BH}_4$ , Tetrahydrobiopterin; L-ARG, L-Arginin; L-CIT, L-Citrullin; PK, Proteinkinasen. (Schema modifiziert in Anlehnung an die Literatur<sup>[31]</sup>)

Zudem übt NO zahlreiche gefäßschützende Wirkungen aus, die die Inzidenz von Atherosklerose zu reduzieren vermögen:<sup>[32]</sup>

- Hemmung der Bildung von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen und somit Hemmung der Leukozytenanheftung
- Hemmung der Oxidation von Low Density Lipoprotein (LDL)
- Hemmung der Thrombozytenaktivierung und -aggregation
- Hemmung der Gefäßmuskelproliferation.

Die Vielzahl an Effekten, die NO auf das Gefäßsystem ausübt, zeigt, dass eine Dysregulation in Zusammenhang mit vielen kardiovaskulären Erkrankungen gebracht werden kann. Krankheiten, deren gemeinsame Komponente die endotheliale Dysfunktion ist, sind u.a. Atherosklerose,<sup>[33,34]</sup> Diabetes mellitus,<sup>[35]</sup> Hypertonie,<sup>[36,37]</sup> koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz, Herzinfarkt,<sup>[38]</sup> und Hypercholesterolämie.<sup>[39]</sup>

## Neuronale NOS (nNOS)

Die nNOS wurde als erste der drei Isoenzyme identifiziert und nach dem Gewebe, aus dem es zuerst isoliert wurde - dem Gehirn - benannt.<sup>[40]</sup> Im Zentralnervensystem (ZNS) kommt sie ausschließlich in Neuronen vor,<sup>[5]</sup> außerhalb des ZNS wurde sie sowohl in Neuronen als auch im Epithel der Skelettmuskulatur, Plazenta und Bronchien nachgewiesen.<sup>[26,41,42]</sup> Normalerweise wird die nNOS konstitutiv exprimiert, jedoch kann ihre Expression analog zur eNOS, z.B. in der Schwangerschaft, induziert sein.<sup>[27]</sup>

Subzellulär kann die nNOS sowohl zytosolisch als auch membrangebunden vorliegen. Diese Eigenschaft verdankt sie einer PDZ-Domäne, die nur bei dieser Isoform vorkommt. Eine PDZ-Domäne ist ein Teil eines Proteins, welcher mit anderen Proteinen interagieren kann. Liegt ein entsprechendes Motiv vor, so kann es zur Assoziation und u. a. zur Bindung an die Membran kommen.<sup>[22]</sup>

Durch nNOS gebildetes NO übernimmt die Funktion eines Neurotransmitters. Es entfaltet seine Wirkung wie bei der eNOS beschrieben durch die Aktivierung der sGC.<sup>[43]</sup> Physiologische Funktionen von NO im Gehirn sind die Beteiligung an der Gedächtnisbildung,<sup>[44]</sup> der zerebralen Durchblutung<sup>[43]</sup> sowie der Regulation der Neurogenese.<sup>[45]</sup> Physiologische Konzentrationen von NO sind neuroprotektiv, erhöhte Konzentrationen hingegen neurotoxisch.<sup>[6]</sup> In peripheren Nervenzellen wie im *Corpus cavernosum* wird der nNOS eine Mitverantwortung für die Relaxation der glatten Muskelzellen zugesprochen.<sup>[46]</sup> Eine dort auftretende Dysregulation soll an der Pathogenese der erektilen Dysfunktion beteiligt sein.<sup>[47]</sup>

Durch nNOS-Überexpression verursachte, pathophysiologische Konzentrationen des NO werden mit der Pathogenese des Schlaganfalls,<sup>[48]</sup> der Migräne,<sup>[49]</sup> Morbus Alzheimer,<sup>[50-52]</sup> Morbus Parkinson<sup>[45,53,54]</sup> und Depressionen<sup>[45]</sup> in Verbindung gebracht.

Studien an Mäusen und Ratten attestieren der nNOS eine signifikante Beteiligung an der peripheren Schmerzhemmung<sup>[55]</sup> bzw. am Wirkmechanismus vieler analgetisch wirksamer Arzneistoffe.<sup>[56]</sup>

### **Induzierbare NOS (iNOS)**

Die im Körper vorhandene Menge an iNOS wird durch immunologische und entzündliche Prozesse bestimmt. Endotoxine und proinflammatorische Zytokine induzieren die Expression des Enzyms in Makrophagen. Bekannteste Induktoren sind IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und bakterielle Lipopolysaccharide.<sup>[57]</sup> In manchen Geweben, wie z.B. im Lungenepithel, im Dünndarm, in der Rattenniere oder fetalem Gewebe, liegt die iNOS auch konstitutiv vor.<sup>[26,57]</sup>

Die höhere NO-Konzentration, die die iNOS im Gegensatz zu den beiden anderen Isoenzymen produziert, ist weniger durch eine höhere spezifische Aktivität, sondern vielmehr durch höhere Proteinexpressionslevels und einer längeren Überlebensdauer begründet.<sup>[26]</sup>

Die zytotoxische Wirkung, die NO zugesprochen wird, beruht vermutlich nicht allein auf NO. Aktivierte Makrophagen produzieren neben NO auch Superoxidradikalanionen, sodass das daraus resultierende Peroxynitrit oder auch das Zusammenspiel von NO und Peroxynitrit als wahrscheinlichere zytotoxische Mechanismen in Betracht kommen. Peroxynitrit oxidiert DNA-Basen, Lipide und Metall-Ionen in Enzymen. Proteine können je nach funktioneller Gruppe oxidiert oder nitriert werden. Diese Mechanismen sind für die physiologische Rolle der unspezifischen Immunabwehr zur Bekämpfung von Krankheitserregern und Tumorzellen von Bedeutung. Bei entzündlichen Krankheiten, die mit einer starken iNOS-Induktion in Verbindung gebracht werden, wurden in den entsprechenden Geweben nitrierte, in Proteine eingebaute Aminosäuren gefunden. Hierbei handelt es sich um Krankheiten wie Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Colitis Ulcerosa.<sup>[6,58]</sup>

Ein weiteres Problem zu starker iNOS-Induktion, wie im Falle des septischen Schocks, ist die resultierende massive NO-Konzentration und dessen Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur. Es kommt zu einer übermäßigen Vasodilatation, die eine drastische Absenkung des Blutdrucks verursacht. Dadurch ausgelöstes Multiorganversagen erklärt die hohe Mortalitätsrate von 60%.<sup>[32]</sup>



ein Histidin zu Ornithin und Harnstoff zerfällt.<sup>[60,63]</sup> Das pH-Optimum für die Katalyse liegt bei neun bis zehn.<sup>[59]</sup>

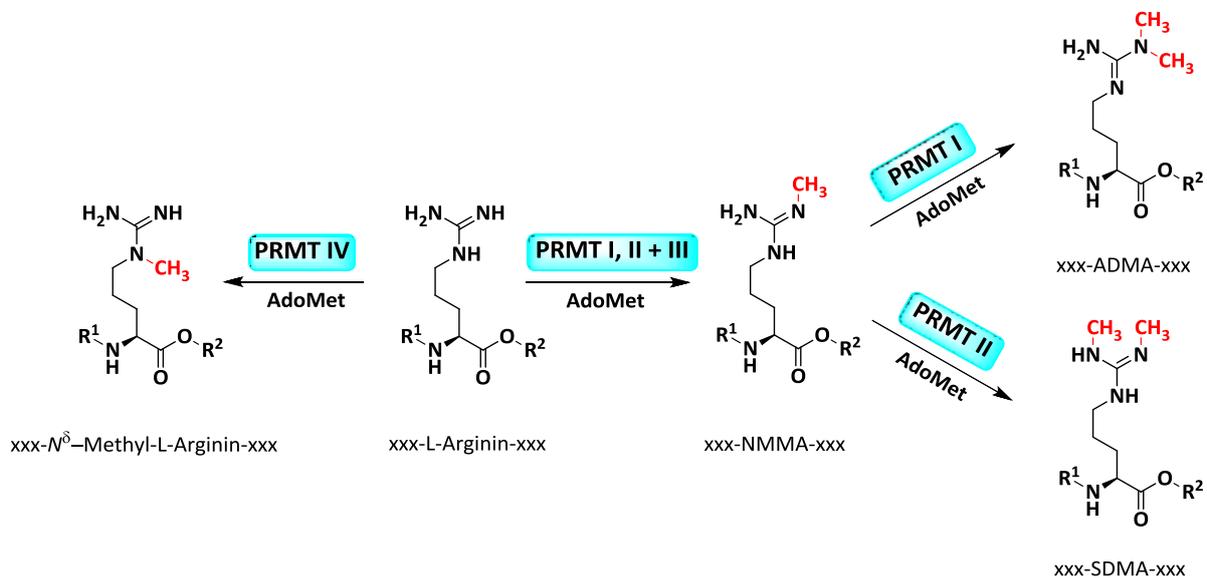
Bei der humanen Arginase sind zwei Isoformen mit 58% Sequenzidentität zu unterscheiden. Arginase I wurde zuerst in der Leber nachgewiesen und wird deshalb auch häufig Leberarginase genannt. Es handelt sich dabei um ein zytosolisches Enzym, das in der Leber hauptsächlich am Harnstoffzyklus und somit an der körpereigenen Ammoniakentgiftung beteiligt ist. Arginase II wurde zunächst in der Niere nachgewiesen, kommt aber in diversen extrahepatischen Geweben vor. Sie ist in den Mitochondrien lokalisiert und dient unter anderem als Lieferant für Ornithin, welches als Vorstufe von Prolin und Polyaminen für die Kollagenbiosynthese und Zellproliferation von Bedeutung ist.<sup>[11,59,60,64]</sup>

Seit der Entdeckung der NOSs ist das Interesse am Zusammenspiel zwischen NOSs und Arginase geweckt worden. Viele Gewebe exprimieren sowohl Arginase I und II, als auch NOSs. Da beide um das gleiche Substrat konkurrieren, scheint eine gegenseitige Beeinflussung wahrscheinlich. Das Intermediat NOHA aus der NO-Synthese fungiert als kompetitiver Inhibitor der Arginase mit einem  $K_i$ -Wert im Bereich von 10-42  $\mu\text{M}$ .<sup>[14,15,65,66]</sup> Es wurde nachgewiesen, dass signifikante Mengen dieser Verbindung vom aktiven Zentrum der NOS diffundieren und die Arginase hemmen.<sup>[67,68]</sup> Physiologisch relevante NOHA-Level wurden zudem im Plasma detektiert.<sup>[69]</sup> Durch Konkurrenz um L-Arginin kann es zu einem Substratmangel für die NOS und somit zu verminderter NO-Bioverfügbarkeit kommen.

Eine pathophysiologisch erhöhte Expression und/oder Aktivität korreliert mit verschiedenen Krankheitsbildern, wie z.B. der endothelialen Dysfunktion,<sup>[70]</sup> Krebs<sup>[71]</sup> und Asthma.<sup>[72,73]</sup> Auch im Alter ist die Arginase-Expression erhöht.

### 1.3.1 Protein-Arginin-Methyl-Transferasen (PRMTs)

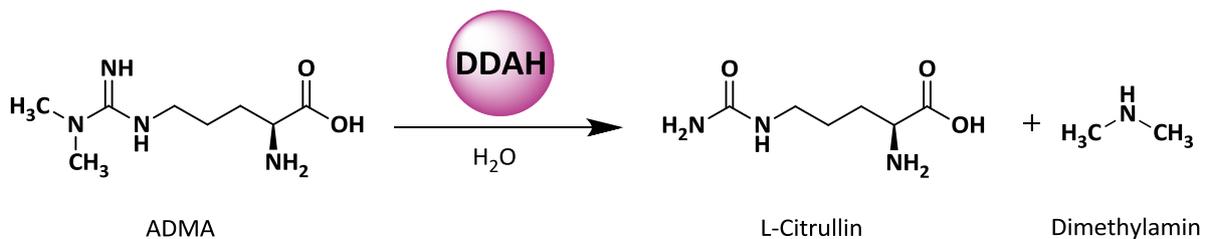
Die posttranslationale Methylierung von Argininresten in Proteinen spielt eine Rolle bei verschiedenen zellregulatorischen Prozessen, wie z.B. der Signal-Transduktion, der subzellularen Lokalisation von Proteinen oder der Transkriptionsregulation.<sup>[74]</sup> Katalysiert wird diese Reaktion durch PRMTs (EC 2.1.1.23), welche Methylgruppen von *S*-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) auf einen der terminalen Guanidin-Stickstoffe des Arginins transferieren. Verschiedene Isoenzyme dieser Klasse wurden identifiziert und in vier Gruppen unterteilt. Typ I PRMTs katalysieren die Monomethylierung und die Dimethylierung am selben Stickstoffatom ( $N^{\omega}$ ), wohingegen Typ II PRMTs die Dimethylierung am anderen terminalen Guanidin-Stickstoff ( $N^{\omega} + N^{\omega'}$ ) katalysieren. Typ III PRMTs können lediglich monomethylieren und Typ IV methyliert am mittleren Stickstoff ( $N^{\delta}$ ) und kommt nur in Hefen vor (s. Abb. 1.6).<sup>[75]</sup> Durch Proteolyse werden die methylierten Arginine ins Cytosol freigesetzt. Mögliche Vertreter dieser Klasse sind ADMA, NMMA und symmetrisches Dimethyl-L-arginin (SDMA).<sup>[76]</sup> Die beiden ersten Substanzen sind für die vorliegende Arbeit interessant, da sie als Inhibitoren der NO-Synthasen in die NO-Biosynthese eingreifen können, wohingegen SDMA diese Eigenschaft nicht besitzt.



**Abbildung 1.6:** Übersicht zur posttranslationalen Methylierung von proteingebundenem L-Arginin durch PRMTs. (Schema modifiziert in Anlehnung an die Literatur<sup>[75]</sup>)

### 1.3.2 Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH)

Die DDAH (EC 3.5.3.18) ist ein weiteres Enzym, das eine wichtige Rolle in der Beeinflussung der endogenen NO-Konzentration spielt. Sie ist verantwortlich für den enzymatischen Abbau von ADMA und NMMA zu L-Citrullin und den entsprechenden Methylaminen (s. Abb. 1.7).<sup>[16]</sup>



**Abbildung 1.7:** Katalysereaktion der DDAH am Beispiel von ADMA zu L-Citrullin und Dimethylamin

Bei Säugern sind bis heute zwei verschiedene Isoformen mit einer Sequenzidentität von ca. 50% und unterschiedlicher Gewebeverteilung bekannt, wobei DDAH-1 vorwiegend in Hirn, Niere, Bauchspeicheldrüse und Leber exprimiert wird, DDAH-2 dagegen in Herz, Niere und Placenta.<sup>[77,78]</sup>

Die Säugetier-DDAH ist im Gegensatz zu der bakteriellen, die als Homodimer vorliegt, als Monomer aktiv.<sup>[78]</sup> Ihre hydrolytische Aktivität vermittelt eine katalytische Triade im aktiven Zentrum der DDAH, bestehend aus einem Cystein-, einem Histidin- und einem Glutaminsäure-Rest. Durch Anlagerung von NMMA oder ADMA wird das Cystein deprotoniert und das dabei entstandene Thiolat kann den Guanidin-Kohlenstoff nukleophil angreifen. Der gebildete tetrahedrale Übergangszustand kollabiert unter Freisetzung von Mono- bzw. Dimethylamin und eines Thiuronium Intermediats, welches durch Hydrolyse L-Citrullin freisetzt.<sup>[79]</sup> Unter physiologischen Bedingungen ist im aktiven Zentrum ein Zn<sup>2+</sup> gebunden, das die Aktivität der DDAH einerseits inhibiert, sie andererseits vor thermischen Belastungen und Cystein-Nitrosylierungen durch NO schützen kann.<sup>[78,80,81]</sup> Die letzte Reaktion soll gleichzeitig ein Regulationsmechanismus im Sinne einer Rückkopplungsreaktion durch erhöhte NO-Konzentration sein. Durch den verminderten Abbau der natürlichen NOS-Hemmstoffe ADMA und NMMA wird die Freisetzung von NO gesenkt.<sup>[17]</sup>

Verschiedene Studien zur Lokalisation der DDAH-Isoformen mit den unterschiedlichen NOSs deuten auf eine isoformspezifische Regulation über die Methylarginin-Konzentrationen hin.<sup>[77,82]</sup> Leiper *et al.* publizierten 1999, dass beide Isoformen die gleiche enzymatische Reaktion katalysieren und haben diese These mit zwei unterschiedlichen K<sub>m</sub>-Werten für

NMMA unterstrichen.<sup>[77]</sup> Studien in Zellkultur mit DDAH-2-transgenen Mäusen oder DDAH-2-Überexpression scheinen diese Hypothese zu bestätigen.<sup>[76]</sup> Allerdings wurde bisher noch keine aktive rekombinante DDAH-2 für eine weitergehende Beweisführung isoliert und biochemisch charakterisiert.

In jüngster Zeit werden für DDAH-2 zunehmend andere Wege der NO-Beeinflussung diskutiert und DDAH-1 als alleiniges ADMA/NMMA metabolisierendes Enzym behandelt.<sup>[83-85]</sup> DDAH-2 soll an der Regulation der EDRF/NO-Freisetzung beteiligt sein. Eine DDAH-2-Überexpression verbessert die endothelabhängige Vasodilatation und steigert die NO-Produktion, wohingegen ein siRNA-Knockdown der DDAH-2 die NO-Synthese reduziert, den ADMA-Spiegel jedoch unbeeinflusst lässt.<sup>[83]</sup> Des Weiteren wurde bei homozygoten DDAH-1-Knockout-Mäusen kein Abbau von ADMA und NMMA detektiert, obwohl DDAH-2 unverändert exprimiert wurde.<sup>[84]</sup> Ebenso sollen beide Isoformen an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sein und so auch unabhängig vom ADMA/NMMA-Mechanismus in die NO-Regulation eingreifen.<sup>[86,87]</sup>

Eine pharmakologische Beeinflussung der DDAH kann therapeutisch in vielerlei Hinsicht von Interesse sein. Meist beziehen sich die Studien auf erhöhte ADMA-Spiegel, die mit einer Vielzahl von Krankheiten assoziiert sind, wie z.B. kardiovaskuläre Erkrankungen, Schlaganfälle oder Depressionen.<sup>[76,88,89]</sup> Hier wäre eine Aktivierung der DDAH sicherlich sinnvoll. Doch es gibt auch Krankheitsbilder, die mit erniedrigten ADMA-Spiegeln einhergehen, wie z.B. Morbus Alzheimer<sup>[13]</sup> sowie, wie eingangs erwähnt, pathologisch erhöhte NO-Konzentrationen, bei denen eine Steigerung der Plasma-ADMA-Spiegel vorteilhaft ist.<sup>[76]</sup> Die Entwicklung selektiver, potenter DDAH-Inhibitoren ist in diesem Zusammenhang von großer wissenschaftlicher Bedeutung.

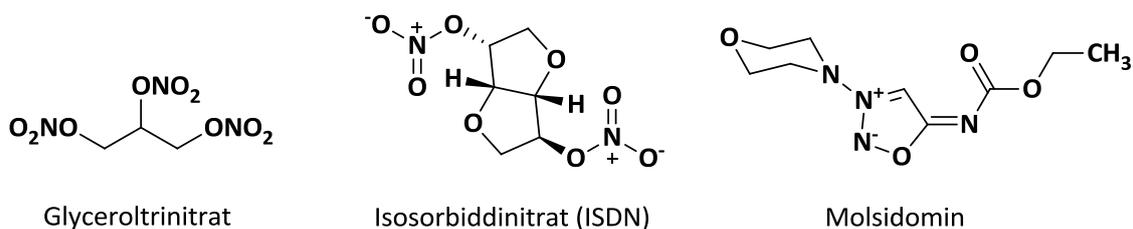
## 1.4 Therapeutische Beeinflussung der NO-Konzentration

### 1.4.1 Einleitung

Aus den vorangegangenen Kapiteln wird ersichtlich, wie viele physiologische und pathophysiologische Funktionen NO besitzt. Da sowohl erhöhte als auch erniedrigte NO-Spiegel mit unterschiedlichen Krankheiten assoziiert sind, stellt die agonistische sowie antagonistische Beeinflussung seiner Konzentration wertvolle therapeutische Ansätze dar. Hierbei ist es sinnvoll unterschiedliche Gewebe und Funktionen des NO zu unterscheiden, damit möglichst gezielt therapiert werden kann (z.B. Hemmung der nNOS bei Migräne). Im Folgenden soll auf unterschiedliche Möglichkeiten pharmakologischer NO-Beeinflussung eingegangen werden.

### 1.4.2 NO-Donatoren und alternative NOS-Substrate

Eine Möglichkeit erniedrigte NO-Spiegel zu erhöhen, ist die Gabe von NO-Donatoren. Hierbei handelt es sich um Arzneistoffe, die enzymatisch oder auch nichtenzymatisch NO freisetzen und dadurch eine Dilatation der Gefäße herbeiführen. Eingesetzt werden sie bei Angina pectoris und zur Herzinfarkt-Prophylaxe. Das aus NO-Donatoren freigesetzte NO erniedrigt die Vorlast des Herzens und führt zu einer Dilatation der Koronararterien. Strukturell ist diese Arzneistoffklasse sehr vielfältig: es gibt sowohl organische (z.B. Glyceroltrinitrat, Molsidomin, Isosorbiddinitrat) als auch anorganische Vertreter (z.B. Nitroprussid-Na).<sup>[90]</sup>



**Abbildung 1.8:** Beispiele für NO-freisetzende Verbindungen, die erfolgreich therapeutisch eingesetzt werden.

Ein weiterer Ansatz ist die Supplementierung alternativer Substrate für die NOS. Allerdings konnte bis heute keine Substanz gefunden werden, die bessere Substratqualitäten für die NOS besitzt als L-Arginin.<sup>[91,92]</sup>

### 1.4.3 Hemmung der NOS

In pathophysiologischen Zuständen, in denen NO überproduziert wird, liegt es auf der Hand die NOS zu hemmen. Die Schwierigkeit hierbei besteht in einer ausreichenden Isoformspezifität. Zwar dürfen die nNOS (Migräne, neurodegenerative Erkrankungen) und die iNOS (chronische Entzündungen, septischer Schock) gehemmt werden, aber die eNOS sollte unbeeinflusst bleiben. Das katalytische Zentrum ist bei allen NOS-Isoformen stark konserviert, sodass die Entwicklung selektiver Hemmstoffe schwierig ist. Des Weiteren ist es sinnvoll, nicht nur Isoformspezifität, sondern auch eine Selektivität gegenüber anderen L-Arginin und –Analoga verstoffwechselnden Enzymen, wie z.B. der Arginase, zu erreichen.

Die bisher bekannten NOS-Inhibitoren sind strukturell vielfältig; es handelt sich u. a. um Aminosäure-basierte Inhibitoren, verschiedene Amidine und Guanidine, Isothioharnstoffe, Indazole, Imidazole und Tetrahydrobiopterin-Analoga.<sup>[93]</sup> Sie können nach ihren verschiedenen Angriffspunkten unterschieden werden: Dimerisierungs-Hemmstoffe, Substratanaloga im aktiven Zentrum oder auch Hemmstoffe der Kofaktoren.<sup>[22]</sup>

Die endogenen Hemmstoffe der NOS - ADMA und NMMA - zählen zu den Aminosäure-basierten Inhibitoren und sind gleichzeitig Substratanaloga. Die Möglichkeit der NOS-Hemmung über einen reduzierten Abbau dieser Verbindungen wird in Kapitel 1.4.5.2 näher erläutert.

Bis heute wurde eine Vielzahl an neuen Substanzen hervorgebracht, die mehr oder weniger selektiv für einzelne NOSs sind und auch in klinischen Studien getestet wurden. Jedoch hat es noch keine Verbindung zur Zulassungsreife geschafft. Dies liegt u. a. an mangelnder Korrelation der Daten aus *in vitro*-Testungen mit den *in vivo* beobachteten Wirkungen, toxischen Effekten und anderen ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften.<sup>[93–95]</sup>

### 1.4.4 Hemmung der Arginase

Eine Hemmung der Arginase zur Erhöhung des L-Arginin-Angebotes für die NOS kann eine interessante Strategie zur Steigerung erniedrigter NO-Spiegel sein, insbesondere aufgrund der in Kapitel 1.3.2 erwähnten pathophysiologisch erhöhten Arginase-Expression.

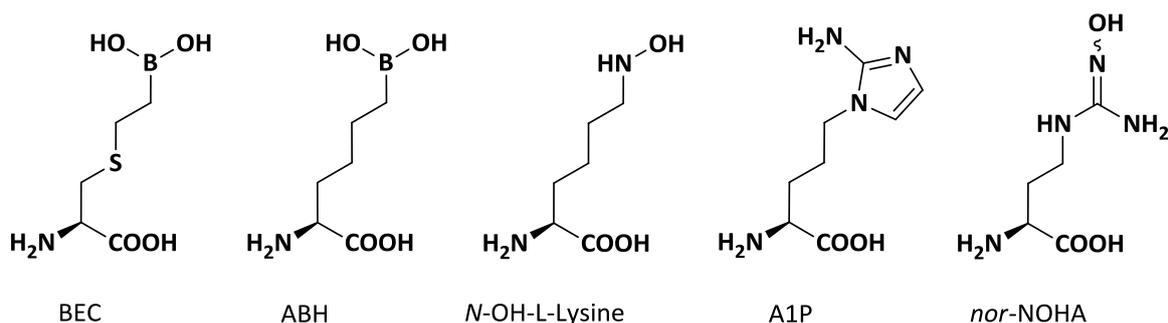
Literaturbekannte Arginase-Inhibitoren sind strukturell verwandt mit dem physiologischen Inhibitor NOHA. Sie lassen sich weitestgehend in zwei unterschiedliche Klassen einteilen, die Boronsäure-Derivate und L-Arginin-Analoga. Unter den Boronsäuren gelten (S)-2-Amino-6-

boronhexansäure (ABH) und *S*-(2-Boronoethyl)-L-cystein (BEC) als potenteste Vertreter.<sup>[96,97]</sup> Bei den Argininanaloga ist das *N*<sup>0</sup>-Hydroxy-*nor*-L-arginin (*nor*-NOHA) die potenteste Verbindung.<sup>[66]</sup> Ein zusätzlicher Vorteil des *nor*-NOHA gegenüber NOHA ist, dass es sich nicht um ein Substrat der NOS handelt.<sup>[98]</sup> Weitere Vertreter dieser Klasse sind u. a. *N*<sup>ε</sup>-Hydroxy-L-lysin, *N*<sup>0</sup>-Hydroxy-L-indospicin<sup>[65]</sup> und die kürzlich veröffentlichten 2-Aminoimidazol-Aminosäuren mit (*S*)-2-Amino-5-(2-aminoimidazol-1-yl)pentansäure (A1P) als potenteste Verbindung.<sup>[99]</sup> Angaben zu den  $K_i$ -Werten sind in der Literatur sehr heterogen beschrieben und variieren je nach Arbeitsgruppe, Enzym/Spezies und pH-Wert sehr stark. Ausgewählte Hemmdaten sind in Tab. 1.1 zusammengefasst. Gut miteinander vergleichbar sind die Test-Daten an der humanen Arginase II, die 2001 von Colleluori und Ash veröffentlicht wurden, weil eine einheitliche Methode bei physiologischen pH-Bedingungen zum Vergleich von ABH, BEC, NOHA und *nor*-NOHA angewendet wurde. Dabei wurde *nor*-NOHA als potentester Vertreter mit einem  $K_i$ -Wert von 51 nM identifiziert.<sup>[100]</sup>

**Tabelle 1.1:**  $K_i$ -Werte ausgewählter Hemmstoffe der Arginase unterschiedlicher Spezies und Isoenzyme.

Inhibitor	$K_i$ -Werte in $\mu\text{M}$				
	Ratten Arginase I [15,66]	Bovine Arginase I [65]	Leishmania, Arginase I [101]	Humane Arginase I [101]	Humane Arginase II [100]
NOHA	$10 \pm 2^{a,[66]}$ $42 \pm 4^{b,[15]}$	$30 \pm 5^a$ $30 \pm 8^b$	$85^b$	$70^b$	$1,6 \pm 0,1^a$
<i>nor</i> -NOHA	$0,5 \pm 0,1^{a,[66]}$		$50^b$	$10^b$	$0,051 \pm 0,008^a$
ABH			$1,3^b$	$3,5^b$	$0,25 \pm 0,05^a$
BEC			$10^b$	$14^b$	$0,31 \pm 0,04^a$

<sup>a</sup> pH 7,4; <sup>b</sup> pH 9,0



**Abbildung 1.9:** Strukturformeln der potentesten bekannten Arginase-Hemmstoffe aus der Literatur.

Bei einer Studie an alten Ratten konnte gezeigt werden, dass eine Arginase-Aktivierung durch Nitrosylierung eines Cysteinrestes, vermittelt durch eine erhöhte iNOS-Expression, zu endothelialer Dysfunktion führt und die Langzeitgabe von ABH die Endothelfunktion wieder herstellen konnte. In einer Kontrollgruppe von jungen Ratten hatte die Arginase-Hemmung keine Auswirkung gezeigt.<sup>[70]</sup> Ebenso konnte *nor*-NOHA erfolgreich bei hypertensiven Ratten zur Blutdrucksenkung eingesetzt werden.<sup>[102]</sup> Mehrere Studien zum Einsatz der Arginase-Inhibitoren bei Asthma bronchiale in Maus- und Meerschweinchen-Modellen zeigten eine starke Verminderung der Hyperreaktivität der Luftwege.<sup>[73]</sup> Auch durch Inhibitor-Studien an isoliertem humanen *Corpus cavernosum*-Gewebe konnte gezeigt werden, dass eine Arginase-Hemmung bei erektiler Dysfunktion erfolgversprechend ist.<sup>[97]</sup>

Es existieren jedoch auch Studien an vaskulären Endothelzellen, bei denen die Inhibition der Arginase I und II durch BEC und *nor*-NOHA einen Anstieg von Arginase II auf Proteinebene induziert und es nach Absetzen des Inhibitors zu einer erhöhten Aktivität kommt. Es wird vermutet, dass die Halbwertszeit der Arginase II verlängert wird. Genauere Untersuchungen stehen noch aus.<sup>[103]</sup>

### 1.4.5 Modulation der DDAH

Die DDAH ist ein interessantes therapeutisches Target, da neben erhöhten auch erniedrigte ADMA-Spiegel pathologische Prozesse indizieren. Somit können sowohl Hemmung als auch Aktivierung der DDAH ein therapeutisches Ziel sein. Aufgrund fehlender aktiver DDAH-2 kann bisher leider keine Aussage zur Isoform-Selektivität gemacht werden. In dieser Arbeit angegebene Hemmdaten beziehen sich ausschließlich auf DDAH-1.

#### 1.4.5.1 Aktivierung

Zu der Aktivierung der DDAH werden in der Literatur verschiedene Strategien diskutiert: Transkriptionssteigerung, Gen-Therapie, Verminderung oxidativer Inaktivierung oder allosterische Aktivierung.<sup>[76]</sup> Im Folgenden soll auf einzelne Möglichkeiten näher eingegangen werden.

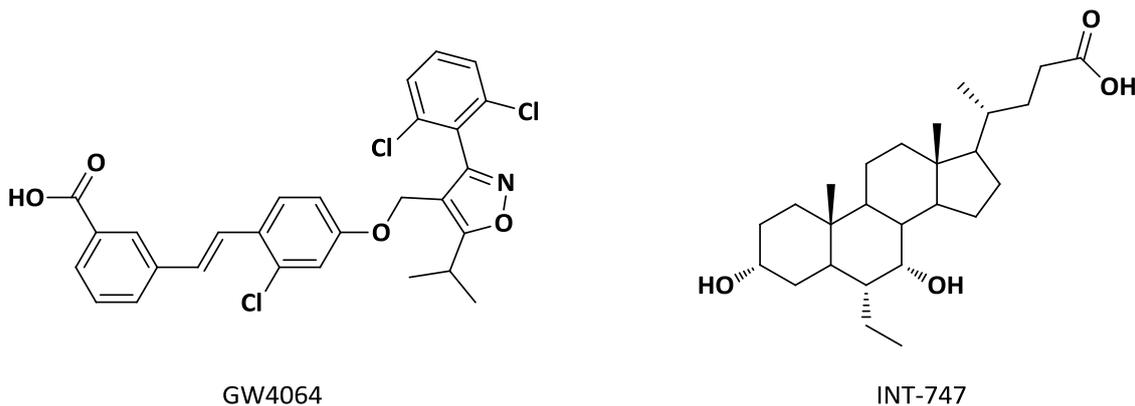
#### Steigerung der Transkription

Achan *et al.* publizierten 2002, dass *all-trans*-Retinolsäure die DDAH-2 Expression in kultivierten Endothelzellen steigert und dadurch die ADMA-Spiegel senkt, sowie die NO-Produktion erhöht.<sup>[104]</sup> Auch  $\alpha$ -Liponsäure soll den ADMA-Abbau durch DDAH-Aktivierung in kultivierten Endothelzellen steigern und zu einer Hochregulation von DDAH-2-mRNA

führen.<sup>[105]</sup> Ob eine Verminderung der ADMA-Spiegel an dieser Stelle tatsächlich DDAH-2-abhängig ist, scheint laut jüngerer Erkenntnisse, die die Beteiligung der DDAH-2 am ADMA-Metabolismus in Frage stellen, allerdings zweifelhaft (s. Kap. 1.3.2).

Eine IL-1 $\beta$ -induzierte Expressionsteigerung der DDAH-1 in vaskulären, glatten Muskelzellen reduziert ebenfalls ADMA-Spiegel.<sup>[106]</sup>

Weiterhin sind Farnesoid-X-Rezeptor (FXR)-Agonisten in der Lage die Expression von DDAH-1 zu steigern und darüber ADMA-Spiegel zu reduzieren.<sup>[107–109]</sup> Die DDAH-Promoterregion besitzt eine FXR-Bindestelle über deren Modulation Transkriptionsprozesse gesteuert werden können. Eine dieser Verbindungen, das Gallensäure-Derivat INT-747 (6-EDCA, OCA), wird derzeit in einer klinischen Phase-III-Studie für die Indikation „primäre biliäre Zirrhose (PBC)“ untersucht. Für die Indikationen „*nonalcoholic steatohepatitis* (NASH)“ und „portale Hypertonie“ befindet sich die Substanz in Phase II.<sup>[110]</sup>



**Abbildung 1.10:** Strukturformeln von Farnesoid-X-Rezeptor-Agonisten<sup>[107,109,110]</sup>

Über selektive Aktivatoren der DDAH-Transkription wurde bis dato nichts veröffentlicht. Ein Problem bei der Entwicklung ist, dass der angesteuerte Promotor bzw. die Transkriptionsfaktoren neben der DDAH noch weitere Targetgene haben und das Ergebnis eines solchen Wirkmechanismus daher schwer vorherzusagen ist. Deutlich wird dies u. a. daran, dass obwohl die Promoter beider DDAH-Isoformen eine FXR-Bindestelle besitzen, nur die DDAH-1 induziert wird. Die therapeutische Nutzbarkeit eines solchen Ansatzes ist fraglich.

## Allosterische Aktivatoren

Der Einsatz kleiner Moleküle als allosterische Aktivatoren der DDAH bietet eine ideale Strategie zur Senkung erhöhter ADMA-Spiegel. Ghebremariam *et al.* [2011] haben auf diesem Gebiet ein *High Throughput Screening* (HTS) mit 132.000 Verbindungen durchgeführt. Im Zuge der Hit-Validierung wurde eine positive Wirkung für eine kleine Anzahl an Verbindungen bestätigt. Genauere Angaben zu diesen Verbindungen wurden bisher nicht publiziert.<sup>[111]</sup>

### 1.4.5.2 Hemmung

Eine Hemmung der DDAH kann sowohl bei erniedrigten ADMA-Spiegeln als auch bei überschießender NO-Produktion indiziert sein. Durch die Hemmung würde ADMA vermindert abgebaut und dadurch NO indirekt gesenkt werden. Der Vorteil der indirekten Hemmung gegenüber der direkten NOS-Inhibition ist, dass auf diesem Wege die NOS vermutlich zu nicht mehr als 30% gehemmt wird und eine unerwünschte, totale NO-Blockade unwahrscheinlich ist.<sup>[76,112,113]</sup>

Zu den endogenen DDAH-Inhibitoren zählen  $Zn^{2+}$ , L-Citrullin (Produkthemmung), L-Homocystein und S-Nitroso-L-homocystein.<sup>[76,114,115]</sup> Wesentlich breiter ist das Feld der synthetischen Inhibitoren, da durch verschiedene neue Techniken, wie z.B. computergestütztes Design/Screening, HTS aber auch rationale Überlegungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen, sehr unterschiedliche Substanzklassen als Inhibitoren identifiziert wurden.

Eine mittlerweile stark beforschte Wirkstoffklasse sind Arginin-Analoga. Das 2-Methoxyethyl-L-arginin (L-257) und sein Methylester (L-291), wurden 2005 von Rossiter *et al.* entwickelt und basieren auf der Struktur des DDAH-Substrates NMMA. L-257 ist der potenteste Hemmstoff dieser Substanzreihe.<sup>[116]</sup> Etwa zeitgleich wurden die Pentafluorphenylsulfonsäuren als Hemmstoffe der *Pseudomonas aeruginosa* DDAH (*PaDDAH*) und der bakteriellen Arginin-Deiminase von Vallance *et al.* publiziert.<sup>[117]</sup>

Die Stoffklasse der Indolthioarbitursäuren, deren potentester Vertreter das SR445 ist, sind gute Hemmstoffe der *PaDDAH*,<sup>[118]</sup> jedoch unwirksam am humanen Enzym.<sup>[119]</sup> Im Rahmen ihrer Promotion haben Kotthaus und Schade auf Basis dieser Erkenntnisse verschiedene Guanidine und Amidine synthetisiert bzw. gescreent und an der hDDAH-1 getestet. So wurde auch das 1989 von Babu *et al.* veröffentlichte  $N^5$ -(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithin

(Vinyl-NIO),<sup>[120]</sup> ein NOS-Inhibitor, als potentester Vertreter seiner Klasse als DDAH-Hemmstoff mit einem  $K_i$ -Wert von  $2 \pm 1 \mu\text{M}$  identifiziert.<sup>[119]</sup> Ein überraschendes Ergebnis der Arbeiten ist, dass auch die decarboxylierte Variante des L-257, das *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin (AbMEG) eine vergleichbare Hemmpotenz aufweist.

Als Weiterentwicklung der im Arbeitskreis entdeckten Wirkstoffe wurden weitere Alkylamidine von Wang *et al.* [2009] als duale bzw. spezifische Inhibitoren von DDAH und nNOS vorgestellt. Je nach Kettenlänge des Substituenten wird entweder die nNOS oder die DDAH stärker gehemmt. Bei mittleren Längen werden beide Enzyme gleich gut gehemmt, hierbei spricht der Autor von „dualen“ Inhibitoren.<sup>[121]</sup> Kristallographische Untersuchungen mit *N*<sup>5</sup>-(1-Iminopentyl)-L-ornithin (Propyl-NIO) zeigen eine reversible kovalente Bindung im aktiven Zentrum.<sup>[122]</sup>

Durch ein HTS entdeckten Johnson *et al.* [2011] 4-Halopyridine als zeitabhängige, kovalente, irreversible Inhibitoren mit einem interessanten Hemmmechanismus. Die in Lösung im Gleichgewicht weniger vorliegende, am Pyridinstickstoff protonierte Form der Verbindung wird durch Asp66 im aktiven Zentrum gebunden. Ein nukleophiler Angriff des Cys249-Thiolats an C<sub>4</sub> führt zur Elimination des Halogenids. Das Inhibitormolekül wird irreversibel verändert. Aufgrund ihrer Größe werden die 4-Halopyridine als „*fragment-sized*“ beschrieben und sind eher als modifizierbare Grundkörper für die Synthese selektiver Verbindungen zu verstehen.<sup>[123,124]</sup>

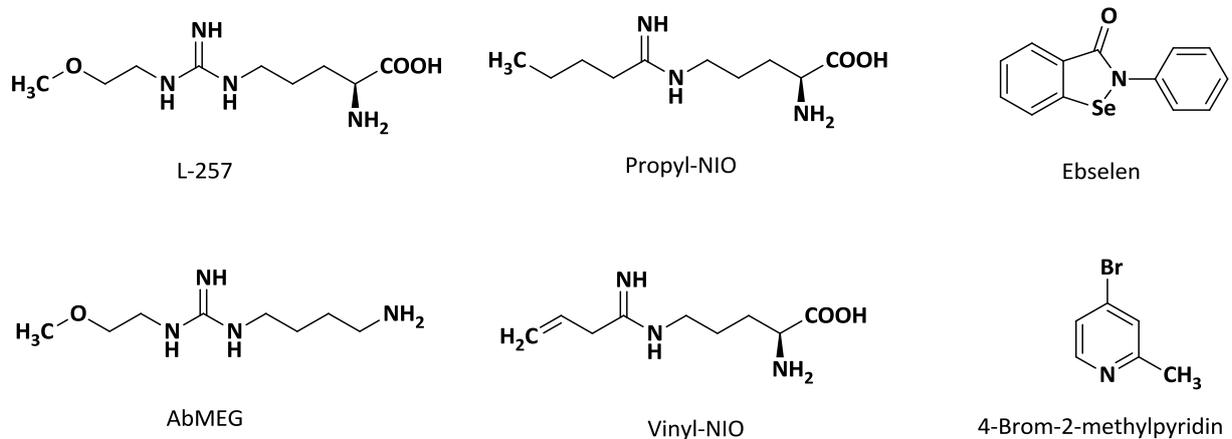
Ebenfalls durch ein HTS wurde Ebselen von Linsky *et al.* [2011] als DDAH-Inhibitor identifiziert. Der Bindemodus ist kovalent, irreversibel und geht mit einer strukturellen Veränderung einher. Dabei wird der Selenazol-Ring durch den Cys249-Schwefel aufgebrochen und eine neue Selensulfid-Bindung geformt. Eine Selektivität für die DDAH liegt nicht vor, sondern auch andere Enzyme (z.B. Lipoxygenase, NADPH Oxidase, Proteinkinase C) werden gehemmt. Durch eventuell nutzbare Synergieeffekte verspricht es ein interessantes Multitarget-Molekül zu sein, das derzeit in einer Phase-III-Studie für die Indikation „akuter, ischämischer Schlaganfall“ getestet wird.<sup>[125]</sup>

Weitere Inhibitoren wurden von Ghebremariam *et al.* [2012] in Zusammenhang mit der Entwicklung eines neuen HTS publiziert. Jedoch wurde keiner der Substanzen eine besondere Hemmwirkung attestiert. Vergleichsmöglichkeiten mit bekannten Inhibitoren werden dadurch erschwert, dass nur IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt wurden.<sup>[126]</sup>

**Tabelle 1.2:** Hemmdaten ausgewählter kompetitiver Inhibitoren der hDDAH-1

Inhibitor (Guanidine)	$K_i$ / $\mu\text{M}$	Inhibitor (Amidine)	$K_i$ / $\mu\text{M}$
L-257	$13 \pm 2$	Vinyl-NIO	$2 \pm 1$
Propargyl-Arg	$17 \pm 5$	Methyl-NIO / L-IPO	$145 \pm 15 / 52 \pm 4^a$
AbMEG	$18 \pm 6$	Ethyl-NIO	$32 \pm 6$
		Propyl-NIO	$7,5 \pm 0,4^a$

Sofern nicht anders deklariert stammen die Testdaten von Kotthaus *et al.*<sup>[119,127]</sup> <sup>a</sup>Daten von Wang *et al.*<sup>[121]</sup>

**Abbildung 1.11:** Strukturformeln ausgewählter potenter DDAH-Inhibitoren aus der Literatur.

Eine Selektivität gegenüber anderen Enzymen, insbesondere der NOS und der Arginase, und eine gleichzeitig ausreichende Hemmpotenz gegenüber der DDAH sei laut einem Review von Leiper und Nandi aus dem Jahr 2011 nur für L-257 und L-291 gegeben.<sup>[76]</sup> Doch auch das im Arbeitskreis Clement daraus weiterentwickelte AbMEG ist in Bezug auf die hDDAH-Hemmpotenz mit L-257 vergleichbar und in Punkto Selektivität gegenüber Arginase und NOSs verbessert.<sup>[119,128]</sup>

*In vivo*-Studien an Nagetieren belegen die Wirkung von L-257 und L-291. Nach Infusion wurde eine Erhöhung des zirkulierenden ADMA nachgewiesen und in einem septischen Schock-Modell wurde die Stabilisierung des Blutdrucks festgestellt.<sup>[76,129]</sup>

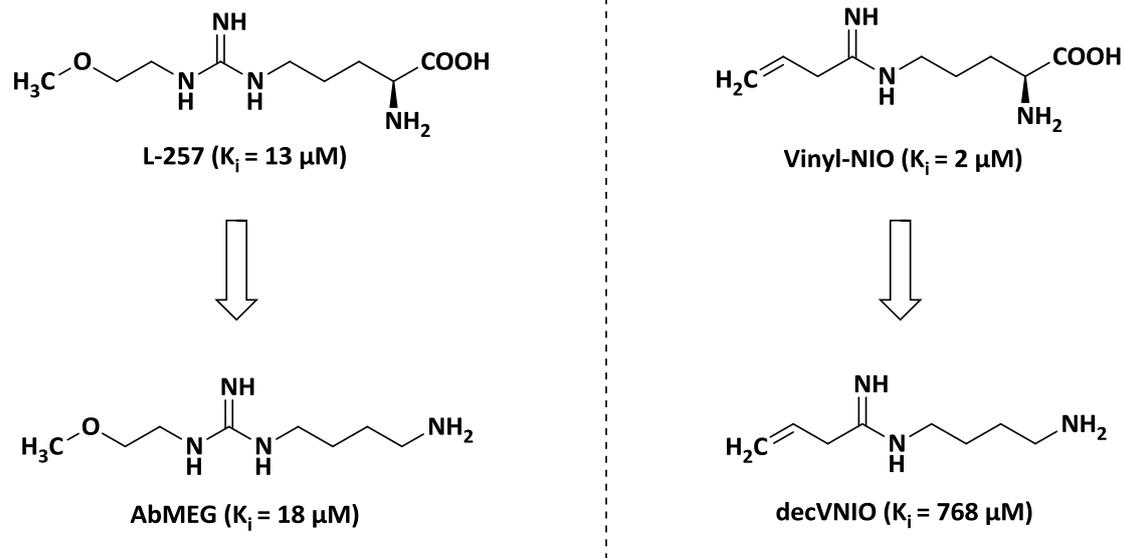
## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen neue Modulatoren des NO-generierenden Systems entwickelt werden. Ziel ist insbesondere eine selektive Hemmung der Enzyme DDAH und Arginase, durch deren Modulation die NO-Bioverfügbarkeit indirekt beeinflusst werden kann. Die therapeutische Bedeutung wurde in Kapitel 1.4 bereits ausführlich diskutiert.

### 1.5.1 DDAH-Inhibitoren

Als Leitstrukturen und Grundlage für die Entwicklung neuer kompetitiver Inhibitoren dienen das von L-257 abgeleitete AbMEG und das im Arbeitskreis als potentester DDAH-Inhibitor entdeckte Vinyl-NIO<sup>[120]</sup> ( $K_i = 2 \mu\text{M}$ )<sup>[130]</sup> (s. Abb. 1.12). Bei den beiden L-Arginin-Derivaten L-257 und AbMEG handelt es sich um Strukturen mit Guanidin-Funktion, die gute Inhibitor-Eigenschaften gegenüber der DDAH aufweisen ( $K_i = 13 \mu\text{M}$  bzw.  $18 \mu\text{M}$ )<sup>[119,130]</sup> und selektiv gegenüber NOSs und Arginase sind. Bezüglich der Arginase ist AbMEG dem L-257 sogar leicht überlegen (s. Tab. 1.3). Das L-Ornithin-Derivat Vinyl-NIO besitzt eine Amidin-Funktion und kann keine derartige Selektivität vorweisen, zumal es ursprünglich als NOS-Inhibitor entwickelt wurde. In Hinblick auf eine Selektivitäts- Optimierung gegenüber Arginase und NOSs wurde von Schade und Kotthaus das decarboxylierte Vinyl-NIO-Derivat *N*-(4'-Aminobutyl)but-3-enamidin (decVNIO), analog zu L-257/AbMEG, synthetisiert.<sup>[119,128]</sup> Überraschenderweise führt im Gegensatz zum AbMEG der Verlust der Carboxylgruppe bei decVNIO zu einem massiven Verlust der Hemmpotenz für die DDAH ( $K_i = 768 \mu\text{M}$ ; s. Abb. 1.12), wohingegen die NOSs, zwar etwas reduziert, weiterhin stark gehemmt werden (s. Tab. 1.3). Dieses Phänomen könnte auf einen unterschiedlichen Bindemodus der Guanidin-(AbMEG) und Amidin-(decVNIO)-basierten Substanzen im katalytischen Zentrum zurückzuführen sein.

Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, ob die unterschiedlichen Substitutionsmuster an den Guanidin- und Amidin-Funktionen oder die unterschiedlichen Funktionalitäten selbst dafür verantwortlich sind. Ebenso soll der Einfluss der Carboxylgruppe bezüglich Selektivität und Hemmpotenz genauer untersucht werden.



**Abbildung 1.12:** Vergleich der Auswirkung des Carboxylgruppenverlusts von L-257 und Vinyl-NIO hinsichtlich der Hemmpotenz an der DDAH.

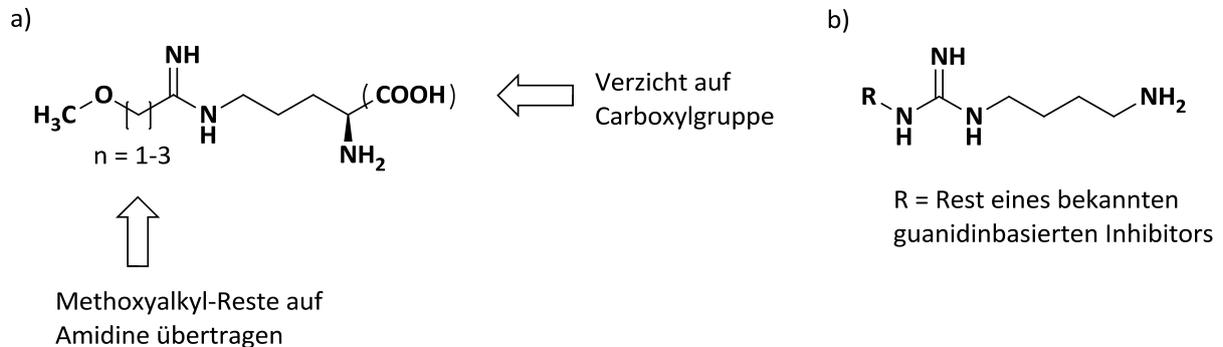
**Tabelle 1.3:** Hemmdaten der vier Leitstrukturen an den NOS-Isoenzymen und Arginase I<sup>[119,127,130]</sup>

Verbindung	Hemmung bei 100 $\mu\text{M}$ / %			
	nNOS	eNOS	iNOS	Arginase I
L-257	4 $\pm$ 12	4 $\pm$ 7	0 $\pm$ 13	16 $\pm$ 9
AbMEG	0 $\pm$ 9	4 $\pm$ 6	0 $\pm$ 10	7 $\pm$ 6
Vinyl-NIO	94 $\pm$ 3	45 $\pm$ 2	84 $\pm$ 1	25 $\pm$ 9
decVNIO	83 $\pm$ 1	51 $\pm$ 2	77 $\pm$ 3	16 $\pm$ 5

Die Synthese und Testung strukturverwandter Derivate der Leitstrukturen soll zur Aufklärung beitragen und gleichzeitig eine Verbesserung in Hemmpotenz und Selektivität erbringen. Ein diesbezüglich rationaler Lösungsansatz ist die Übertragung von Methoxyalkyl-Resten auf Amidin-Funktionen (s. Abb. 1.14a). Die Alkylkette der Aminosäure sollte dabei in der Länge konstant gehalten werden, da der Abstand zwischen Aminogruppe und Guanidin- bzw. Amidin-Funktion wichtig für die Hemmpotenz ist.<sup>[116]</sup> Des Weiteren ist es elementar jeweils auch die decarboxylierten Varianten der neuen Verbindungen, sowie die decarboxylierte Variante eines zweiten Guanidin-basierten Inhibitors (s. Abb. 1.14b) zu synthetisieren.

Neben den rationalen Lösungsvorschlägen soll eine im Arbeitskreis neue Technik zum Inhibitor-Design genutzt werden. Durch computergestützte Docking-Analysen mit realen Röntgenkristallstrukturen der hDDAH-1 und bekannten Inhibitoren, soll ein Modell zur Identifizierung potentieller neuer Inhibitoren entwickelt werden. Die bekannten Hemmstoffe

werden dazu in das aktive Zentrum der Struktur gedockt und das erhaltene Resultat in Relation zu ihren experimentell bestimmten  $K_i$ -Werten gesetzt. Neue Hemmstoffe können so gezielter und effizienter entwickelt werden.

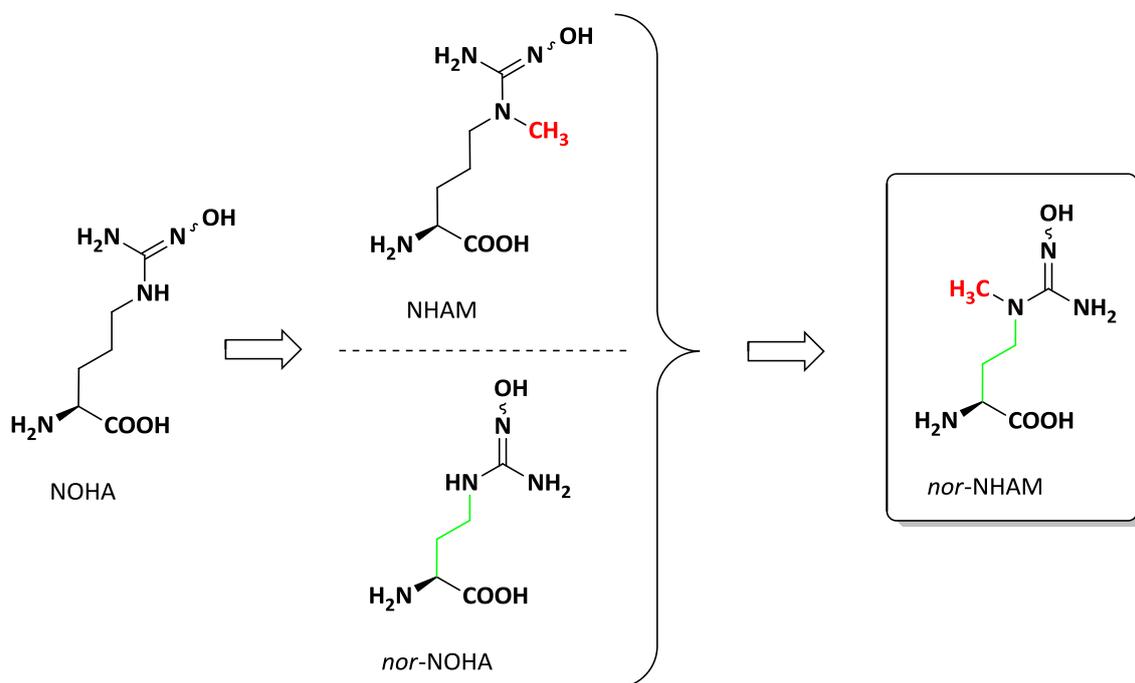


**Abbildung 1.13:** Vorgeschlagene Modifikationen zur Optimierung der Leitstruktur AbMEG und Untersuchung der unterschiedlichen Bindemodi von AbMEG und Amidinbasierten Analoga.

Ein zweites Ziel bei der Hemmstoff-Entwicklung, soll die Synthese geeigneter Prodrug-Kandidaten für eine mögliche orale Applikation sein. Ein Prodrug ist eine Wirkstoffvorstufe, die erst im Körper durch Biotransformation in die eigentliche Wirkform überführt wird.<sup>[131,132]</sup> Im Arbeitskreis wurden bereits verschiedene Prodrug-Techniken für Amidin- und Guanidin-haltige Arzneistoffe entwickelt. Durch ihre hohe Basizität liegen derartige Verbindungen unter physiologischen Bedingungen in der Regel in protonierter Form vor. Sofern keine geeigneten Transporter zur Verfügung stehen, weisen sie meist eine schlechte orale Bioverfügbarkeit auf, weil passive Diffusion durch Biomembranen für geladene Teilchen nicht möglich ist. Durch geeignete Modifikationen der Struktur kann die Basizität herabgesetzt werden und die Absorption im Gastrointestinaltrakt nach oraler Applikation erhöht werden. Einige bekannte Prodrug-Prinzipien sollen in dieser Arbeit auf den vielversprechendsten Kandidaten hinsichtlich Hemmpotenz und Selektivität angewendet werden.

## 1.5.2 Arginase-Inhibitoren

Der einzige Unterschied des derzeit potentesten Arginase-Inhibitors *nor*-NOHA, im Vergleich zu NOHA, dem endogenen Hemmstoff und Intermediat der NO-Synthese, ist die Verkürzung um eine Methylengruppe. Diese kleine strukturelle Änderung erbrachte bereits einen starken Potenzgewinn ( $K_{i(\text{NOHA})} = 10\text{-}42 \mu\text{M}$ ;<sup>[15,65,66]</sup>  $K_{i(\text{nor-NOHA})} = 0,5 \mu\text{M}$ <sup>[65]</sup>) und zusätzlich den Vorteil, dass es kein Substrat der NOSs ist. Eine weitere strukturell ähnliche Substanz ist das *N*<sup>ω</sup>-Hydroxy-*N*<sup>δ</sup>-methyl-L-arginin (NHAM), bei der am δ-Stickstoffatom eine Methyl-Gruppe substituiert wurde. Diese wurde im Arbeitskreis zufällig als potenter Arginase-Inhibitor entdeckt ( $K_i = 17 \mu\text{M}$ <sup>[119]</sup>), als sie auf etwaige NOSs-Substrateigenschaften untersucht wurde. Auch NHAM scheint beim direkten Vergleich der  $K_i$ -Werte innerhalb der gleichen Spezies etwas potenter als NOHA zu sein (bovine Arginase I;  $K_{i(\text{NOHA})} = 30 \mu\text{M}$ ,  $K_{i(\text{NHAM})} = 17 \mu\text{M}$ ). Es liegt daher auf der Hand die Struktureigenschaften dieser beiden Verbindungen mit der Synthese von *N*<sup>ω</sup>-Hydroxy-*N*<sup>γ</sup>-methyl-*nor*-L-arginin (*nor*-NHAM) zu kombinieren. Durch diese Strategie wird erwartet die Hemmpotenz und Selektivität innerhalb der Arginin-Analoga als Arginase-Hemmstoffe weiter zu verbessern.



**Abbildung 1.14:** Übersicht der strukturellen Unterschiede von NOHA, NHAM, *nor*-NOHA und Vorschlag von *nor*-NHAM als neuen Arginase-Hemmstoff.

## 2 *Molecular Modeling* an der hDDAH-1

---

### 2.1 Einleitung und Zielsetzung

Der Begriff „*Molecular Modeling*“ umfasst verschiedene Techniken computergestützten Modellierens chemischer Moleküle. Modelle haben in der Wissenschaft unterschiedlichen Nutzen und können folgendermaßen klassifiziert werden:<sup>[133]</sup>

- Modelle sind nützlich zur Vereinfachung bei der Erklärung wichtiger Phänomene anhand limitierter Analytik.
- Sie dienen als didaktische Illustrationen sehr komplizierter Sachverhalte, die anders nicht zugänglich wären. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass die Modelle nicht die Realität widerspiegeln.
- Mechanische Analogien sind eine weitere Art von Modellen. Sie basieren auf definierten Fakten durch Kombination zweier unterschiedlicher Felder. Diese Modelle sind empirisch und erweiterbar bzw. optimierfähig durch reelle Daten. Ein Beispiel hierfür sind Kraftfelder.
- Eine vierte Anwendung findet sich im Bereich der mathematischen Modelle. Sie helfen bei der Simulation von Prozessen z.B. Enzymkinetiken.

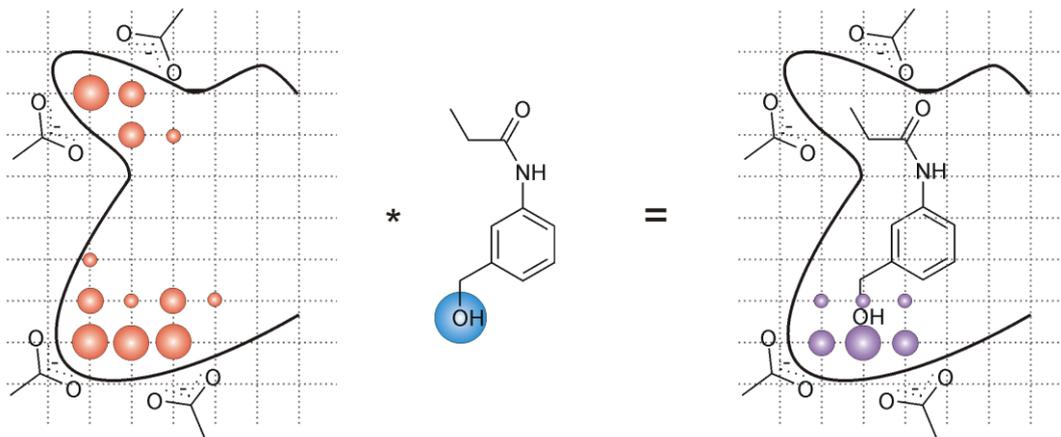
Das Drug-Design ist ein essentieller Schritt der Modellierung. Mit Hilfe der genannten Modelle können Inhibitoren virtuell erstellt und im Computer-Experiment getestet werden.<sup>[133]</sup> Weitere Informationen zur Theorie über 3D-Strukturen, Kraftfelder, Geometrie-Optimierung, Energie-Minimierungs-Verfahren, Ladungs- und Solvations-Effekte, quantenmechanische Methoden, Konformationsanalysen, Interaktionspotentiale/-felder können z- B. in der folgenden Übersichtsarbeit nachgelesen werden: Höltje *et al.*, *Molecular Modeling*.<sup>[133]</sup>

In Kooperation mit Prof. Gohlke soll im Rahmen dieser Arbeit ein Prognose-Modell auf Basis der hDDAH-1-Kristallstruktur und einer Reihe strukturverwandter, aminosäurebasierter Inhibitoren mit bekanntem  $K_i$ -Wert erstellt werden. Dazu werden Techniken dreidimensionaler, quantitativer Struktur-Wirkungs-Beziehungen (3D QSAR) ausgenutzt, mit denen die Struktur der Verbindung zu dessen biologischer Aktivität in Korrelation gesetzt

wird. Voraussetzung hierfür ist das *Alignment* (deutsch: Überlagerung/Ausrichtung) von 3D-Strukturen, eine relative, räumliche Orientierung der Wirkstoffmoleküle, in der Art wie sie in der Bindetasche vorliegen würden. Nach diesem Schritt können verschiedene Methoden angewendet werden, wie z.B. CoMFA (engl. *Comparative Molecular Field Analysis*) und dessen Variante CoMSIA (engl. *Comparative Molecular Similarity Indices Analysis*). Hierbei werden aber lediglich die Informationen der alignierten Liganden zur Berechnung biologischer Aktivitäten unbekannter Verbindungen genutzt.<sup>[133,134]</sup> Die in dieser Arbeit verwendete Methode ist AFMoC (engl. *Adaption of Fields for Molecular Comparison*), welche eine Weiterentwicklung von CoMFA darstellt, indem sie zusätzlich Proteininformationen miteinfließen lässt.<sup>[135]</sup> An dieser Stelle soll AFMoC zusammen mit weiteren wichtigen Begriffen kurz erklärt werden.

**DrugScore:** Wissensbasierte Wertungs-Funktion zur Vorhersage von Protein-Ligand-Interaktionen. Hierbei werden Strukturinformationen von kristallographisch ermittelten Protein-Ligand-Komplexen genutzt und u. a. in distanzabhängige Paarpotentiale für Protein- und Liganden-Atome umgewandelt. Dies dient zur Vorhersage von Bindemodi und Bindungsaffinitäten.<sup>[136]</sup>

**AFMoC:** DrugScore Potentialfelder werden durch Platzieren eines Gitters in der Proteinbindetasche generiert, indem die Paarpotentiale zwischen Liganden-Atom-Sonden auf den Gitterknotenpunkten und dem Protein gemessen werden. Durch Multiplizieren der Atomtypeigenschaften der in der Bindetasche gedockten Liganden mit benachbarten Gitterwerten, entstehen aus diesen Potentialfeldern Interaktionsfelder. Es folgt eine PLS-Analyse (engl. *Partial Least Squares*).<sup>[135]</sup>



**Abbildung 2.1:** Schema zur Berechnung der Interaktionsfelder. Mit rot gezeichnet sind die Potentialfelder des Proteins für den Atom-Typ „Hydroxylsauerstoff“ in der Bindetasche, durch Multiplikation mit der Ligandeninformation (blau) entstehen die Interaktionsfelder (violett) in der Bindetasche.<sup>[135]</sup>

**Moloc:** Eine Molecular Design Software Suite von der Firma Gerber Molecular Design, die für interaktive Manipulation, Visualisierung und Evaluation von Molekülstrukturen im dreidimensionalen Raum entwickelt wurde. Hierbei wurde besonderer Wert auf hohe Interaktionsmöglichkeiten mit dritten Programmen gelegt. Zwei Kraftfelder sind direkt in der Moloc Software integriert, das „MAB“ *all atom force field* und das „reduzierte C-alpha Kraftfeld für Peptide und Proteine“.<sup>[137,138]</sup>

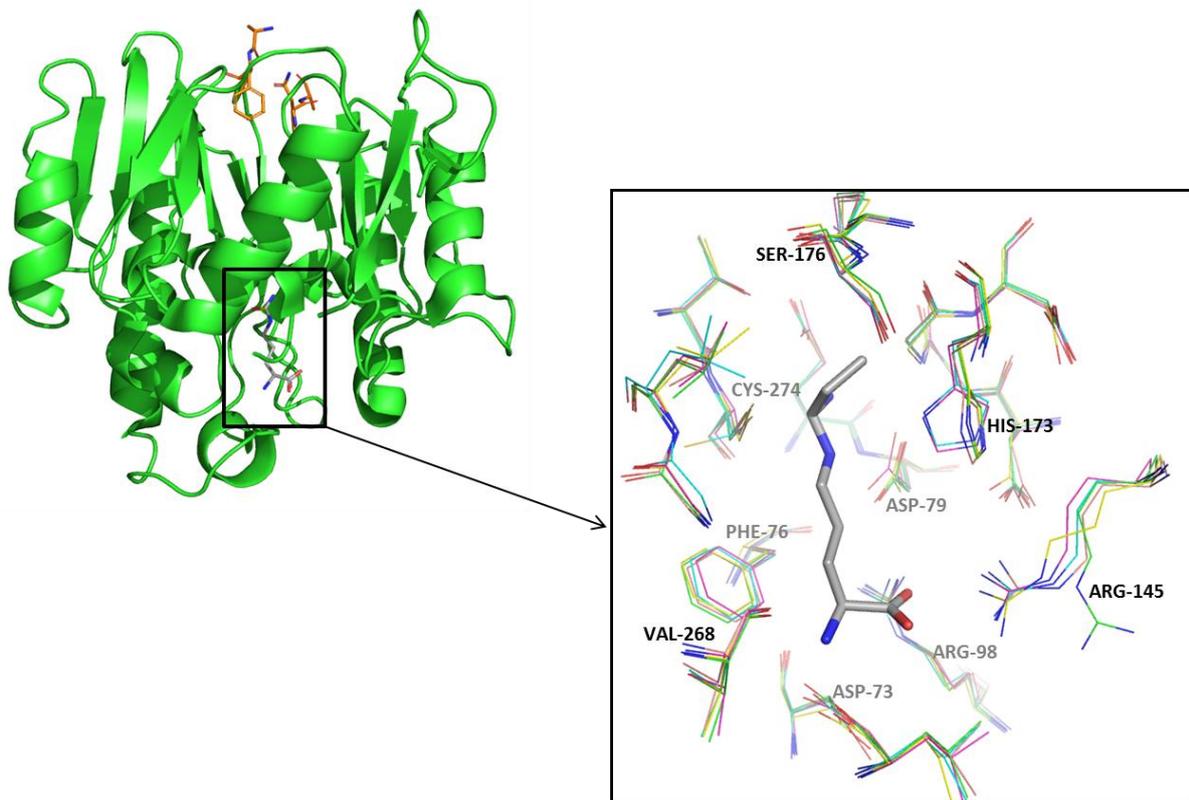
**PLS-Analyse:** Bildung eines funktionellen Zusammenhangs zwischen chemischer Struktur (berechneten Energien) und biologischer Aktivität ( $K_i$ ). Dabei wird versucht, für die große Zahl an Variablen, die bei der 3D-QSAR-Analyse entsteht, eine günstige Kombination von wenigen Deskriptoren zu finden.<sup>[134]</sup>

**Kreuzvalidierung:** Überprüfung der statistischen Signifikanz und Vorhersagbarkeit des Modells. Häufig angewendete Form ist die „*Leave One Out*“ (LOO)-Methode. Es wird eine Verbindung des Modells entnommen und mit den verbliebenen Verbindungen ein neues Modell berechnet. Die vorher entnommene Verbindung wird anhand dieses Modells vorhergesagt und die Differenz zwischen berechneten und experimentell bestimmten Affinitäten bestimmt. Dieser Vorgang wird für jede Verbindung des Datensatzes wiederholt. Die Summe der quadratischen Differenzen ergibt den PRESS-Wert (engl. *Predictive Residual Sum of Squares*), aus dem sich der  $q^2$ -Wert errechnen lässt, welcher eine analoge Größe zum Regressionskoeffizienten  $r^2$  ist und Aussagen zur Qualität des Modells erlaubt. Als statistisch signifikant gilt, wenn  $q^2 > 0,3$  ist. Ein Modell ist gut, wenn  $q^2 > 0,5$  ist.<sup>[134,139]</sup>

## 2.2 Kristallstrukturen der hDDAH-1

(Alle in dieser Arbeit verwendeten Kristallstrukturen sind in der Protein-Daten-Bank (PDB) unter <http://www.rcsb.org> zu finden.)

Die ersten beiden Kristallstrukturen der hDDAH-1 wurden 2007 von Leiper *et al.* veröffentlicht. Dabei wurde die hDDAH-1 einmal mit L-Citrullin (PDB 2JAI) und einmal mit L-257 (PDB 2JAJ) kokristallisiert.<sup>[129]</sup> In den darauffolgenden Jahren wurden weitere Kristallstrukturen generiert: im Komplex mit  $N^5$ -(1-Iminopropyl)-L-ornithin (Methyl-NIO, L-IPO, PDB 3I4A),<sup>[121]</sup> ohne Kosubstrat (PDB 3I2E)<sup>[121]</sup> und mit Propyl-NIO (PDB 3P8E).<sup>[122]</sup> Ein direkter Vergleich dieser fünf Kristallstrukturen durch dreidimensionale Überlagerung mit der Software PyMOL zeigt, dass Unterschiede bei der Ausrichtung der Aminosäureseitenketten im aktiven Zentrum größtenteils unerheblich sind (s. Abb. 2.2). Nur zwei Reste (His173 und Arg145) weisen Abweichungen auf, die näher erläutert werden sollen.

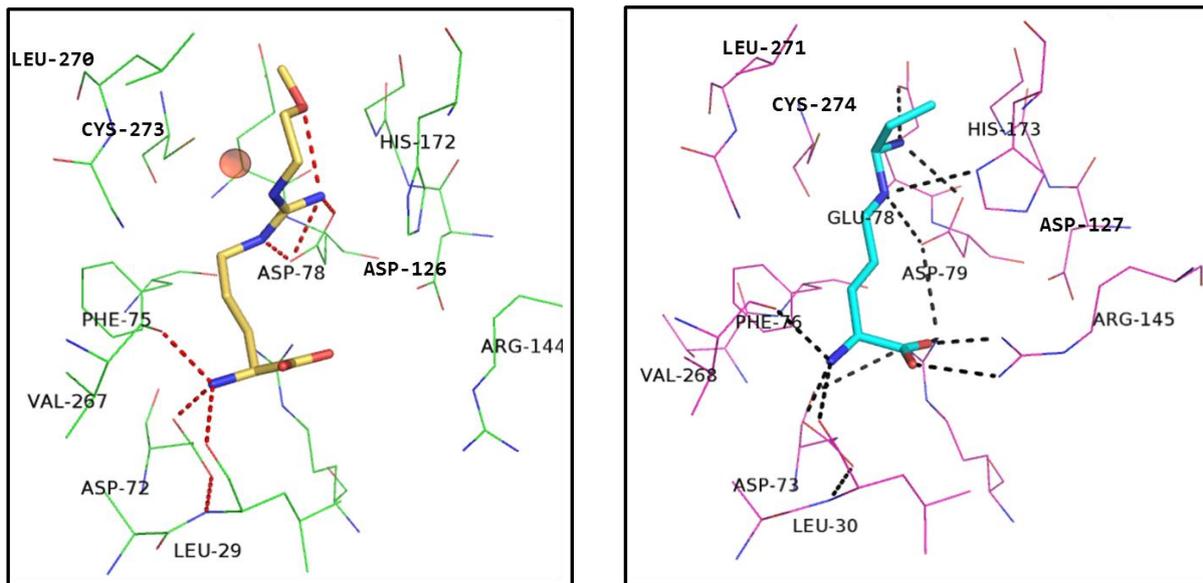


**Abbildung 2.2:** Kristallstruktur der hDDAH-1 mit Methyl-NIO (3I4A, pink) und vergrößertem Ausschnitt des aktiven Zentrums, überlagert mit 2JAJ (grün), 2JAI (türkis), 3I2E (rosa) und 3P8E (gelb).

Bei His173 findet man in den verschiedenen Strukturen unterschiedliche Konformationen. Der Imidazolring ragt bei 2JAI und 3I4A in die Bindetasche hinein, sodass ein Ring-Stickstoff für Wechselwirkungen mit dem Liganden zur Verfügung steht. Bei 2JAJ, 3I2E und 3P8E hingegen steht der Imidazolring parallel zur Bindetasche. Dies bedeutet, dass der Abstand zum Liganden für etwaige Wechselwirkungen zu groß ist. Eine Erklärung für dieses Phänomen ist schwierig, da keine Rationale beim Vergleich der zugehörigen Liganden gefunden werden konnte. 3I4A, 2JAJ und 3P8E sind mit Inhibitoren komplexiert, 2JAI mit dem Hydrolyseprodukt L-Citrullin und 3I2E enthält keinen Liganden.

Besonders interessant ist die Anordnung von Arg145, welches nur bei 2JAJ aus der Bindetasche heraus gedreht ist, und so keine direkten Wechselwirkungen mit Elektronenpaar-Donatoren wie z.B. einer Carboxylgruppe eingehen kann. L-257 liegt im Vergleich zu den anderen Liganden leicht verschoben in der Bindetasche. Es scheint, als würde der Methoxyethyl-Rest sterisch passen und die Verbindung die gesamte Bindetasche ausfüllen, sodass L-257 für seine inhibitorische Potenz nicht auf Wechselwirkungen mit Arg145 angewiesen ist (s. Abb. 2.2 und 2.3).

Ein Vergleich der von PyMOL gefundenen polaren Wechselwirkungen von 2JAJ mit 3I4A und den jeweiligen Liganden soll eventuelle unterschiedliche Einflüsse von Guanidin- versus Amidin-Funktion aufzeigen. PyMOL ist ein 3D-Grafikprogramm zur Visualisierung von Biomolekülen, das u. a. mögliche polare Kontakte aufzeigen kann, die über den Abstand von Atomen berechnet werden. Die in Abb. 2.3 angezeigten Wasserstoffbrückenbindungen sind bei L-257 und Methyl-NIO gleichwertig. Somit scheint auf diesem Weg kein echter Unterschied zwischen Guanidin und Amidin zu finden zu sein.



**Abbildung 2.3:** Kristallstrukturen der hDDAH-1 im Komplex mit Inhibitoren. Links: 2JAJ mit L-257 (roter Kreis: Wassermolekül);<sup>[129]</sup> Rechts: 3I4A mit Methyl-NIO.<sup>[121]</sup> Gestrichelte Linien stellen polare Wechselwirkungen dar. Die unterschiedliche Nummerierung der Reste ist auf die jeweilige Publikation zurückzuführen. Die Abbildungen wurden in Anlehnung an die Literatur modifiziert.

Es existieren noch weitere Kristallstrukturen der hDDAH-1 mit Mutationen an verschiedenen Aminosäuren, auf die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht näher eingegangen werden soll.<sup>[122]</sup>

## 2.3 Design eines Modells

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur die Kristallstrukturen 2JAI und 2JAJ publiziert. Das Modell wurde auf Grundlage der Kristallstruktur 2JAI erstellt.

Die Vorgehensweise für die Modellerstellung erfolgte in den folgenden Schritten:

1. Zunächst erfolgte die Modifikation der Kristallstruktur-Datei 2JAI. Da die Kristallstruktur im Original als Dimer (A- und B-Kette) vorliegt, wurde für die weitere Bearbeitung das Monomer (A-Kette) ohne gebundenen Liganden und ohne Wassermoleküle erzeugt. Lagen zwei Konfigurationen von Aminosäureseitenketten vor, so wurde die Unwahrscheinlichere davon entfernt. Des Weiteren wurden alle Seleno-Methionine gegen Methionin ersetzt.
2. Darauf erfolgte die Auswahl geeigneter Verbindungen mit bekanntem  $K_i$ -Wert an der hDDAH-1 für einen Trainingsdatensatz (s. Kap. 2.3.1). Aus den experimentellen  $K_i$ -Werten wurden  $pK_i$ -Werte berechnet.

3. Mit dem Docking-Programm Moloc wurden eine weitere Bearbeitung der Kristallstruktur, das Liganden-Alignment und eine Energie-Minimierung durchgeführt (s. Kap. 2.3.2).
4. Der letzte Schritt ist die Berechnung mit DrugScore/AFMoC. Hier erfolgt eine Korrelation der berechneten Ergebnisse mit den experimentellen Daten (s. Kap. 2.3.3).

### 2.3.1 Verbindungen für Trainingsdatensatz

Bei der Auswahl geeigneter Verbindungen für die Erstellung eines Modells sollte auf strukturelle Ähnlichkeiten und eine möglichst große Spanne an  $K_i$ -Werten geachtet werden. Diese wiederum sollten unter gleichen Testbedingungen ermittelt worden sein, um eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Das ist in der Literatur meistens nicht der Fall. Deshalb wurden ausschließlich Verbindungen gewählt, deren  $K_i$ -Wert von Kotthaus bestimmt und größtenteils veröffentlicht wurden.<sup>[119,128,130]</sup> Für die 19 gewählten Verbindungen wurden die experimentell bestimmten  $K_i$ -Werte in  $pK_i$ -Werte umgerechnet. Es ergibt sich ein Bereich zwischen 2,55 und 5,70 (s. Tab. 2.1). Eine Übersicht der Strukturen befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Anhang, Tab. I).

**Tabelle 2.1:** Übersicht der Verbindungen für den Trainingsdatensatz

Bezeichnung	$K_i$ [ $\mu$ M]	$pK_i$	Bezeichnung	$K_i$ [ $\mu$ M]	$pK_i$
3-MeBuMEG	$2763 \pm 714$	2,56	L257	$13 \pm 2$	4,89
AbMEG (27)	$18 \pm 6$	4,74	Methyl-NIO	$145 \pm 15$	3,84
Allyl-Arg	$58 \pm 9$	4,24	NIO	$1155 \pm 112$	2,94
Butenyl-Arg	$57 \pm 9$	4,24	Nitro-Arg	$1968 \pm 260$	2,71
Canavanin	$495 \pm 17$	3,31	PenMEG	$2815 \pm 946$	2,55
Carb-Arg	$764 \pm 107$	3,12	Propargyl-Arg	$17 \pm 5$	4,77
CbMEG	$489 \pm 16$	3,31	Propyl-Arg	$90 \pm 5$	4,04
decVNIO	$768 \pm 4$	3,11	Tfe-Arg	$606 \pm 66$	3,22
ENIPO	$36 \pm 3$	4,44	Vinyl-NIO	$2 \pm 1$	5,7
Ethyl-NIO	$32 \pm 6$	4,49			

### 2.3.2 Docking in Moloc

Mit dieser Software sollte das Alignment der 19 Liganden durchgeführt werden. Dafür wurde die bearbeitete Kristallstruktur mit dem Originalliganden L-Citrullin in der Software aufgerufen. Zuerst wurde die Protonierung der Aminosäuren im katalytischen Zentrum festgelegt, anschließend eine Energieminimierung vorgenommen. Dabei wurde die Proteinstruktur fixiert und als unbeweglich eingestellt. Der Ligand wurde entsprechend des auf ihn einwirkenden Kraftfelds ausgerichtet, um ein Energieminimum zu erreichen. Im Energieminimum liegt der Ligand in einer energiearmen und dadurch bevorzugten Konformation vor. Alle 19 Verbindungen aus Tab. 2.1 wurden auf Basis dieser energieoptimierten Ligandenkonformation in der Bindetasche als 3D-Struktur erstellt, minimiert, überprüft und dieser Vorgang z. T. mehrfach wiederholt. Die dadurch erhaltenen Liganden-Konformationen wurden „aligned“ und für jede einzelne Verbindung ein *mol2-File* erstellt. Für die weiteren Berechnungsschritte mit AFMoC wurden alle *mol2-Files* zu einem *Multi-mol2-File* zusammengefügt, an dessen vorderster Stelle der größte, gittermaßgebende Ligand positioniert wurde. Somit muss von AFMoC nur eine Datei mit bekannter Liganden-Reihenfolge zur Berechnung herangezogen werden.

### 2.3.3 Berechnungen mit DrugScore – AFMoC

#### 2.3.3.1 Trainingsdatensatz

Ein in die Bindetasche gelegtes Berechnungsgitter wurde an den größten Liganden, dem Carb-Arg, plus 4 Å in jede Richtung angepasst. Die Maschenweite des Gitters wurde auf 1 Å gesetzt. Die Atomtyp-Sonden an den Gitterknotenpunkten wurden nach der SYBYL-Nomenklatur gewählt. Die hier verwendeten sind in Tab. 2.2 aufgelistet.

**Tabelle 2.2:** Verwendete Atomtypen nach SYBYL-Nomenklatur

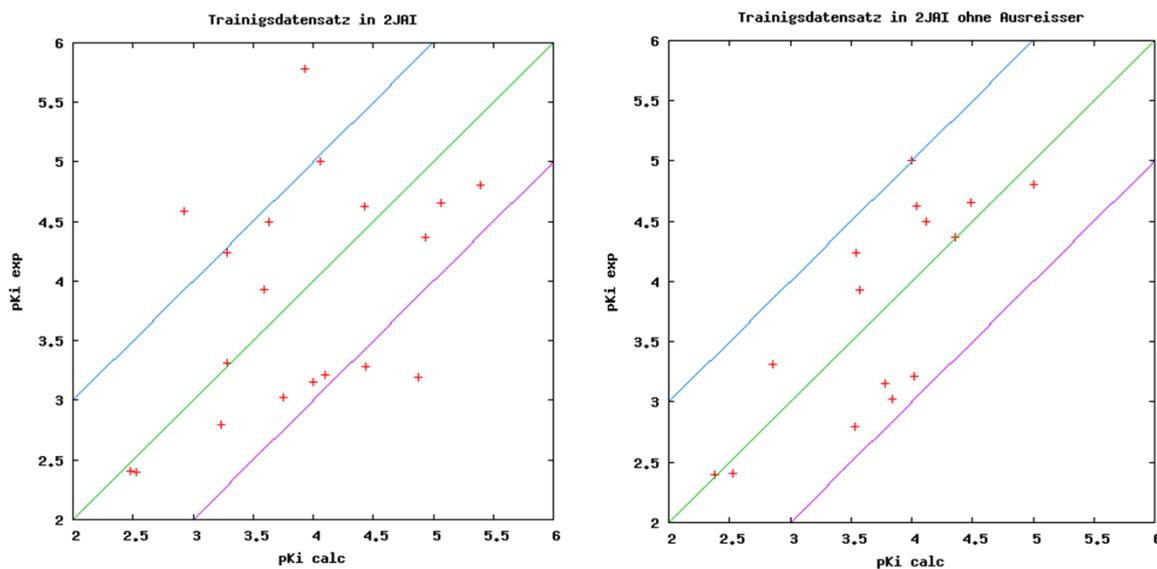
Code	Definition
C.3	sp <sup>3</sup> -Kohlenstoff
C.2	sp <sup>2</sup> -Kohlenstoff
O.2	sp <sup>2</sup> -Sauerstoff
O.co2	Carboxylat-Sauerstoff
N.3	sp <sup>3</sup> -Stickstoff
N.pl3	trigonal planarer Stickstoff

Mittels DrugScore wurde pro Atomtyp für jeden Gitterpunkt ein Paar-Potential bestimmt und durch AFMoC-Analyse mit der Information der gedockten Liganden des Trainingsdatensatzes (wie in Abb. 2.1 dargestellt) multipliziert. Die daraus resultierenden Interaktionsfelder wurden mit den experimentell ermittelten Daten über eine PLS-Analyse korreliert und die Vorhersagekraft des Modells durch eine LOO-Kreuzvalidierung überprüft.

**Tabelle 2.3:** Trainingsdatensatz; experimenteller  $pK_i$ -Wert ( $pK_i$  exp);  $pK_i$ -Wert berechnet durch LOO-Kreuzvalidierung ( $pK_i$  calc LOO)

Bezeichnung	$pK_i$ exp	$pK_i$ calc LOO	Bezeichnung	$pK_i$ exp	$pK_i$ calc LOO
3-MeBuMEG	2,56	2,42	L257	4,89	5,50
AbMEG (27)	4,74	3,05	Methyl-NIO	3,84	3,64
Allyl-Arg	4,24	5,06	NIO	2,94	3,83
Butenyl-Arg	4,24	3,75	Nitro-Arg	2,71	3,13
Canavanin	3,31	3,48	PenMEG	2,55	2,82
Carb-Arg	3,12	4,77	Propargyl-Arg	4,77	3,94
CbMEG	3,31	3,77	Propyl-Arg	4,04	3,13
decVNIO	3,11	5,18	Tfe-Arg	3,22	4,24
ENIPO	4,44	5,14	Vinyl-NIO	5,7	3,59
Ethyl-NIO	4,49	4,22			

Beim Vergleich der experimentellen Werte mit denen der LOO-Analyse fällt auf, dass einige der Verbindungen dabei sehr schlecht vorhergesagt werden. Dies trifft auf die Substanzen AbMEG, Carb-Arg, decVNIO und Vinyl-NIO zu. Toleriert wurden Abweichungen von maximal einer Log-Stufe.<sup>[135]</sup> Um überhaupt ein Modell erstellen zu können, wurden diese Verbindungen als Ausreißer entfernt. In Abb 2.4 sind zum Vergleich Plots der beiden LOO-Analysen dargestellt.



**Abbildung 2.4:** Plots der LOO-Analysen; links: kompletter Datensatz,  $q^2 = 0,01963$ ; rechts: ohne die vier Ausreißer,  $q^2 = 0,5898$ ; Die Mittellinie (grün) bedeutet, dass  $pK_i \text{ exp} = pK_i \text{ calc}$ . Die äußeren Linien beschreiben die Abweichung von einer log-Stufe.

Der  $q^2$ -Wert von 0,59 besagt, dass dieses Modell eine gute Vorhersagekraft haben sollte. Allerdings beschreibt die Literatur, dass PLS-Ergebnisse von kleinen Datensätzen stark verwandter Liganden und einer Affinitätsspannweite von nicht mehr als drei Zehner-Potenzen mit großen Vorhersagefehlern behaftet sind. Hierbei würden die reinen DrugScore Paarpotentiale verlässlichere Ergebnisse liefern. In diesem Fall kann ein „Mix Koeffizient“ genutzt werden, der die DrugScore und AFMoC-Werte unterschiedlich gewichtet.<sup>[135]</sup>

Die ersten Berechnungen mit dem Modell wurden anhand des Trainingsdatensatzes in einer Art Selbsttest getätigt. Dazu wurde für die Gewichtung einmal AFMoC = 1 und einmal DrugScore = 1 gesetzt. Für die Mix-Berechnungen wurden AFMoC und DrugScore in 0,1er-Verhältnisschritten gesetzt und die Daten miteinander verglichen (Daten nicht gezeigt). Das beste Ergebnis in Bezug auf die Korrelation der berechneten Werte zu „ $pK_i \text{ exp}$ “ und „ $pK_i \text{ calc LOO}$ “ ergab sich bei einem AFMoC-DrugScore-Verhältnis von 0,7 zu 0,3 mit einem Korrelationskoeffizienten  $r = 0,913$ . Dieses Modell wurde für die weiteren Berechnungen des Testdatensatzes herangezogen. Die verwendeten Daten können in Tab. 2.4 nachgelesen werden.

**Tabelle 2.4:** Übersicht der berechneten Daten des Trainingsdatensatzes im Vergleich zu den experimentell ermittelten. AFMoC, A; DrugScore, D.

Bezeichnung	pK <sub>i</sub> exp	pK <sub>i</sub> calc LOO	pK <sub>i</sub> calc AFMoC	pK <sub>i</sub> calc DrugScore	pK <sub>i</sub> calc A:D (0,7:0,3)
3-MeBuMEG	2,56	2,53	2,43	3,42	2,73
Allyl-Arg	4,24	4,36	4,18	4,56	4,29
Butenyl-Arg	4,24	4,12	4,00	4,38	4,11
Canavanin	3,31	2,86	3,10	2,70	2,98
CbMEG	3,31	3,78	3,55	3,93	3,66
ENIPO	4,44	4,49	4,45	4,69	4,52
Ethyl-NIO	4,49	4,04	3,92	4,48	4,09
L257	4,89	5,00	5,06	4,60	4,92
Methyl-NIO	3,84	3,58	3,42	4,18	3,65
NIO	2,94	3,84	3,21	3,66	3,35
Nitro-Arg	2,71	3,54	2,75	3,81	3,07
PenMEG	2,55	2,38	2,34	3,36	2,64
Propargyl-Arg	4,77	4,00	4,43	3,43	4,13
Propyl-Arg	4,04	3,54	3,51	4,48	3,80
Tfe-Arg	3,22	4,02	2,39	3,26	2,65

### 2.3.3.2 Testdatensatz

Der Testdatensatz beinhaltet Verbindungen, die potentielle Inhibitoren darstellen und deren Hemmpotenz (pK<sub>i</sub>) mit dem zuvor erstellten Prognose-Modell berechnet werden soll. Zur Erstellung wurden insgesamt 60 Verbindungen als 3D-Strukturen in Moloc aufgebaut und aligned. Ein Teil dieser Verbindungen (Rossiter-(R)-Reihe) wurde bereits von Rossiter *et al.* veröffentlicht und soll anhand von IC<sub>50</sub>-Werten einer weiteren Überprüfung des Modells dienen.<sup>[116]</sup> Da keine K<sub>i</sub>-Werte vorhanden sind, konnten sie leider nicht in den Trainingsdatensatz eingefügt werden, um die Aussagekraft des Modells zu erhöhen. Strukturformeln sind im Anhand dieser Arbeit zu finden (Anhang, Tab. II).

Die anderen Verbindungen (theoretische Verbindungen (TV)-Reihe) wurden durch rationale Betrachtungen auf chemisch-synthetischer Ebene erstellt. Berücksichtigt wurden dabei potentielle Eigenschaften in Bezug auf Selektivität und Hemmpotenz anhand bekannter Inhibitoren, kommerziell erhältliche Edukte, sowie gemeinsame Syntheserouten. Zu dieser Reihe gehören auch die vorgeschlagenen Modifikationen von AbMEG (TV21, TV23, TV25) bzw. L-257 (TV20, TV22, TV24). Alle Verbindungen sind mit ihren kalkulierten pK<sub>i</sub>-Werten

in Tab. 2.5 zusammengefasst. Zugehörige Strukturformeln befinden sich im Anhang der Arbeit (Anhang, Tab. III).

**Tabelle 2.5:** Testdatensatz mit den vorausgesagten  $pK_i$ -Werten (AFMoC-DrugScore 0,7:0,3)

Bezeichnung	$pK_i$ calc	Bezeichnung	$pK_i$ calc	Bezeichnung	$pK_i$ calc
TV01	4,04	TV21	3,19	R14	4,11
TV02	4,47	TV22	4,76	R15	4,27
TV03	4,46	TV23	3,56	R17	4,57
TV04	4,31	TV24	5,00	R19	3,93
TV05	4,24	TV25	3,72	R22	3,88
TV06	4,32	TV26	3,86	R23	4,16
TV07	4,39	TV27	4,84	R24	4,00
TV08	3,66	TV28	4,63	R25	3,59
TV09	3,99	TV29	4,58	R26	3,57
TV10	4,11	TV30	4,12	R27	4,17
TV11	4,75	TV31	4,34	R28	4,07
TV12	4,14	TV32	4,49	R29	3,76
TV13	4,54	TV33	4,56	R30	4,07
TV14	4,20	R04	3,39	R31	3,65
TV15	4,16	R08	2,98	R32	3,04
TV16	3,97	R09	3,73	R33	2,47
TV17	4,20	R10	3,75	R35	3,10
TV18	4,26	R11	3,97	R37	4,03
TV19	4,02	R12	3,74	R38	3,96
TV20	3,88	R13	4,18	R42	3,65

### 2.3.4 Auswertung und Diskussion

Der Hintergrund für die Berechnung der R-Reihe ist eine Verifikation des entwickelten Prognose-Modells anhand bekannter  $IC_{50}$ -Werte. Jedoch ist die Berechnung eines einfachen linearen Zusammenhangs zwischen den berechneten  $pK_i$ - und den experimentellen  $IC_{50}$ -Werten aus der Publikation von Rossiter *et al.* an dieser Stelle unzulänglich. Für einen adäquaten Datenvergleich muss dabei auf strukturelle Übereinstimmungen bzw. Unterschiede geachtet werden. Deutlich wird dies bereits bei der kritischen Betrachtung des Trainingsdatensatzes. Von ursprünglich 19 Verbindungen wurden vier in Voruntersuchungen als Ausreißer klassifiziert und das Modell aus den verbliebenen 15 Verbindungen erstellt. Je häufiger ein Strukturmerkmal in einem Datensatz vorkommt, desto stärker wird dieses gewichtet. Existiert ein Strukturmerkmal im Datensatz überhaupt nicht, so kann über dieses auch keine gute Aussage getroffen werden. Beispielsweise kommt die Carboxylgruppe bei 13 der Verbindungen vor, der Methylester kein einziges Mal und ein Fehlen der Carboxylgruppe ist zwei Mal der Fall. Folglich sollte die Beurteilung der Daten nicht im Ganzen erfolgen, sondern einzeln für die jeweiligen Strukturmerkmale:

- Die „ $pK_i$  calc“-Werte für R30-37 (Methylester) korrelieren mittelmäßig mit den  $IC_{50}$ -Werten ( $r = 0,44$ ). Obwohl die  $IC_{50}$ -Werte relativ niedrig sind und nah beieinander liegen (20 – 189  $\mu$ M), streuen die „ $pK_i$  calc“-Werte (2,47 - 4,07) stark und werden teilweise viel zu schlecht vorhergesagt. Ausnahmen bilden dabei die L-257-Analoga R30 und R37, die durch ihren Methoxyethyl-Rest relativ gut vorherbestimmt werden.
- Bei R25-29 ist das  $N^0$ -Atom entweder disubstituiert oder in einen zyklischen Substituenten eingebunden. Derartige Strukturen kommen im Trainingsdatensatz nicht vor, somit ist eine präzise Vorhersage unwahrscheinlich ( $r = 0,35$ ).
- Bei R4-24 ist das  $N^0$ -Atom monosubstituiert. Da auch der Trainingsdatensatz ausschließlich  $N^0$ -monosubstituierte Verbindungen beinhaltet, ist es nicht überraschend, dass hier die beste Korrelation ( $r = 0,54$ ) zwischen „ $pK_i$  calc“- und  $IC_{50}$ -Werten vorliegt.
- Ein zusätzlicher kritischer Aspekt dieser Datenerhebung ist, dass der Trainingsdatensatz nur L-Arginin-Analoga enthält, R4-35 aber Analoga von *nor*-L-Arginin sind. Dennoch werden sie gleich gut bewertet, obwohl dieser Unterschied bei den experimentellen Daten erheblich ist. Deutlich wird dies beim Vergleich von R30 ( $IC_{50}$ : 96  $\mu$ M, „ $pK_i$ -calc“: 4,07) mit R37 ( $IC_{50}$ : 20  $\mu$ M, „ $pK_i$ -calc“: 4,03), welche sich

nur in der Kettenlänge des Grundkörpers unterscheiden. Eine ausreichende Differenzierung scheint nicht gegeben. Wie wichtig diese Kettenlänge für die Hemmpotenz ist, beweist auch R42, welches um eine Methylengruppe kürzer ist als AbMEG, die DDAH aber kaum hemmt (Hemmung bei 1 mM: 39%).<sup>[116]</sup>

Da eine sinnvolle Beurteilung des Modells kompliziert ist und eine Korrelation zwischen biologischer Aktivität und Vorhersage für die Gesamtheit der Verbindungen nicht möglich ist, sollten die errechneten Werte kritisch betrachtet werden. Vergleichbare Ergebnisse können aber bei homologen Substanzreihen erwartet werden.

In Kapitel 2.2 wurde bereits erörtert, ob Guanidin- und Amidin-Gruppen unterschiedliche Einflüsse auf das aktive Zentrum der DDAH ausüben, indem durch PyMOL gefundene polare Wechselwirkungen verglichen wurden. Analog zu dieser Analyse wird auch im Prognose-Modell nicht zwischen Guanidin- und Amidin-Funktion differenziert. Die am besten vorhergesagte Verbindung ist das TV24, dem Amidin-Analogon des L-257, mit einem „pK<sub>i</sub>-calc“ von 5,0. Hierbei handelt es sich um eine Verbindung, die auch durch die rationalen Ansätze zur Verbesserung von AbMEG bzw. L-257 angedacht wurde. Die nächstbeste Verbindung TV22 gehört ebenfalls in diese Reihe und enthält einen Methylengruppenverkürzten Methoxyalkyl-Rest. Es scheint als wäre ein Austausch der Guanidin-Funktion gegen eine Amidin-Funktion hinsichtlich der Hemmpotenz unbedenklich, bzw. laut der errechneten Daten sogar von Vorteil. Für einen möglichen Einsatz als Arzneistoff kann dieser Austausch sogar von Nutzen sein, da Guanidine einen stärker basischen Charakter aufweisen als Amidine.<sup>[140]</sup> Darüber hinaus sind für Amidine im Arbeitskreis sehr gut erprobte Prodrug-Prinzipien entwickelt worden, während diese für Guanidine noch nicht so ausgeprägt vorliegen.<sup>[141]</sup>

Aus dem Ergebnis der Berechnung des Prognose-Modells lässt sich schlussfolgern, dass die Synthese der homologen Reihe TV20, TV22 und TV24 sowie deren decarboxylierten Varianten TV21, TV23 und TV25 ein sinnvoller Ansatz ist und zu verbesserten Inhibitoren führen kann. Eine abschließende Beurteilung wird nach erfolgreicher Synthese und Testung anhand der experimentell bestimmten Daten in Kapitel 3.2 erfolgen.

**Tabelle 2.6:** Verbindungen der R-Reihe von Rossiter *et al.* mit vorausgesagten pK<sub>i</sub>- und getesteten IC<sub>50</sub>-Werten<sup>[116]</sup>

Bezeichnung	pK <sub>i</sub> calc	IC <sub>50</sub> , μM	Bezeichnung	pK <sub>i</sub> calc	IC <sub>50</sub> , μM
R04	3,39	1510	R25	3,59	325
R08	2,98	-	R26	3,57	922
R09	3,73	300	R27	4,17	264
R10	3,75	-	R28	4,07	686
R11	3,97	-	R29	3,76	500
R12	3,74	-	R30	4,07	96
R13	4,18	-	R31	3,65	159
R14	4,11	1470	R32	3,04	111
R15	4,27	189	R33	2,47	113
R17	4,57	301	R35	3,10	189
R19	3,93	-	R37	4,03	20
R22	3,88	998	R38	3,96	-
R23	4,16	-	R42	3,65	-
R24	4,00	1020			

## 2.4 Molecular Modeling mit der Schrödinger Software

### 2.4.1 Einleitung

Mit Ausnahme von L-257 wurden die in dieser Arbeit zugrunde liegenden Leitstrukturen (AbMEG, Vinyl-NIO und decVNIO) aufgrund schlechter Vorhersagbarkeit als Ausreißer aus dem obigen Prognose-Model entfernt (s. Kap. 2.3.3). Doch sind gerade diese Verbindungen aufgrund ihrer Hemmpotenz an der DDAH interessant und sollen in Kooperation mit Prof. Peifer mit *Molecular Modeling* näher untersucht werden. L-257 und seine decarboxylierte Variante AbMEG sind gute DDAH-Inhibitoren ( $K_i = 13 \mu\text{M}$  bzw.  $18 \mu\text{M}$ ), wohingegen die Decarboxylierung von Vinyl-NIO zu decVNIO zu einem massiven Hemmverlust führt ( $K_i = 2 \mu\text{M}$  bzw.  $768 \mu\text{M}$ ).<sup>[119,130]</sup> Mit Hilfe des Programms „Glide“ aus der Schrödinger Software Suite, einem Software-Paket, das unterschiedliche Modeling-/Docking-Anwendungen beinhaltet, soll dieses Phänomen näher untersucht werden.<sup>[142,143]</sup>

Die Fragestellung lautet: Warum kann bei L-257 die Carboxylgruppe entfernt werden ( $\cong$  biologisch aktiv), nicht aber bei Vinyl-NIO ( $\cong$  biologisch inaktiv)? Welchen Einfluss haben der 2-Methoxyethyl-Rest des L-257 bzw. die Wechselwirkungen der Guanidin/Amidin-Funktion? Ist der Einfluss des 2-Methoxyethyl-Restes oder die unterschiedliche Basizität von Guanidin ( $\text{pK}_a = 13,6$ ) vs. Amidin ( $\text{pK}_a = 12,4$ ) bzw. deren unterschiedliche Anzahl an Wechselwirkungen wichtiger?<sup>[140]</sup>

Zur Beantwortung dieser Fragen sollen die Kristallstrukturen 2JAJ (mit L-257)<sup>[129]</sup> und 3I4A (mit Methyl-NIO)<sup>[121]</sup> dienen, in die L-257, AbMEG, Vinyl-NIO und decVNIO hineingedockt werden. Über die Berechnung von Docking-Scores können Aussagen zur Stärke der Wechselwirkungen und somit der potentiellen Hemmpotenz getroffen werden. Da die experimentellen Daten vorliegen, können die Scores damit verglichen und so die Aussagekraft dieser beurteilt werden.

### 2.4.2 Docking-Analyse

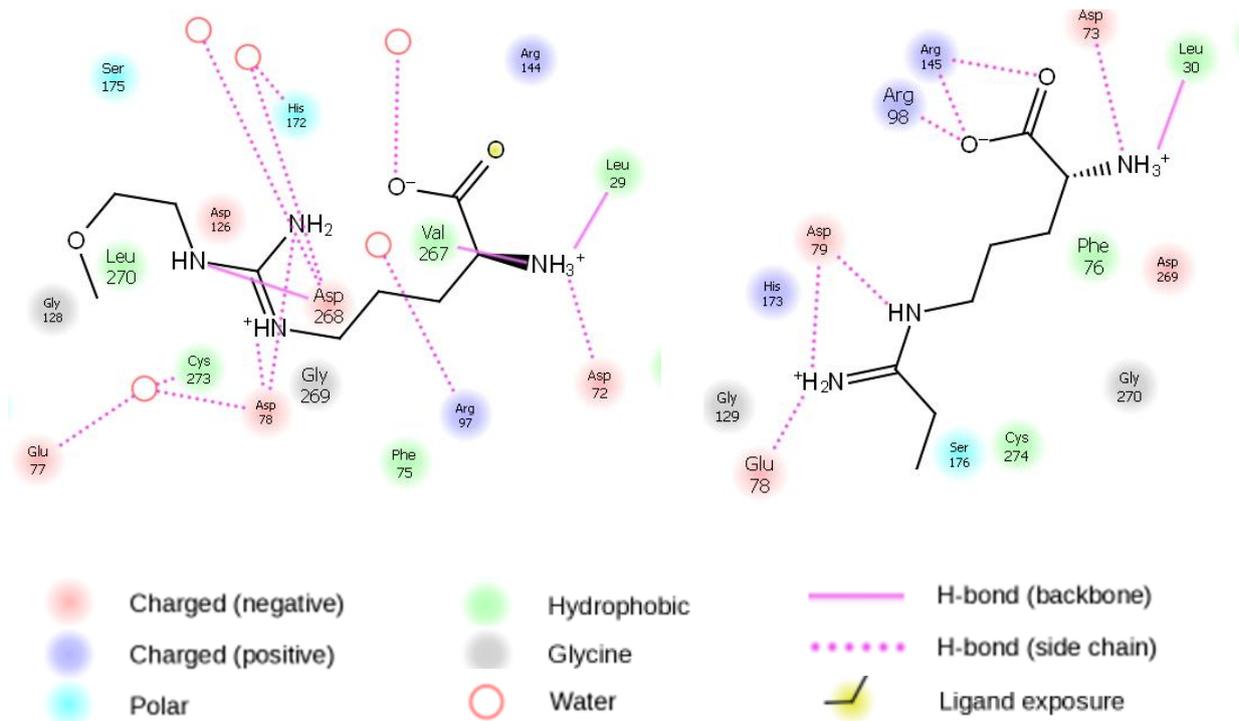
#### 2.4.2.1 Vergleich der polaren Kontakte von 2JAJ und 3I4A

Die Nummerierung der Aminosäuren wurde für alle Kristallstrukturen an die von Wang *et al.*<sup>[121]</sup> angepasst, um einfachere Vergleichsmöglichkeiten zu schaffen.

Bei 2JAJ sind starke Wechselwirkungen der Guanidin-Funktion über Wasserstoffbrückenbindungen (WBB) mit den Seitenketten Asp269, Asp79 und His173 vorhanden. Diese WBB sind unter anderem über Wassermoleküle im aktiven Zentrum verbrückt. Bei 3I4A findet man ebenfalls eine starke Wechselwirkung der Amidin-Funktion mit Asp79 und Glu78, allerdings über weniger WBB (s. Abb. 2.5). Glide unterscheidet zwischen ionischen WBB und nichtionischen WBB. In Abb. 2.5 wird dieser Unterschied durch die Ladung (*charged*) bzw. „nicht“-Ladung (*polar*) der Aminosäuren kenntlich gemacht. Bei Guanidinen, die über eine größere Anzahl mesomerer Grenzformen als Amidine verfügen, können mehr der energiereichen ionischen Wechselwirkungen auftreten.

Die Substratspezifität und Hemmwirkung für S-Enantiomere zeigt, dass die Carboxylgruppe eine wichtige Rolle bei der Ausrichtung und Fixierung der  $\alpha$ -Aminogruppe spielt, welche WBB zu Asp73 und Leu30 ausbildet. Die Carboxylgruppe selbst ist bei den unterschiedlichen Kristallstrukturen mit Arg145 (2JAJ) über Wassermoleküle verbrückt, oder direkt mit Arg145 und Arg98 (3I4A). Diese Verbrückung von L-257 mit Arg145 über Wassermoleküle widerspricht der Aussage, dass Arg145 keine Wechselwirkung mit dem Inhibitor eingehen würde. Für die vorher dargestellte Modellerstellung (s. Kap. 2.3) wurden jedoch alle Wassermoleküle entfernt, sodass eine solche Wechselwirkung nicht sichtbar war.

Am Ausgang der Bindetasche ist in den Kristallstrukturen ein Wassercluster lokalisiert, der über die Carboxylgruppe geordnet wird. Fehlt die Carboxylgruppe, ist die hydrophobe Alkylkette des Grundgerüsts der Inhibitoren zum Solvens exponiert, sodass ungünstige Solvatisierungseffekte resultieren würden. Stattdessen solvatisiert das Wasser die Ligand-Protein bindungsvermittelnde Aminogruppe und kann das Molekül kompetitiv aus der Bindetasche drängen. Durch die stärkeren WBB der Guanidin-Struktur des L-257 sollte diese einen möglichen Verlust der Carboxylgruppe besser kompensieren können als die Amidin-Struktur beim Vinyl-NIO. Folglich dürfte es zu einem wesentlich geringeren Abfall in der Hemmpotenz kommen. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die schlechte Hemmwirkung des decVNIO im Vergleich zu AbMEG.



**Abbildung 2.5:** Ligand-Protein-Interaktionen aufgezeigt durch die Software Glide. Links: 2AJ mit L-257;<sup>[129]</sup> rechts: 3I4A mit Methyl-NIO;<sup>[121]</sup> unten: Legende.

#### 2.4.2.2 Berechnung von Docking-Scores

Durch errechnete Docking-Scores lässt sich die obige Aussage leider nicht unterstreichen. Das Redocking der Strukturen in die Bindetasche war zwar erfolgreich, es wurde jedoch keine Korrelation der Docking-Scores mit den biologischen Aktivitäten der Verbindungen beim Validieren des Modells festgestellt. Eine Schwierigkeit hierbei ist u. a., dass Interaktionen zwischen Wasser und den Hemmstoffmolekülen nicht parametrisiert sind, diese aber einen großen Einfluss ausüben. Ein weiteres Indiz für die mangelnde Aussagekraft der Scores in diesem Modell ist, dass beim Vergleich von Vinyl-NIO und decVNIO je nach Hydratisierungszustand des starren Proteins der Score für die letztgenannte Verbindung besser sein kann, obwohl diese wesentlich schlechter hemmt (s. Tab. 2.7).

Auch das Docking von R-Enantiomeren bestätigt, dass die berechneten Scores kritisch betrachtet werden müssen. Das von Rossiter *et al.* synthetisierte und an der hDDAH-1 getestete R-Enantiomer des L-257 weist im Experiment keine Hemmpotenz auf (Hemmung bei 100  $\mu\text{M}$ : 2%),<sup>[116]</sup> dennoch wurde es mit einem günstigen, negativen Score kalkuliert. Vereinfachend kann gesagt werden: Je negativer der Score, desto mehr Energie wird frei und desto potenter ist die Verbindung. In Tab. 2.7 sind die berechneten Scores zusammengefasst. Standard Precision (SP) und Extra Precision (XP) sind Funktionen von Glide, die sich durch

unterschiedliche Gewichtung bestimmter Parameter auszeichnen. SP-Berechnungen werden in der Regel bei großen Datenbanken durchgeführt und XP-Berechnungen bei einer kleineren Anzahl von Verbindungen zur Leitstrukturoptimierung.<sup>[143,144]</sup>

**Tabelle 2.7:** Mit Glide berechnete Docking-Scores. SP, Standard Precision; XP, Extra Precision; n.b., nicht berechnet.

Verbindung	Berechnung mit Wasser		Berechnung ohne Wasser
	SP-Werte	XP-Werte	XP-Werte
Vinyl-NIO	-6,55	-7,21	-8,22
decVNIO	-6,88	-8,53	-7,40
L-257 (S-Enantiomer)	-5,10	-9,66	n.b.
L-257 (R-Enantiomer)	-5,87	-8,14	n.b.
AbMEG (27)	-4,10	-8,82	n.b.

### 2.4.3 Abschließende Beurteilung

Abschließend lässt sich sagen, dass über den Vergleich der WBB der Kristallstrukturen 2JAJ und 3I4A ein wichtiger Einfluss der Carboxylgruppe plausibel erscheint. Durch die stärker ausgeprägten Wechselwirkungen, besonders der ionischen, kann die Guanidin-Gruppe einen Verlust vermutlich besser kompensieren als die Amidin-Gruppe.

Das Docking mit Glide konnte an dieser Stelle nicht validiert werden. Die errechneten Scores können die erste Aussage nicht bekräftigen. Um besser mit biologischen Aktivitäten korrelierende Scores zu erreichen, hätte es im vorliegenden Fall mehr Aufwand bedurft, z. B. durch ein *induced-fit-docking*.

## 2.5 Zusammenfassung

Auf Grundlage der bekannten Röntgenkristallstrukturen der hDDAH-1 und einer Reihe bekannter, strukturverwandter Inhibitoren wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit Prof. Gohlke ein Prognose-Modell zur Vorhersage der biologischen Aktivität neuer Verbindungen erstellt. Hierzu wurde die 3D-QSAR-Methode AFMoC verwendet, die die biologische Aktivität in Korrelation mit der Struktur der jeweiligen Verbindung setzt. Der  $q^2$ -Wert des entwickelten Modells von 0,59 steht für eine gute Vorhersagekraft. Aufgrund der kleinen Datenmenge von 15 bekannten Inhibitoren wurde ein Mix-Koeffizient aus AFMoC und DrugScore (0,7:0,3;  $r = 0,913$ ) errechnet und mit diesem weiter verfahren.

Bei der Erstellung des Testdatensatzes wurde eine Reihe bekannter Strukturen (R-Reihe), die ohne bekannten  $K_i$ -Wert nicht in den Trainingsdatensatz genommen werden konnten, und eine Reihe neuer Verbindungen (TV-Reihe), die noch nicht synthetisiert und/oder an der DDAH getestet wurden, als 3D-Struktur erstellt. Für diese Verbindungen wurden mit dem Modell  $pK_i$ -Werte berechnet. Als beste Verbindung wurde TV 24 vorhergesagt, das Amidin-Analogon des potenten, bekannten Inhibitors L-257 ( $K_i = 13 \pm 2 \mu\text{M}^{[130]}$ ). TV 24 und Homologe sowie die jeweiligen decarboxylierten Verbindungen (TV 20-25) sollen im Folgenden synthetisiert werden.

Unter Zuhilfenahme der Schrödinger Software Glide in Kooperation mit Prof. Peifer wurden die Bindemodi substratanaloger, Guanidin- und Amidin-basierter Inhibitoren im Komplex mit der hDDAH-1 näher betrachtet. Die für die Analyse herangezogenen Kristallstrukturen waren 2JAJ und 3I4A und deren gebundene Liganden. Anhand der berechneten WBB lässt sich postulieren, dass bei Guanidin-basierten Hemmstoffen die Carboxylgruppe als verzichtbar einzustufen ist, ohne dass die biologische Aktivität stark abnimmt. Bei Amidin-basierten Hemmstoffen trifft dies nicht zu. Die errechneten Docking-Scores konnten nicht validiert werden und wurden deshalb nicht näher analysiert.

## 3 Hemmung der hDDAH-1

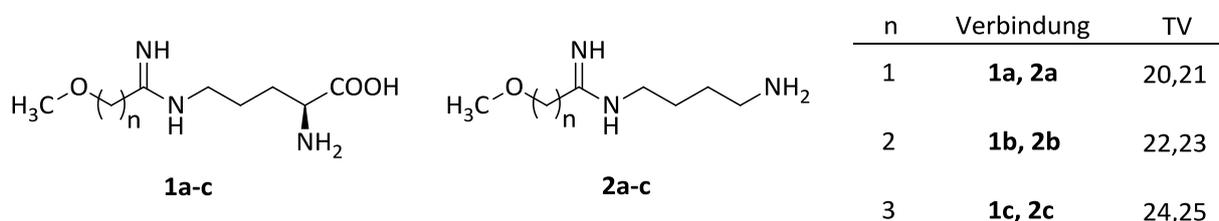
### 3.1 Einleitung

Im folgenden Kapitel werden die in dieser Arbeit verfolgten Ansätze zur Entwicklung neuer DDAH-Inhibitoren beschrieben. Wie bereits in der Zielsetzung erläutert, sollen die literaturbekannten bzw. im Arbeitskreis entwickelten Verbindungen L-257/AbMEG und Vinyl-NIO/decVNIO als Leitstrukturen fungieren. Die angewendeten Synthese-Routen zur Darstellung neuer Inhibitor-Kandidaten sowie deren *in vitro*-Testdaten werden in den folgenden Abschnitten aufgeführt. Weiterhin wird auf Prodrug-Strategien für den aussichtsvollsten Kandidaten eingegangen.

### 3.2 Methoxyalkylamidine

#### 3.2.1 Einleitung

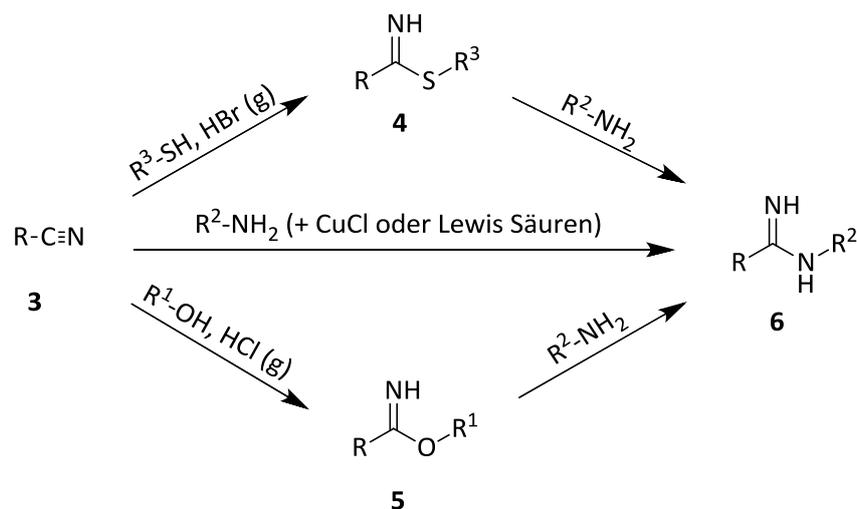
Zur Weiterentwicklung des derzeit besten DDAH-Inhibitors AbMEG sollte der Methoxyalkyl-Rest auf Amidine übertragen werden (s. Kap. 1.5.1). Dieser rationale Ansatz wurde durch das in Kapitel 2.3 beschriebene, strukturbasierte Prognose-Modell bestätigt. Die Kette des Methoxyalkyl-Restes sollte dabei eine Länge von ein bis drei C-Atomen umfassen. Als Grundkörper wurden L-Ornithin bzw. 1,4-Diaminobutan gewählt, um die richtige Distanz zwischen der Amidin-Funktion und der  $\alpha$ -Aminosäure- bzw. Aminogruppe zu gewährleisten. Der genaue Abstand von vier C-Atomen ist essentiell für eine gute Hemmwirkung (s. Kap. 2.3.4).



**Abbildung 3.1:** Übersicht der zu synthetisierenden Zielverbindungen: *N*-(Methoxyalkyl-1-imino)-L-ornithin-Derivate (**1a-c**, NIOs) und *N*-(Methoxyalkyl-1-imino)-1,4-diaminobutan-Derivate (**2a-c**, NIOdec). TV-Nomenklatur aus Kapitel 2.

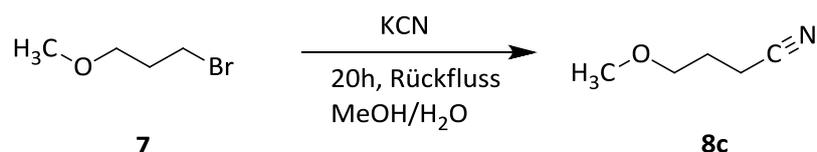
### 3.2.2 Synthesestrategien

In der Literatur ist eine Vielzahl an Verfahren zur Synthese substituierter Amidine beschrieben. Möglich ist z. B. eine direkte Reaktion von Aminen mit Nitrilen, die jedoch nur abläuft, wenn das Nitril elektronenziehende Gruppen trägt.<sup>[145]</sup> Bei weniger reaktiven Nitrilen müssen Katalysatoren, wie z. B. Lewis Säuren,<sup>[146]</sup> oder Cu(I)Cl<sup>[147]</sup> zugesetzt werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Nitrile in Gegenwart von Alkoholen durch Einleiten von Chlorwasserstoff in reaktivere Alkylimidoester (Imidate) zu überführen, welche dann mit den Aminen unter Abspaltung des Alkohols reagieren können. Diese Methode wurde erstmals 1892 von Adolf Pinner beschrieben und wird immer noch häufig zur Darstellung von Amidinen angewandt.<sup>[148,149]</sup> Als eine Modifikation der Pinner-Synthese können anstelle der Imidate auch Thioimidate verwendet werden, denn Thioalkohole stellen bessere Nucleophile und Abgangsgruppen dar.<sup>[150]</sup> Thioimidate können sowohl durch die Reaktion von Thioamiden mit seitenkettenhalogenierten, aromatischen Verbindungen<sup>[151]</sup> als auch durch die Umsetzung von Nitrilen mit Thioalkoholen (z. B. Thiophenol<sup>[152]</sup>) erhalten werden. Der Einsatz von Trihaloethylimidaten als weitere Variante der Pinner-Reaktion führt ebenfalls zu reaktionsfreudigeren Agenzien.<sup>[153]</sup> Neben Nitrilen sind auch aktivierte Amide als Ausgangsverbindungen zur Synthese von Amidinen beschrieben.<sup>[154]</sup> Mögliche Syntheserouten über Nitrile sind in einer schematische Darstellung in Abb. 3.2 gezeigt. Eine weiterführende Übersicht zur Synthese von Amidinen kann einem Review von Dunn [2005] entnommen werden.<sup>[155]</sup>



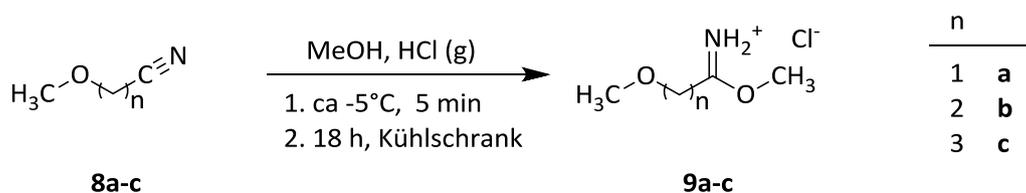
**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung möglicher Synthesewege ausgehend von Nitrilen 3 zur Herstellung substituierter Amidine 6<sup>[145–148,152,155]</sup>

Für die Darstellung der Zielverbindungen **1a-c** sowie **2a-c** wurde die Pinner-Reaktion gewählt, weil die dafür benötigten Imidate einfach zugänglich sind und diese Methode für strukturell ähnliche Verbindungen, wie z. B. für Vinyl-NIO, in der Literatur bereits erfolgreich angewendet wurde.<sup>[120,156]</sup> Da das 4-Methoxybutyronitril (**8**) nicht kommerziell erhältlich war, wurde dieses zunächst nach einer Vorschrift von Zhi *et al.* aus 3-Methoxypropionbromid (**7**) und Kaliumcyanid hergestellt und durch anschließende Destillation gewonnen (s. Abb. 3.3).<sup>[157]</sup>



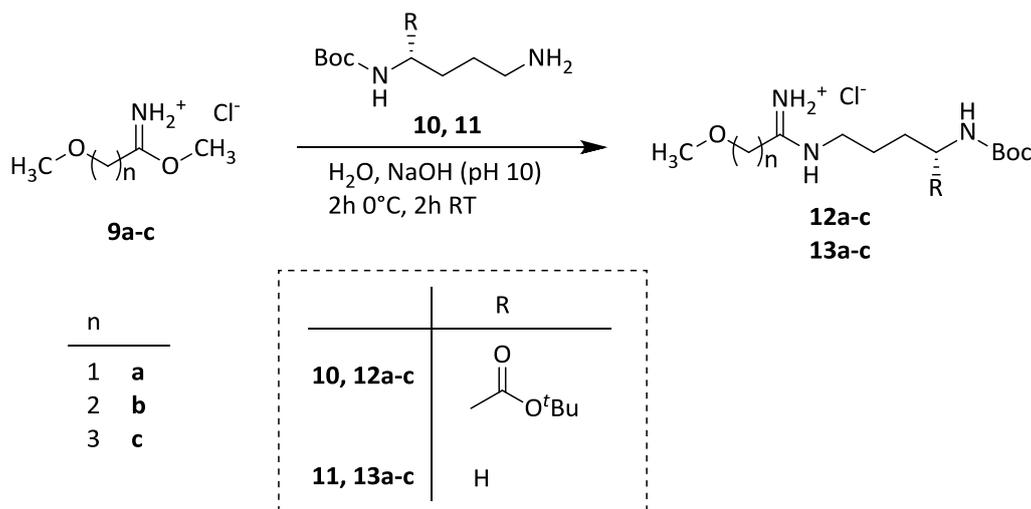
**Abbildung 3.3:** Gewinnung des 4-Methoxybutyronitrils (**8c**) nach Zhi *et al.*<sup>[157]</sup>

Die Synthese der Imidate erfolgte in Anlehnung an Vorschriften von Bretscher *et al.* [2003] und Schade [2008], bei der Methanol als Alkoholkomponente gewählt wurde.<sup>[128,156]</sup> Die Nitrile **8a-c** wurden unter HCl-Begasung mit Methanol zu den Imidaten (**9a-c**) verestert (s. Abb. 3.4) und das Produkt nach 18 Stunden im Kühlschrank mit Ether ausgefällt. Da es sich um hygroskopische, temperaturempfindliche Stoffe handelt, wurden diese unter Schutzgas-Atmosphäre und kühl gelagert. Auffällig war die stark zunehmende Hygroskopizität mit steigender Kettenlänge des Substituenten.



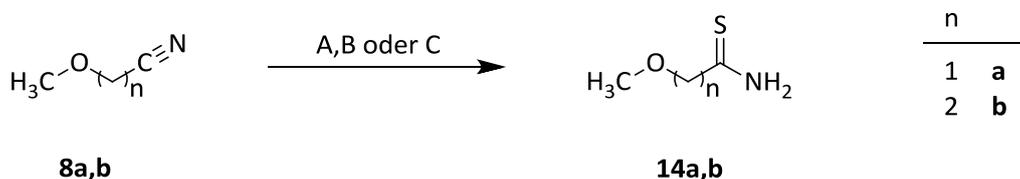
**Abbildung 3.4:** Synthese der Methoxyalkyl-Imidate **9a-c** nach Pinner.

Die erhaltenen Imidate **9a-c** wurden zur weiteren Reaktion mit einem dreifachen Überschuss an *N*<sup>α</sup>-Boc-L-ornithin-*tert*-butylester (**10**) bzw. *N*<sup>1</sup>-Boc-1,4-diaminobutan (**11**) in wässriger Lösung bei pH 10, umgesetzt (s. Abb. 3.5). Durch diese Reaktion wurden die geschützten Vorstufen der Zielverbindungen **12c** und **13a-c** erhalten, die anschließend mittels Säulenchromatographie über Kieselgel aufgereinigt wurden. Die Verbindungen **12a,b** konnten über diesen Syntheseweg nicht hergestellt werden.



**Abbildung 3.5:** Synthesestrategie zur Darstellung der geschützte Vorstufen der Zielverbindungen **12a-c** und **13a-c** durch Reaktion der Imidate **9a-c** mit den Aminen **10** und **11**.

Alternativ wurden andere Synthesewege zur Darstellung von **12a,b** angewandt. Ausgehend von den Nitrilen **8a,b** wurden nach verschiedenen Vorschriften (Methoden A-C) die entsprechenden Thioamide **14a,b** mit Ausbeuten von 5 - 80% hergestellt (s. Abb. 3.6):



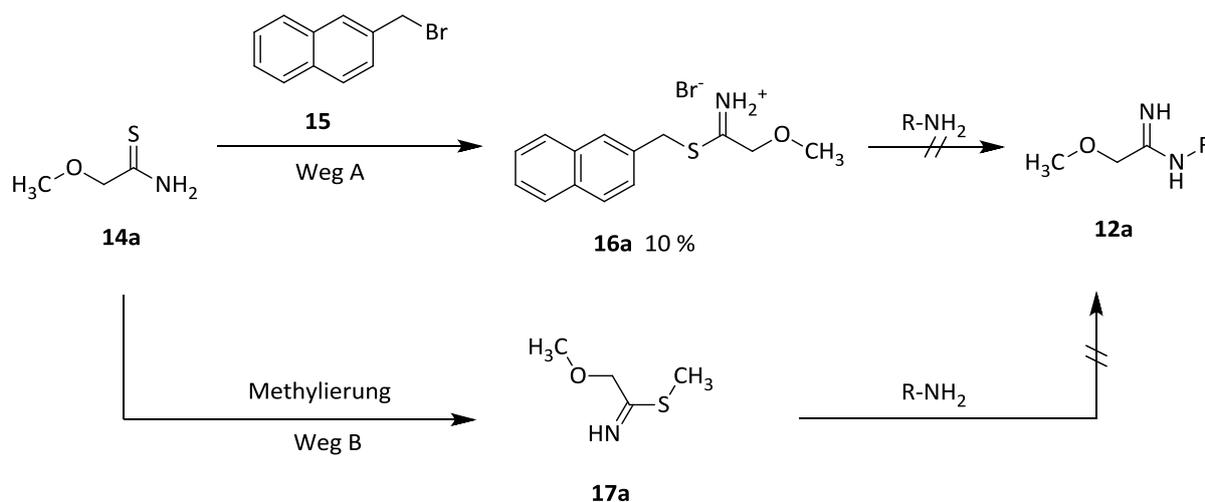
**Abbildung 3.6:** Synthese der Methoxyalkylthioamide **14a,b** aus den Nitrilen **8a,b** in Anlehnung an die Literatur. A)  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{NH}_4(\text{EtO})_2\text{PS}_2$ , 5 min, 300 W nach Kaboudin *et al.*,<sup>[158,159]</sup> B)  $\text{P}_2\text{S}_5$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , RT, 20 min nach Goswami *et al.*,<sup>[160]</sup> C)  $\text{NaSH} \times \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{DEA} \times \text{HCl}$ , Dioxan/ $\text{H}_2\text{O}$   $55^\circ\text{C}$ , 3 h nach Boys *et al.*<sup>[161]</sup>

**Methode A:** Aus Ammoniumacetat und saurem Aluminiumoxid ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) wurde eine Verreibung hergestellt, zu der eine Lösung aus Phosphorpentasulfid ( $\text{P}_2\text{S}_5$ ) und Ethanol gegeben wurde. Diese Mischung wurde eine Minute in der Mikrowelle bei 300 W bestrahlt. Das entstandene Reagenz, aluminumhaltiges Ammonium *O,O'*-Diethyldithiophosphat ( $\text{NH}_4(\text{EtO})_2\text{PS}_2$ ), wurde mit dem Nitril **8a** vermischt und weitere fünf Minuten in der Mikrowelle bestrahlt. Durch Extraktion mit Chloroform wurde das Thioamid **14a** mit einer Ausbeute von 5% extrahiert (Lit.: 48-90%)<sup>[158,159]</sup>

**Methode B:** Die Nitrile **8a,b** wurden mit  $P_2S_5$  und Natriumsulfit ( $Na_2SO_3$ ) bei Raumtemperatur 20 Minuten in einer Reibschale verrieben. Anschließend wurde die Masse mit Wasser versetzt und mit Dichlormethan extrahiert. Ein Problem dieser Methode ist, dass ein Verreiben nach wenigen Minuten kaum noch möglich ist, weil sich die Masse zementartig verfestigt und an der Reibschale haftet. Dies könnte auch die schlechten Ausbeuten von 5-20% erklären (Lit.: 60-80% für aliphatische Thioamide).<sup>[160]</sup>

**Methode C:** Die Nitrile **8a,b** wurden mit Natriumhydrogensulfid Hydrat ( $NaSH \times H_2O$ ) und Diethylamin Hydrochlorid ( $DEA \times HCl$ ) in einem Dioxan-Wasser-Gemisch (1:1) unter Stickstoffatmosphäre bei  $55^\circ C$  drei Stunden lang umgesetzt. Nach Zugabe von Wasser wurde das Produkt mit Ethylacetat extrahiert. Es wurden Ausbeuten von 42-80% erhalten (Lit.: 85% für Methoxythioacetamid **14a**).<sup>[161]</sup>

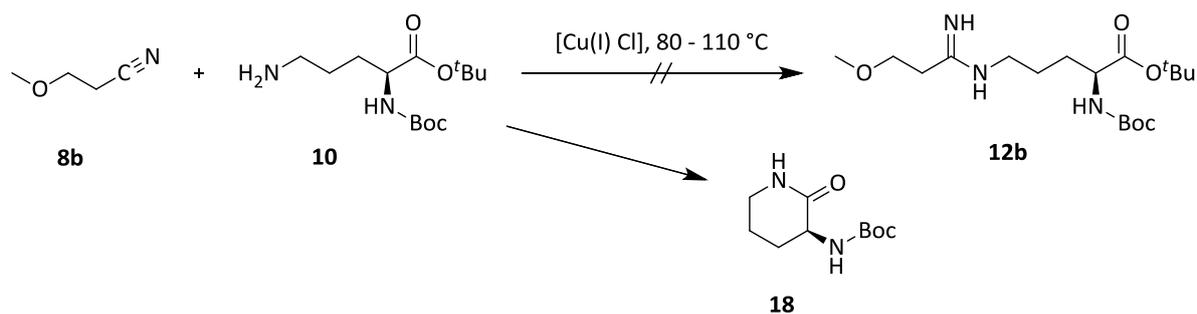
Da mit Methode C die besten Ausbeuten erzielt wurden, wurde diese fortan als Standardvorschrift angewendet. Aus dem erhaltenen Thioamid **14a** wurde analog zur Synthesevorschrift von Shearer *et al.* (s. Abb. 3.7, Weg A) das Thioimidat **16a** erzeugt, jedoch nur in Ausbeuten von 10%. Eine weitere Umsetzung zum entsprechenden Amidin **12a** gelang auf diesem Weg nicht. Des Weiteren wurde versucht die Thioamide **14a,b** über eine S-Methylierung (s. Abb. 3.7, Weg B) mit Methyljodid analog zu Thioharnstoffen zu entschwefeln und dann mit dem Amin **10** weiter umzusetzen. Diese Darstellungsversuche der Amidine waren jedoch ohne Erfolg.



**Abbildung 3.7:** Weg A: Synthese in Anlehnung an Shearer *et al.* ausgehend von Methoxythioacetamid (**14a**).<sup>[151]</sup> Weg B: Versuchte Darstellung durch S-Methylierung.

Modifiziert in Anlehnung an Baati *et al.* wurde eine Lösung des Nitrils **8b** mit Thiophenol in Diethylether durch Einleiten von Chlorwasserstoff zur Reaktion gebracht. Entstandene Thiophenylimidate (**4**, R<sup>3</sup> = Phenyl) sollen dabei als Hydrochloride auskristallisieren (s. Abb. 3.2). Da sich hier keine Kristalle gebildet haben, wurde die Reaktion genau nach Literaturangaben mit Bromwasserstoff (HBr) durchgeführt, welcher *in situ* nach einer Literaturvorschrift erzeugt wurde.<sup>[162]</sup> Auch dabei ist kein Produkt auskristallisiert. Bei der Reaktionskontrolle via DC wurde der Verbrauch an Edukt beobachtet, was zu der Annahme führte, dass das erwünschte Produkt entstanden sein könnte. Daraufhin wurde der Reaktionsansatz mit dem Amin **10** in Methanol bei Raumtemperatur fünf Stunden gerührt. Zur Neutralisation von überschüssigem HBr wurde der Ansatz mit verdünnter Natronlauge behandelt. Das gewünschte Produkt **12b** wurde mit dieser Methode leider nicht erhalten.

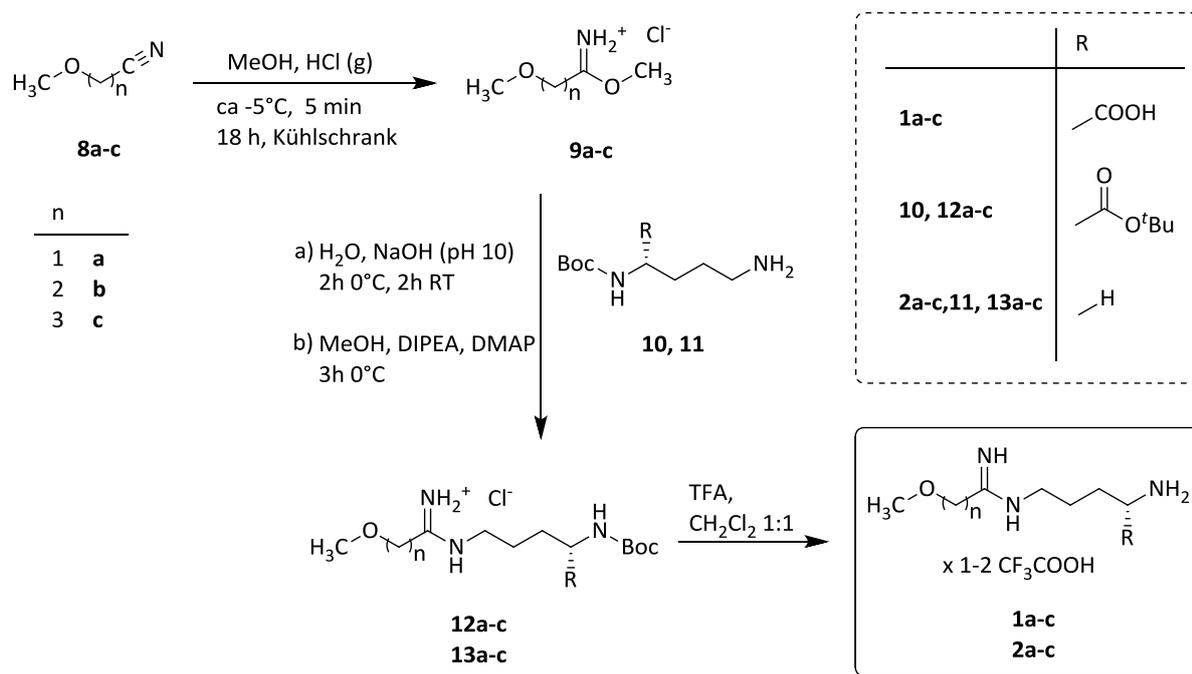
Parallel wurde nach einer Vorschrift von Rousselet *et al.* versucht, das Amin **10** an das Nitril **8b** unter Cu(I)Cl-Katalyse zu addieren und so direkt zum Amidin **12b** zu gelangen.<sup>[147]</sup> Als Lösungsmittel dient bei dieser Synthese das Nitril selbst. Die Reaktion wurde unter Stickstoffatmosphäre bei 80 °C durchgeführt. Da laut DC keine Umsetzung erkennbar war, wurde die Temperatur schrittweise erhöht. Das Produkt, das bei dieser Reaktion isoliert werden konnte, war jedoch nicht das erwünschte Amidin, sondern das durch Verlust der *tert*-Butyl-Schutzgruppe gebildete Lactam **18**. Diese Reaktion wurde von Schnörwangen bei der katalytischen Hydrierung mit Wasserstoff über Pd/C-Katalyse beschrieben.<sup>[163]</sup>



**Abbildung 3.8:** Syntheseversuch des Amidins **12b** nach einer Vorschrift von Rousselet *et al.*<sup>[147]</sup> und Bildung des Lactams **18**.<sup>[163]</sup>

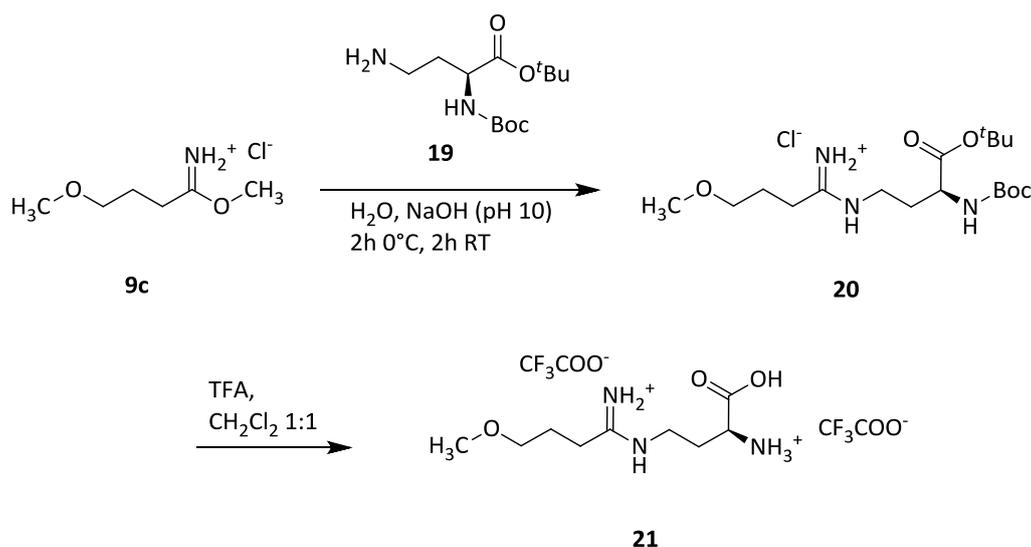
Das Lactam **18** wurde auch als Nebenprodukt der Pinner-Synthese (s. Abb. 3.5) bei leichter Temperaturerhöhung auf 40°C identifiziert, weshalb dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde. Letztendlich konnten die Verbindungen **12a,b** durch eine Modifikation der Pinner-Synthese dargestellt werden, indem die Imidate **9a,b** mit dem Amin **10** in Methanol unter Zusatz von Diisopropylethylamin (DIPEA) und katalytischer Mengen an 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) drei Stunden lang bei 0°C gerührt wurden (s. Abb. 3.9). Wahrscheinlich sind auch die Derivate **12c** sowie **13a-c** über diesen Weg herzustellen, was jedoch nicht überprüft wurde. Ein Nachteil dieser Modifikation ist eine aufwendigere säulenchromatographische Aufreinigung der Produkte zur Abtrennung von DIPEA. Die Methode in wässriger Lösung sollte nach Möglichkeit bevorzugt angewandt werden.

Die Schutzgruppen der Verbindungen **12a-c** und **13a-c** wurden in einem 1:1-Gemisch aus Trifluoressigsäure (TFA) und Dichlormethan abgespalten und das erhaltene Rohprodukt über eine RP<sub>18</sub>-Säule mittels Flashchromatographie und *Aqua bidest.* als Elutionsmittel gereinigt. Der komplette Syntheseweg ist in Abbildung 3.9 dargestellt.



**Abbildung 3.9:** Überblick der Synthesen für die erfolgreiche Darstellung der Verbindungen **1a-c** und **2a-c**.

Rossiter *et al.* [2005] hatten bereits viele Guanidine auf Basis von *nor*-L-Arginin synthetisiert sowie das um eine Methylengruppe verkürzte AbMEG.<sup>[116]</sup> Diese Verbindungen weisen alle schlechtere Inhibitoraktivitäten auf als ihre L-Arginin-Analoga (s. Kap. 2.3.4). Jedoch wurde noch nicht getestet, ob die verminderte Hemmwirkung auch bei Amidinen zutrifft. Zur Überprüfung, wurde ein weiteres Amidin **21** mit dem Imidat, dessen Methoxyalkyl-Rest der Längste in der Reihe ist (**9c**), und *N*<sup>α</sup>-Boc-*nor*-L-ornithin-*tert*-butylester (**19**) nach der Pinner-Reaktion in wässriger Lösung hergestellt (s. Abb. 3.10).



**Abbildung 3.10:** Synthese des Amidins **21** auf Grundlage von *nor*-L-Ornithin.



### 3.2.3.2 Hemmung der NOSs

Die Hemmdaten an den drei Isoenzymen der NOS wurden mit einem literaturbekannten Oxyhämoglobin-Assay bestimmt. Gemessen wurde die durch NOS-Katalyse aus L-Arginin freigesetzte Menge an NO, welches äquimolar mit Oxyhämoglobin zu Methämoglobin und Nitrat reagiert.<sup>[7,165,166]</sup> Bei den verwendeten rekombinanten Enzymen handelt es sich um Ratten-nNOS, murine iNOS und bovine eNOS. Die ermittelten Hemmdaten sind in Tabelle 3.2 gezeigt.

**Tabelle 3.2:** Hemmdaten für die Verbindungen **1a-c** und **2a-c** an den NOS-Isoenzymen. Die gezeigten Daten sind MW  $\pm$  SD von drei separaten Inkubationen. Die Daten wurden von J. Platzek bestimmt.<sup>[164]</sup>

Substanz	Hemmung / %					
	nNOS		iNOS		eNOS	
	1 mM	100 $\mu$ M	1 mM	100 $\mu$ M	1 mM	100 $\mu$ M
<b>1a</b>	93 $\pm$ 2	71 $\pm$ 5	75 $\pm$ 5	26 $\pm$ 7	89 $\pm$ 4	48 $\pm$ 6
<b>1b</b>	65 $\pm$ 1	23 $\pm$ 15	50 $\pm$ 7	12 $\pm$ 20	54 $\pm$ 18	24 $\pm$ 35
<b>1c</b>	35 $\pm$ 13	15 $\pm$ 20	26 $\pm$ 13	21 $\pm$ 26	29 $\pm$ 19	26 $\pm$ 7
<b>2a</b>	78 $\pm$ 1	41 $\pm$ 11	42 $\pm$ 8	35 $\pm$ 16	44 $\pm$ 19	33 $\pm$ 7
<b>2b</b>	19 $\pm$ 23	7 $\pm$ 13	16 $\pm$ 5	7 $\pm$ 9	28 $\pm$ 6	7 $\pm$ 9
<b>2c</b>	7 $\pm$ 13	14 $\pm$ 13	15 $\pm$ 4	10 $\pm$ 5	36 $\pm$ 6	10 $\pm$ 5

### 3.2.3.3 Hemmung der Arginase

Die Hemmdaten an der Arginase wurden mit einem im Arbeitskreis etablierten kolorimetrischen Plattenreader-Assay an boviner Arginase I durchgeführt (s. Kap. 6.2.2.2). Quantifiziert wurde die aus L-Arginin durch Arginase-Katalyse gebildete Menge an Harnstoff. Die ermittelten Hemmdaten sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

**Tabelle 3.3:** Hemmdaten für die Verbindungen **1a-c** und **2a-c** an der Arginase. Die gezeigten Daten sind MW  $\pm$  SD von drei separaten Inkubationen. Die Daten wurden von J. Kotthaus bestimmt. (bisher unveröffentlicht)

Substanz	Hemmung / %	
	1 mM	100 $\mu$ M
<b>1a</b>	22 $\pm$ 2	13 $\pm$ 5
<b>1b</b>	43 $\pm$ 1	32 $\pm$ 5
<b>1c</b>	20 $\pm$ 1	19 $\pm$ 8
<b>2a</b>	21 $\pm$ 2	14 $\pm$ 4
<b>2b</b>	22 $\pm$ 2	18 $\pm$ 6
<b>2c</b>	14 $\pm$ 2	11 $\pm$ 6

### 3.2.4 Diskussion

Die zentrale Aufgabe war die Entwicklung neuer DDAH-Hemmstoffe, bei denen der Methoxyalkyl-Rest des L-257 bzw. AbMEGs (**27**) auf Amidine übertragen wird. Mehrere literaturbekannte Wege zur Darstellung *N*-substituierter Amidine wurden hierfür getestet. Die Verbindungen **1c**, **2a-c** und **21** konnten über die von Pinner beschriebene Methode synthetisiert werden. Die Imidate mit den kürzeren Alkylketten **9a,b** waren bei den gegebenen Reaktionsbedingungen nicht reaktiv genug um mit dem geschützten L-Ornithin **10** zu reagieren. Über eine Modifikation der Pinner-Synthese, Wechsel von Lösungsmittel und Base (Wasser zu Methanol, bzw. NaOH zu DIPEA), konnten die Verbindungen **1a,b** erfolgreich hergestellt werden. Bemerkenswert war die Temperaturempfindlichkeit des geschützten Edukts **10**, welches bei erhöhten Reaktionstemperaturen durch Aminolyse der *O*-*tert*-Butyl-Schutzgruppe zum Lactam **18** zyklisierte. Abschließend lässt sich sagen, dass alle gewünschte Derivate mittels Pinner-Synthese über zwei leicht variierende Methoden (A und B) zugänglich waren. Die Verbindungen **1a-c**, **2a-c** und **21** konnten erfolgreich als Trifluoracetat-Salze für *in vitro*-Testungen zur Verfügung gestellt werden.

Alle neuen Verbindungen wurden an wichtigen Enzymen des NO-regulierenden Systems getestet. Das Ziel war möglichst potente Inhibitoren der DDAH zu finden, die selektiv gegenüber NOSs und Arginase sind. Im Zuge dieser Testungen sollte untersucht werden, wie groß der Einfluss des Methoxyalkyl-Restes von L-257/AbMEG auf die Hemmwirkung bei Amidinen ist. Ist es möglich durch Einführung eines solchen Substituenten auf die Carboxylgruppe der Aminosäure-Funktion zu verzichten? Bisher existierten nur die zwei decarboxylierten Verbindungen decVNIO und AbMEG (**27**), die sich in ihrer Hemmpotenz auf die DDAH deutlich unterscheiden ( $K_{i(\text{decVNIO})} = 768 \mu\text{M}$ ,  $K_{i(\text{AbMEG})} = 18 \mu\text{M}$ ).<sup>[119]</sup>

Als Ergebnis der Docking-Studien wurde die Verbindung **1c** ( $\text{p}K_i \text{ calc} = 5,00$ ) als potentester Inhibitor der Reihe **1a-c** vorhergesagt. Für die decarboxylierten Derivate **2a-c** wurde eine wesentlich schlechtere Wirkung errechnet ( $\text{p}K_i \text{ calc} = 3,18\text{-}3,72$ ). Verglichen mit den *in vitro*-Testdaten an der hDDAH-1 konnte die Tendenz für die schlechtere Wirkung der Verbindungen ohne Carboxylgruppe bestätigt werden. Jedoch hat sich Verbindung **1b** als potentester Vertreter der Methoxyalkylamidine, mit einem  $K_i$ -Wert von  $9 \mu\text{M}$  ( $\text{p}K_i = 5,04$ ), herausgestellt. Der zugehörige vorhergesagte  $\text{p}K_i \text{ calc}$ -Wert ist 4,76. Für den vermeintlich besten Kandidaten **1c** wurde bei den *in vitro*-Studien ein  $K_i$ -Wert von  $156 \mu\text{M}$  ( $\text{p}K_i = 3,81$ ) ermittelt und somit ist dieser die am schlechtesten hemmende Verbindung aus dieser Reihe. Dieses Ergebnis ist überraschend, da es sich hierbei um das direkte Amidin-Analogon zu L-

257 handelt. Der einzige strukturelle Unterschied ist der Austausch eines N-Atoms des L-257 gegen ein C-Atom bei **1c**. Eine mögliche Erklärung ist ein leicht veränderter Bindungswinkel des Substituenten am C- im Vergleich zum N-Atom oder die etwas längeren  $\sigma$ -Bindungen (C-N-C =  $2 \times 147$  ppm; C-C-C =  $2 \times 154$  ppm). Somit könnte **1c** gerade eben zu groß sein, wohingegen L-257 noch gut in die Bindetasche passt.

Trotzdem sind die Vorhersagen mit dem Prognose-Modell anwendbar. Bei einem kleinen Trainingsdatensatz von 15 Verbindungen sind die kalkulierten Daten akzeptabel. Für Verbindung **1b** passt der errechnete Wert sogar relativ gut zum experimentell ermittelten. Auch die decarboxylierten Derivate bestätigen den errechneten Abfall der Hemmpotenz. Im Experiment fällt der Abfall noch deutlicher aus (Bsp. **2b**:  $pK_i = 2,84$ ) als zuvor berechnet ( $pK_i \text{ calc} = 3,56$ ). Berücksichtigt man die Tatsache, dass bei den für die Erstellung des Prognose-Modells verwendeten Verbindungen LOO-Abweichungen von bis zu einer Log-Stufe toleriert wurden, liegen die meisten Wertepaare innerhalb dieser Toleranz (s. Tab. 3.4).

**Tabelle 3.4:** Vergleich der experimentell ermittelten  $K_i$ - und daraus abgeleiteten  $pK_i \text{ exp}$ -Werte und den mittels Prognose-Modell errechneten  $pK_i \text{ calc}$ -Werten. n. b., nicht bestimmt.

Verbindung	$K_i / \mu\text{M}$	$pK_i \text{ exp}$	$pK_i \text{ calc}$
<b>1a</b>	$73 \pm 6$	4,14	3,88
<b>1b</b>	$9 \pm 1$	5,04	4,76
<b>1c</b>	$156 \pm 9$	3,81	5,00
<b>2a</b>	$983 \pm 19$	3,01	3,19
<b>2b</b>	$1446 \pm 91$	2,84	3,56
<b>2c</b>	n. b.	n. b.	3,72

Verbindung **21** basiert im Unterschied zu **1a-c** auf *nor*-L-Ornithin und ist somit in der Grundkette um eine Methyleneinheit verkürzt. Eine analoge Substanzreihe von Rossiter *et al.* existiert für Guanidin-basierte Verbindungen und weist wesentlich schlechtere Hemmwerte an der DDAH als die länger-kettigen Derivate auf.<sup>[116]</sup> Dieser Unterschied wurde auf Amidin-Basis noch nicht überprüft, weshalb diese Verbindung trotz der schlechten Erwartungshaltung synthetisiert und getestet wurde. Bei einer Konzentration von 1mM lag die Hemmung der DDAH bei  $6 \pm 1\%$ , weswegen auf eine  $K_i$ -Wert-Bestimmung sowie weitere Untersuchungen verzichtet wurden. Es kann bestätigt werden, dass die Kettenlänge zwischen Aminogruppe

und Amidin- bzw. Guanidin-Funktion für eine gute Hemmwirkung mindestens vier C-Atome betragen muss.

Die Selektivitäts-Untersuchungen gegenüber den NOSs zeigen zwar große Standardabweichungen, die in der Methode an sich begründet liegen,<sup>[164]</sup> dennoch ist ein klarer Trend zu erkennen: Je kürzer der Substituent, desto stärker ist die Hemmwirkung an den NOSs, da die Bindetasche der NOSs besonders kleinere Moleküle toleriert. In das aktive Zentrum der DDAH passen auch noch etwas größere Verbindungen, die von den NOSs nicht gut akzeptiert werden. Eine gewisse Selektivität gegenüber der NOS kann also über die Größe der Inhibitoren erreicht werden. Diese Erkenntnis wurde in früheren Arbeiten bereits gewonnen und durch die hier generierten Daten weiter bekräftigt.<sup>[121,130,167]</sup> Für den hier potentesten DDAH-Inhibitor **1b** ist noch eine deutliche NOS-Hemmung detektierbar, jedoch könnte diese Verbindung als dualer Inhibitor (DDAH/NOS) analog der von Wang *et al.* publizierten Substanzen eingesetzt werden.<sup>[121]</sup>

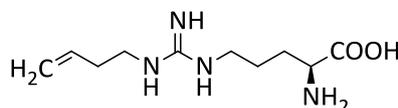
Kritischer ist der Aspekt der Arginase-Hemmung, weil in diesem Fall ein funktioneller Antagonismus vorläge (s. Kap. 1). Eine möglichst gute Selektivität ist von Vorteil, doch leider ist Verbindung **1b** auch der beste Arginase-Inhibitor innerhalb der Substanzreihen **1a-c** und **2a-c** mit einer Hemmung von 43% bei 1 mM und 32% bei 100  $\mu$ M.

Abschließend bleibt zu sagen, dass sich Verbindung **1b** ( $K_i = 9 \mu$ M) als potenterer DDAH-Inhibitor als AbMEG (**27**,  $K_i = 18 \mu$ M)<sup>[119]</sup> und L-257 ( $K_i = 13 \mu$ M)<sup>[130]</sup> erwiesen hat, diesen in Bezug auf Selektivität gegenüber NOSs und Arginase jedoch unterlegen ist. AbMEG (**27**) bleibt der bisher einzige potente DDAH-Hemmstoff ohne Carboxylgruppe. Alle decarboxylierten amidinhaltigen Hemmstoffe weisen eine deutlich schlechtere inhibitorische Aktivität auf.

### 3.3 *N*-Aminobutyl-*N'*-3-butenylguanidin (AbBG)

#### 3.3.1 Einleitung

Die Erkenntnisse, die aus den Hemmdaten der Verbindungen aus Kapitel 3.2 an der hDDAH-1 gewonnen wurden, untermauern die These, dass die Basizität der Guanidin-Funktion im AbMEG (**27**) die entscheidende Rolle für den Verzicht der Carboxylgruppe spielt und weniger der 2-Methoxyethyl-Rest. Zur Überprüfung dieser Theorie war es notwendig neben AbMEG (**27**) einen weiteren Guanidin-basierten Hemmstoff ohne Carboxylgruppe zu synthetisieren. Als Ausgangssubstanz wurde 3-Butenylarginin (Butenyl-Arg, **22**) gewählt, welche einen  $K_i$ -Wert von  $57 \pm 9 \mu\text{M}$  an der DDAH aufweist.<sup>[130]</sup>



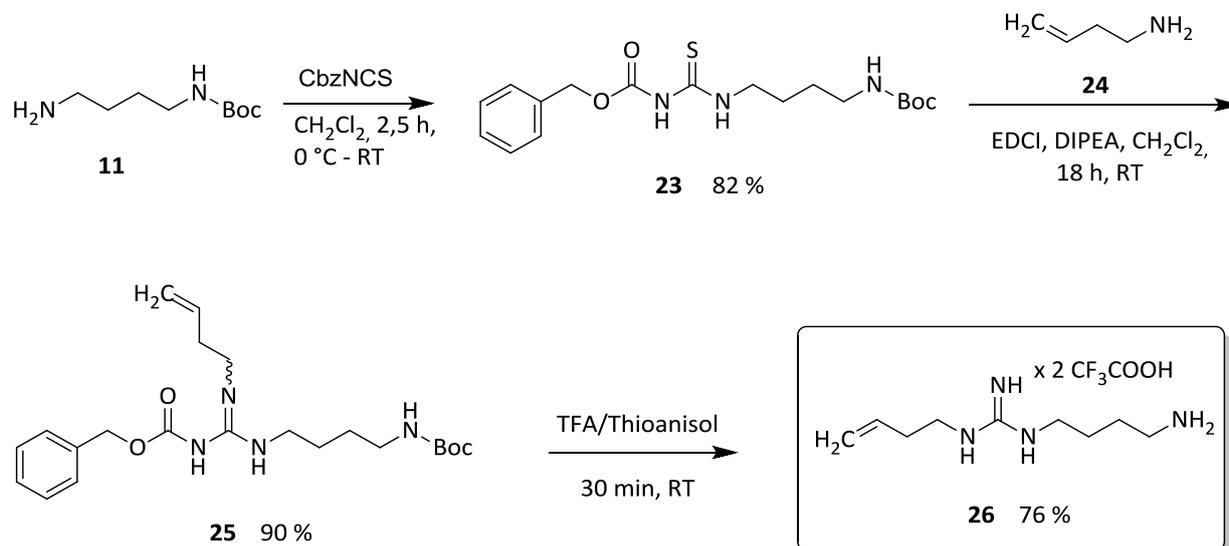
**22** (Butenyl-Arg)

#### 3.3.2 Synthese

Da es sich bei der neuen Verbindung *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-but-3-enylguanidin (AbBG, **26**) um ein Derivat des AbMEGs handelt, wurde die Synthese nach dem gleichen literaturbekannten Syntheschema durchgeführt.<sup>[128,168,169]</sup> Die Guanidin-Funktion wird dabei über einen Thioharnstoff aufgebaut, welcher mit einem Amin in Gegenwart des Entschwefelungs-Reagenzes *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDCI, **33**) umgesetzt wird.

Der Cbz-geschützten Thioharnstoff **23** wurde durch Addition des Amins **11** an *N*-Benzyloxycarbonylisothiocyanat (CbzNCS), welches als ca. 0,5 M Lösung in Dichlormethan eingesetzt wurde, in einer Ausbeute von 82% in Anlehnung an Linton *et al.* gewonnen. Die weitere Reaktion mit But-3-enylamin (**24**), EDCI (**33**) und DIPEA als Hilfsbase in Dichlormethan erfolgte ebenso in Anlehnung an Linton *et al.*, über Nacht, in einer Ausbeute von 90% Guanidin **25**.<sup>[168]</sup> Durch wässrige Aufarbeitung wurden DIPEA, überschüssiges Amin sowie der aus EDCI entstandene Thioharnstoff entfernt. Zur Abtrennung lipophiler Verunreinigungen und Edukt-Rückstände wurde eine Säulenchromatographie an Kieselgel durchgeführt. Als finaler Syntheseschritt wurden die Cbz- und die Boc-Schutzgruppen in Anlehnung an Kiso *et al.* simultan in einem Gemisch aus Trifluoressigsäure und Thioanisol durch 30-minütiges Rühren bei Raumtemperatur abgespalten. Das erhaltene Guanidin **26** wurde

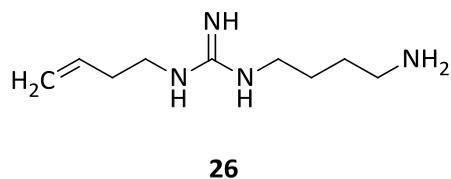
mittels Flashchromatographie über eine RP<sub>18</sub>-Säule mit 0,1% TFA in *Aqua bidest.* als Elutionsmittel gereinigt und liegt als Trifluoracetat vor.<sup>[170]</sup> Ein Überblick des gesamten Syntheseweges ist in Abb. 3.11 gezeigt.



**Abbildung 3.11:** Synthese von *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-but-3-enylguanidin (**26**) mit einer Gesamtausbeute von 56%

### 3.3.3 *In vitro* Hemmdaten an den Enzymen des NO-Stoffwechsels

Das Guanidin **26** wurde analog der Verbindungen aus Kapitel 3.2 auf potentielle Hemmstoffqualitäten gegenüber den Enzymen des NO-Stoffwechsels untersucht (s. Kap 3.2.3). Die ermittelten Hemmdaten sind in Tabelle 3.5 dargestellt.



**Tabelle 3.5:** Übersicht der Hemmdaten von AbBG (**26**) an den Enzymen des NO-Stoffwechsels. Die gezeigten Daten sind  $MW \pm SD$  von mindestens drei separaten Inkubationen. Die  $K_i$ -Wert-Bestimmung wurde mindestens doppelt durchgeführt. Die Testung an den NOSs und der DDAH wurde von J. Platzek durchgeführt.<sup>[164]</sup> n. b., nicht bestimmt.

Enzym	Hemmung / %		
	1 mM	100 $\mu$ M	$K_i$ / $\mu$ M
DDAH	$72 \pm 1$	$29 \pm 1$	$59 \pm 3$
Arginase	$0 \pm 12$	$0 \pm 9$	n. b.
nNOS	$5 \pm 5$	$8 \pm 4$	n. b.
iNOS	$23 \pm 6$	$16 \pm 12$	n. b.
eNOS	$35 \pm 17$	$32 \pm 32$	n. b.

### 3.3.4 Diskussion

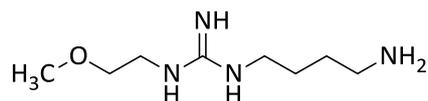
Das AbBG (**26**) ließ sich gut über den Cbz-geschützten Thioharnstoff **23** in einer Gesamtausbeute von 56% synthetisieren. Grund für dessen Synthese war die Untersuchung des Einflusses der Basizität von Guanidin- vs. Amidin-Funktion auf die Hemmwirkung an der DDAH bei substratanalogen Verbindungen, denen die Carboxylgruppe fehlt. Bisher war AbMEG (**27**) die einzige Verbindung, deren Hemmpotenz durch den Verlust der Carboxylgruppe nicht massiv abgenommen hat. Die *in vitro*-Testdaten von AbBG (**26**) an der hDDAH-1 zeigen, dass auch hier annähernd die gleiche Hemmwirkung wie die von Butenyl-Arg (**22**) vorliegt ( $K_i$  (Butenyl-Arg) =  $57 \mu$ M;<sup>[130]</sup>  $K_i$  (AbBG) =  $59 \mu$ M).

Somit scheinen die Fragen - warum kann bei L-257 ohne Verlust der biologischen Aktivität die Carboxylgruppe entfernt werden, nicht aber bei Vinyl-NIO und welchen Einfluss hat der Methoxyethyl-Rest des L-257 bzw. die Guanidin/Amidin-Funktion - aus Kapitel 2.4 beantwortet zu sein. Aufgrund der besseren Wechselwirkung der Guanidin-Funktion durch einen Stickstoff mehr als beim Amidin, ist es möglich auf die Carboxylgruppe des L-257 zu verzichten und so mit AbMEG einen ebenso potenten, selektiven hDDAH-1-Inhibitor zu erhalten.

## 3.4 Anwendung von Prodrug-Strategien

### 3.4.1 Einleitung und Zielsetzung

Anhand der *in vitro*-Ergebnisse der neuen Verbindungen **1a-c**, **2a-c**, **21** und **26** bleibt die Verbindung AbMEG (**27**) der beste Kandidat bezüglich Inhibitor-Potenz, Selektivität und Arzneistoffqualität.



**27** AbMEG

Auch wenn keine Carboxylgruppe mehr vorhanden ist, bleibt der ionische Charakter der Verbindung durch die Basizität des vorhandenen primären Amins und der Guanidin-Funktion erhalten. Für eine perorale Arzneistoff-Applikationen sind solche Eigenschaften ungünstig und führen zu einer schlechten Bioverfügbarkeit im Gastrointestinaltrakt (GIT). Durch strukturelle Modifikation kann beispielsweise die Basizität der Guanidin-Funktion gesenkt werden. Dadurch liegt ein geringerer Anteil der Verbindung in protonierter Form vor, der besser absorbiert werden kann. Im Arbeitskreis wurden verschiedene Prodrug-Konzepte für Amidine und Guanidine entwickelt, von denen einige hier Anwendung finden sollen.<sup>[132,141,171]</sup>

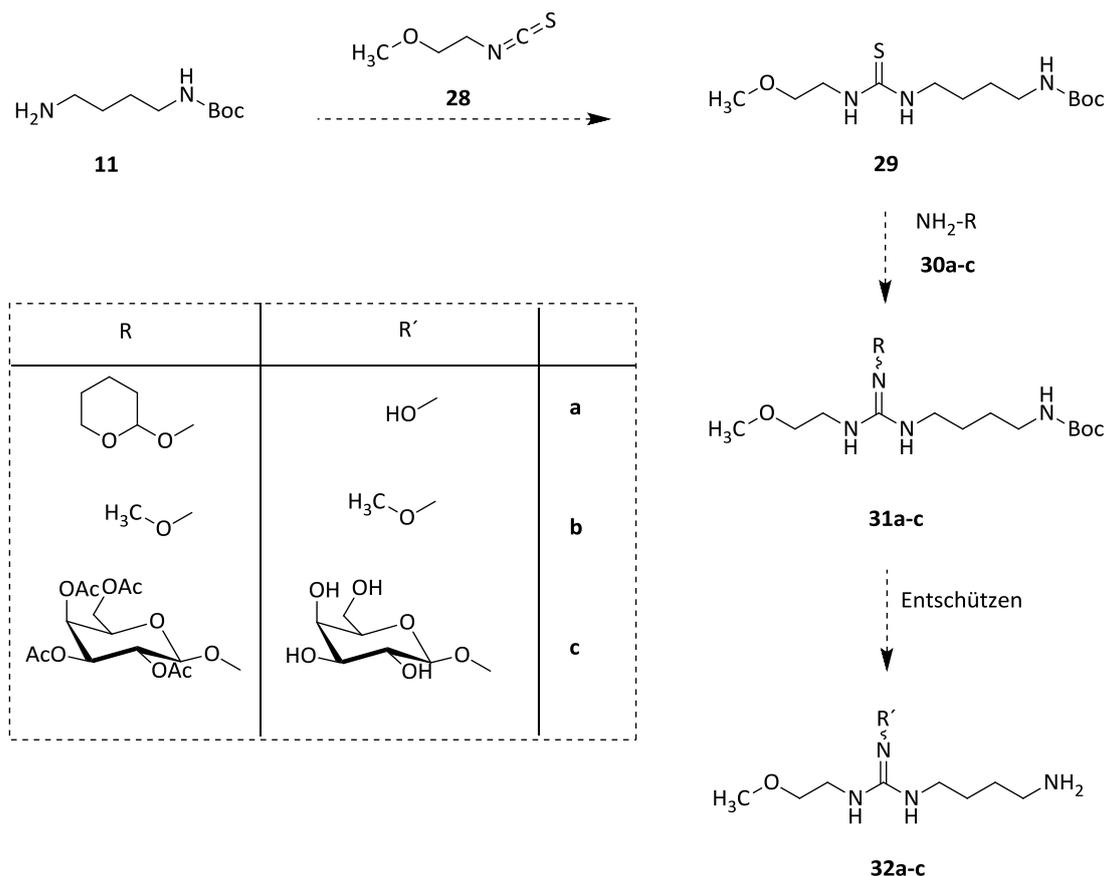
Das einfachste Prodrug-Prinzip ist die Einführung einer Hydroxylgruppe am bisher nicht substituierten  $N^0$ -Atom. Eine enzymatische Reduktion von Hydroxyguanidinen wurde bereits an der physiologischen Substanz NOHA und anderen Verbindungen gezeigt und charakterisiert.<sup>[172-176]</sup> Diese Reduktion entspricht im Fall des Prodrug-Prinzips der Bioaktivierung zum wirksamen Metaboliten.

Hydroxyguanidine selbst sind in der Regel nicht besonders stabil und zersetzen sich schon bei Raumtemperatur. Am stabilsten sind sie in Form von Salzen starker Säuren, empfindlich sind sie gegenüber Basen oder auch Oxidantien.<sup>[171,177,178]</sup> Für NOHA wurde bereits gezeigt, dass die Einführung eines *O*-Substituenten sowohl die oxidative, als auch hydrolytische Stabilität von Hydroxyguanidinen erhöht,<sup>[171]</sup> weshalb diese Maßnahme hier Anwendung finden sollte. Darüber hinaus ist die *O*-Substitution eine zusätzliche Modifikation zur Steigerung der oralen Bioverfügbarkeit der Verbindung. Im Folgenden sollen eine Methylgruppe, die die Lipophilie der Verbindung erhöhen soll, und ein Galaktosyl-Rest eingeführt werden. Die erste Strategie

hat den Nachteil, dass Cytochrom P450-Enzyme in der Demethylierung als Part der Bioaktivierung involviert sind,<sup>[179]</sup> welches zu Interaktionen mit anderen Arzneistoffen führen kann. Bei der zweiten Strategie sollen Glukose-Transporter zur gesteigerten Absorption der Substanz sowie eine Bioaktivierung über  $\beta$ -Galaktosidasen ausgenutzt werden. Ein Vorteil bei dieser Strategie ist, dass keine toxischen Nebenprodukte entstehen sollen.<sup>[171,180]</sup>

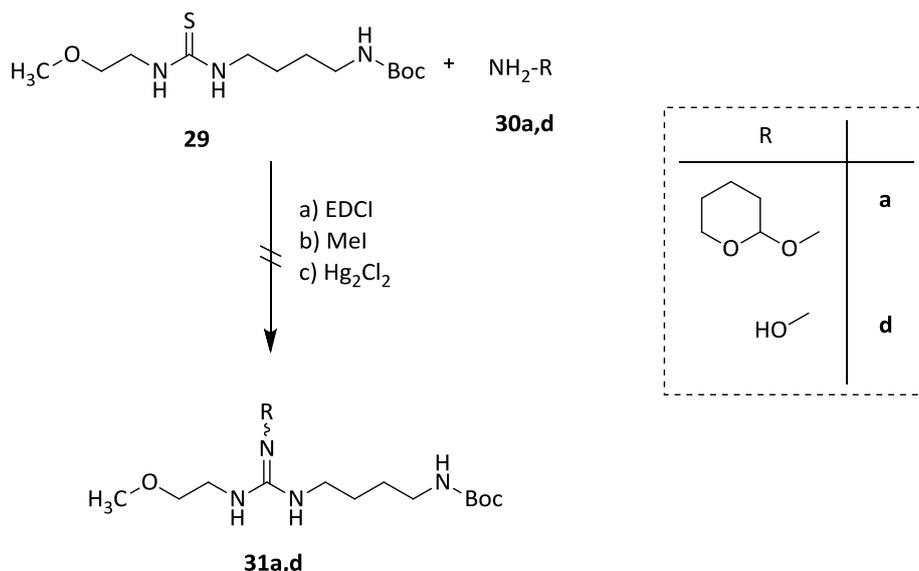
### 3.4.2 Synthesestrategien

Um die Synthese der Prodrug-Kandidaten möglichst effizient zu gestalten, wurde ein gemeinsamer Syntheseweg angestrebt. Analog zum AbMEG (**27**) sollte dieser über Thioharnstoffe möglich sein (s. Kap. 3.3.2). Als gemeinsamer Grundkörper, welcher bereits den 2-Methoxyethyl-Rest sowie die Aminobutyl-Kette des AbMEGs aufweist, ergab sich der Thioharnstoff **29**. Hiervon ausgehend sollten die Substituenten als *O*-substituierte Hydroxylamin-Derivate eingeführt werden und in einem finalen Schritt vorhandene Schutzgruppen simultan entfernt werden. Durch die Einführung der *O*-Substituenten über Hydroxylamin-Derivate kann der Aufbau des Hydroxyguanidins und dessen *O*-Substitution in einem Schritt erfolgen, sodass in keinem Syntheseschritt die empfindlichen freien Hydroxyguanidine als Zwischenstufe auftauchen. Die vorgeschlagene Syntheseroute ist in Abb. 3.12 zusammenfassend dargestellt.



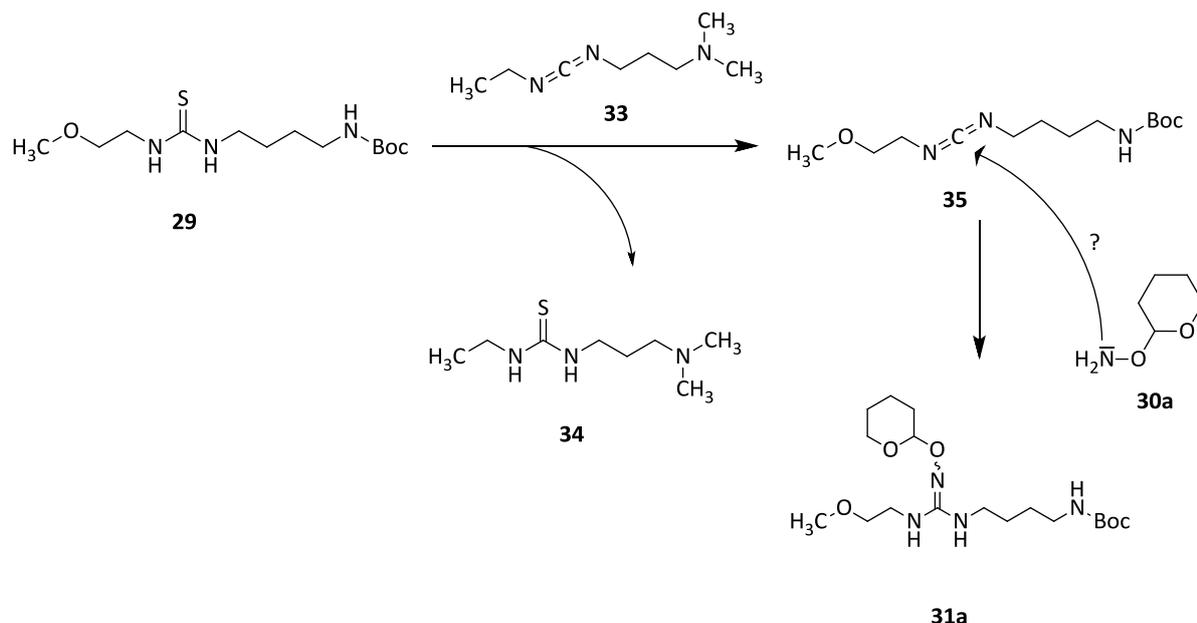
**Abbildung 3.12:** Vorgeschlagener Syntheseweg über das gemeinsame Intermediat **29** zur Darstellung der AbMEG-Prodrugs **32a-c**.

Die Synthese des Thioharnstoffs **29** erfolgt in Anlehnung an Linton *et al.* mit 2-Methoxyethylisothiocyanat (**28**) und dem Amin **11** in Dichlormethan durch Rühren über Nacht bei Raumtemperatur.<sup>[168]</sup> Nach wässriger Aufarbeitung wurde das Produkt in einer Ausbeute von 89% erhalten und konnte ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden. Zunächst sollte das einfache Hydroxyguanidin des AbMEGs (**32a**) hergestellt werden. Versuche zur Darstellung wurden sowohl mit *O*-THP-geschütztem Hydroxylamin **30a** als auch mit freiem Hydroxylamin durchgeführt. In Anlehnung an Martin *et al.* wurde EDCI (**33**) als Entschwefelungsreagenz und DIPEA als Hilfsbase gewählt. Die Reaktion erfolgte über Nacht in Dichlormethan.<sup>[169]</sup> Mit keinem der eingesetzten Amine ließ sich das gewünschte Hydroxyguanidin **31a** bzw. jenes ohne THP-Schutzgruppe herstellen. Die Reaktionsverlaufskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie ergab, dass der Thioharnstoff nicht umgesetzt wurde. Daraufhin wurden alternative Verfahren zur Entschwefelung (Quecksilber(II)chlorid (HgCl<sub>2</sub>), Methyljodid (MeI)) des Thioharnstoffs durchgeführt.<sup>[181]</sup> Auch auf diese Weise wurde das gewünschte Hydroxyguanidin nicht erhalten (s. Abb. 3.13).



**Abbildung 3.13:** Versuchte Entschwefelungsmethoden zum Aufbau des Hydroxyguanidins **31a** bzw. **31d**

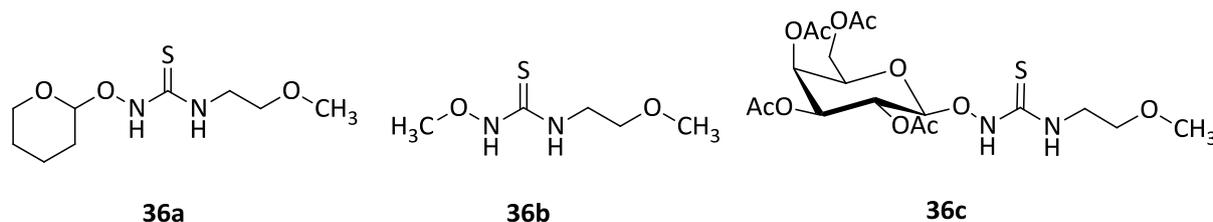
Eine Erklärung könnte der postulierte Reaktionsmechanismus am Beispiel der Synthese mit EDCI **33** als Entschwefelungsreagenz liefern. Sowohl Katrizky und Rogovoy als auch Martin *et al.* beschreiben einen Reaktionsmechanismus, bei dem aus dem Thioharnstoff zunächst durch Entschwefelung ein intermediäres Carbodiimid entsteht, welches anschließend durch nucleophilen Angriff der Aminkomponente zum Guanidin reagiert.<sup>[169,182]</sup> In Abb. 3.14 ist der Reaktionsmechanismus dargestellt. Der als Nebenprodukt entstehende Thioharnstoff **34** wird von Martin *et al.* nicht beschrieben, ein starkes Indiz für dessen Bildung konnte jedoch bei Verlaufskontrollen mittels DC bei Umsetzungen anderer Thioharnstoffe beobachtet werden. Thioharnstoff **34** gibt eine auffällige, hellblaue Färbung mit dem Derivatisierungs-Sprühreagenz FCNP (*ferricyanide-nitroprusside*),<sup>[183]</sup> welche auch bei dem eingesetzten Thioharnstoff **29**, jedoch nicht beim Cbz-aktivierten Thioharnstoff **23** beobachtet wurde.



**Abbildung 3.14:** Postulierter Reaktionsmechanismus der Umsetzung von Thioharnstoffen zu Guanidinen am Beispiel von Thioharnstoff **29** mit EDCI (**33**) als Entschwefelungsreagenz.<sup>[169,182]</sup>

Beim direkten Vergleich der Strukturen des intermediären Carbodiimids **35** und des EDCI (**33**) fällt auf, dass beide Verbindungen keine elektronenziehenden Substituenten in Nachbarschaft zur Diimid-Struktur besitzen. Dies lässt folgende Schlussfolgerungen zu: Entweder ist das Diimid-C-Atom nicht elektrophil genug, sodass ein nucleophiler Angriff des Amins **30a** nicht erfolgen kann, oder das Carbodiimid **35** wird auf diesem Weg nicht gebildet. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass im Falle einer Reaktion des nichtaktivierten Carbodiimids **35** mit Amin **30a**, auch EDCI (**33**) in gleichem Ausmaß mit **30a** reagieren müsste, da eine vergleichbare Elektrophilie des C-Atoms vorliegen sollte. Durch eine Reaktion von EDCI (**33**) mit den zugesetzten Aminen macht diese Entschwefelungsstrategie aber keinen Sinn mehr.

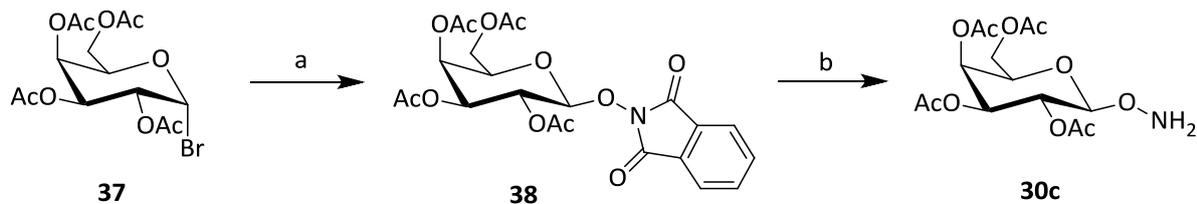
Anstelle des gemeinsamen Synthesewegs über Thioharnstoff **29** kann in einer aufwendigeren Prozedur für jedes Hydroxyguanidin ein eigener Thioharnstoff (**36a-c**) synthetisiert werden, welcher dann mit Amin **11** zum entsprechenden Hydroxyguanidin umgesetzt wird.



Die Synthese dieser Thioharnstoffe sollte analog der Verbindungen **23** und **29** erfolgen. Für **36a** ergab sich auch nach Verlängerung der Reaktionszeit in Dichlormethan nur eine Ausbeute von ca. 40%. Ein Wechsel des Lösungsmittels auf Acetonitril und fünfstündiges Erhitzen zum Rückfluss konnte die Ausbeute auf 85% steigern (s. Abb. 3.16). Die Lagerung bei Raumtemperatur führt zur schnellen Zersetzung, deshalb wurde die Substanz kurzfristig im Kühlschrank bei 4°C und längerfristig bei -20°C gelagert.

Die Synthese von **36b** gestaltete sich etwas schwieriger. Da das eingesetzte Amin **30b** als Hydrochlorid vorlag, musste eine Hilfsbase zugesetzt werden. Syntheseveruche in Dichlormethan mit verschiedenen Reaktionszeiten und unterschiedlicher Temperatur erbrachten keine Umsetzung. Der Wechsel auf Acetonitril und Erhitzen zum Rückfluss führte zu rascher Zersetzung des entstandenen Thioharnstoffs und vielen Nebenprodukten. Dies konnte durch längeres Rühren bei Raumtemperatur reduziert werden, jedoch war eine Ausbeute von ca. 25% noch nicht zufriedenstellend. Die Synthese in Anlehnung an Kraatz (Houben-Weyl) mit NaOH als Hilfsbase, einer Mischung aus Diethylether und Dioxan als Lösungsmittel und einer Reaktionszeit von drei Tagen ergab Ausbeuten von 55% nach säulenchromatographischer Aufreinigung der Substanz. Thioharnstoff **36b** wurde im Kühlschrank bei ca. 4°C gelagert, um eine frühzeitige Zersetzung zu vermeiden (s. Abb. 3.16).

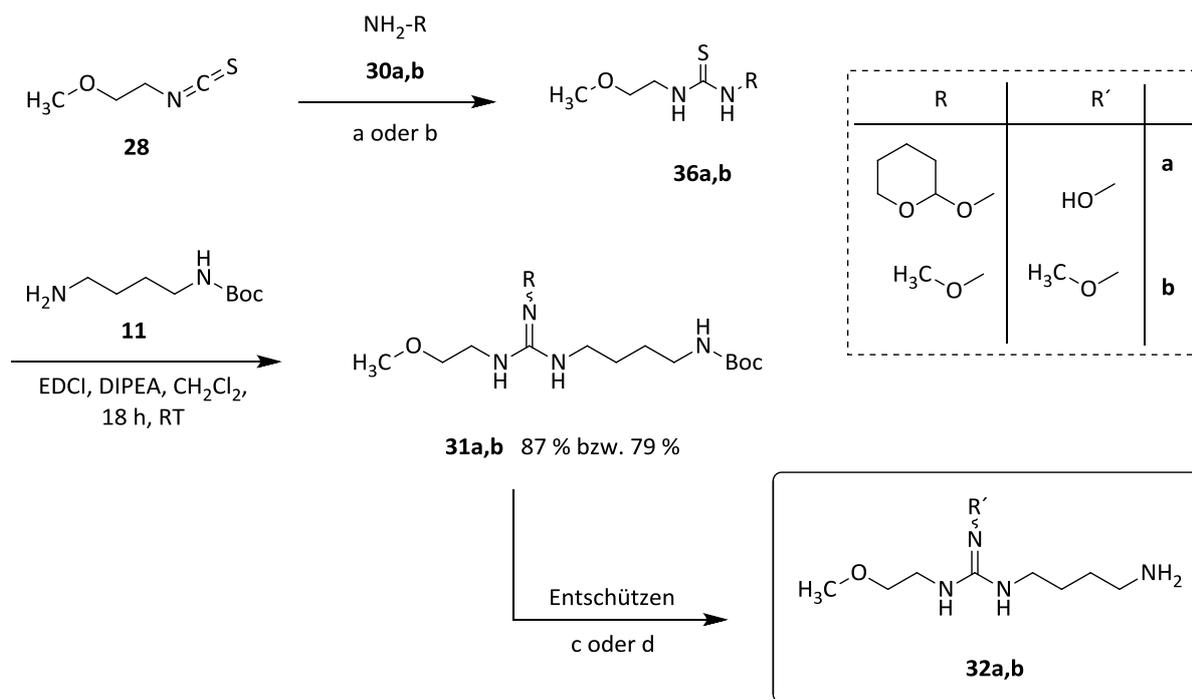
Für die Synthese der Verbindung **36c** wurde zunächst die benötigte 1-aminooxylierte  $\beta$ -Galaktose **30c** modifiziert nach verschiedenen Vorschriften aus der Literatur hergestellt (s. Abb. 3.15). Aus dem Bromid **37** wurde durch Umsetzung mit *N*-Hydroxyphthalimid in einer Phasen-Transfer-Katalyse das entsprechende Phthalimid **38** erzeugt.<sup>[184,185]</sup> Zur Abspaltung der Schutzgruppe wurde Ethanolamin anstelle des toxischen, krebserzeugenden Methylhydrazin verwendet. Der Wechsel des Reagenzes führte zwar zu einer leichten Reduktion der Ausbeute (50% statt 67%), wurde jedoch zugunsten der Toxizitätsminderung akzeptiert. Die Reduktion der Ausbeute liegt in der höheren Basizität des Ethanolamins ( $\text{pK}_{\text{a}}(\text{Ethanolamin}) = 9,50^{[186]}$ ;  $\text{pK}_{\text{a}}(\text{Methylhydrazin}) = 7,87^{[187]}$ ) begründet, was zu frühzeitiger, basischer Verseifung der Acetyl-Gruppen führt. Eine Reaktionszeit von 25 Minuten wurde in Anlehnung an Schade nicht überschritten um diese Abspaltung zu reduzieren<sup>[128]</sup>. Es war wichtig das Bromid als  $\alpha$ -Anomer einzusetzen, um zur gewünschten  $\beta$ -Form zu gelangen. Nur diese wird von den  $\beta$ -Galaktosidasen als Substrat akzeptiert.<sup>[188]</sup>



**Abbildung 3.15:** Synthese von 1-Aminoxy-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galaktopyranose (**35**). a) *N*-Hydroxyphthalimid, TBAHS, DCM/1 M NaOH (1:1), 4 h, RT, 58% (Lit.: 55-80%); b) Ethanolamin, EtOH, 25 min, RT, 50%.

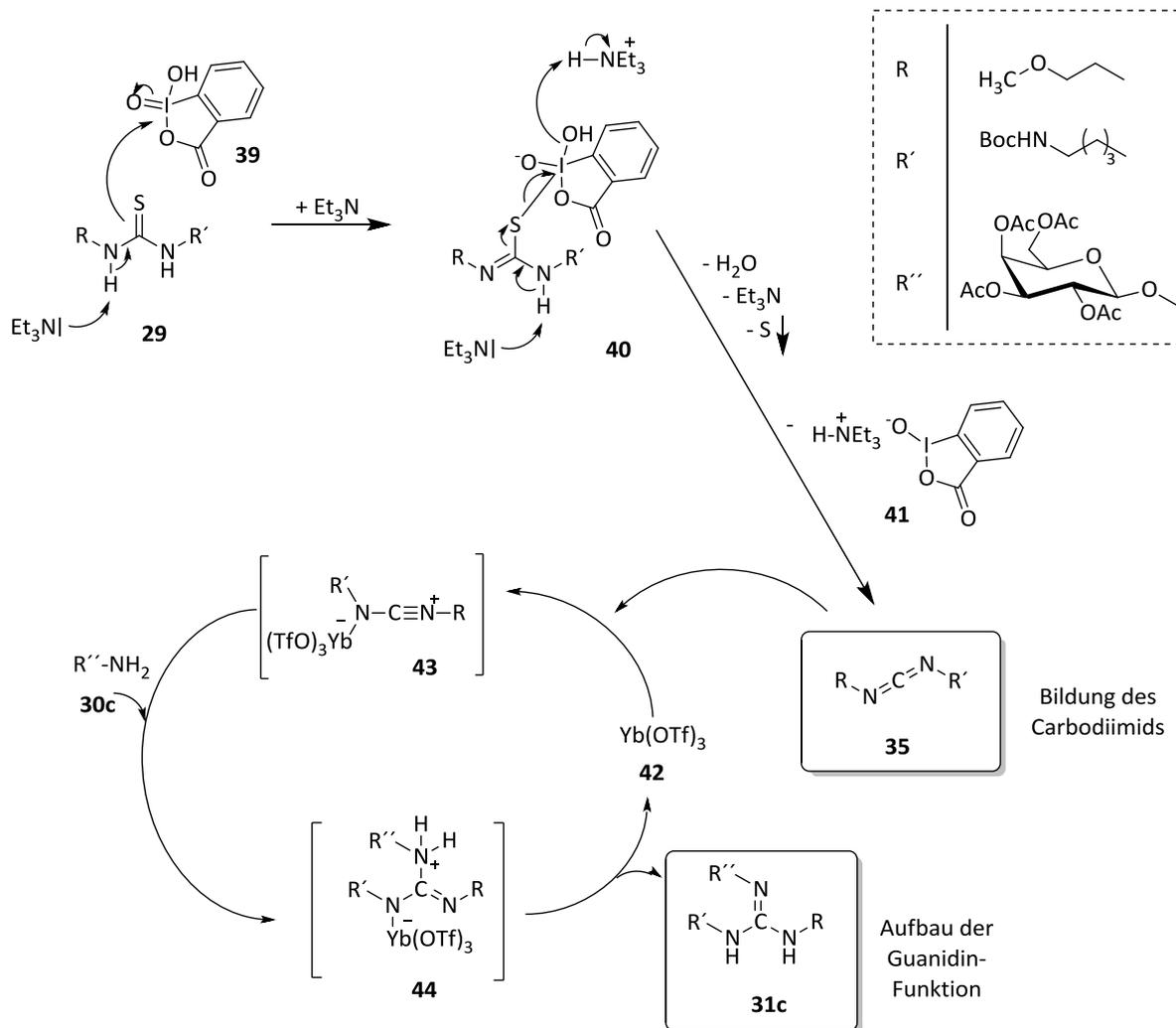
Die darauffolgende Synthese von **36c** gestaltete sich als erfolglos. Es wurden die gleichen Verfahren wie für **36b** (s. Abb. 3.16) einschließlich weiterer Variationen in Lösungsmittel, Reaktionszeit und Temperatur angewendet, jedoch konnte auf keine Weise das Produkt erhalten werden. Über DC- und massenspektrometrische Kontrolle konnte nur die Zersetzung bzw. Oxidation des Edukts **30c** festgestellt werden.

Die Hydroxyguanidine **32a,b** wurden nach dem in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Vorgehen in Anlehnung an Linton *et al.* synthetisiert.<sup>[168]</sup> Für einen mit **36a** vergleichbaren Thioharnstoff mit *O*-THP-Schutzgruppe wurde von Martin *et al.* ein Amin-Austausch zum korrespondierenden Thioharnstoff anstelle der Reaktion zum gewünschten Guanidin beschrieben.<sup>[169]</sup> Entgegen dieser Angaben konnte das Guanidin **31a** in guten Ausbeuten synthetisiert und diese Aussage widerlegt werden. Nach einer Säulenchromatographie über Kieselgel betrugen die Ausbeuten 87% für **31a** und 79% für **32b** an öliger Substanz. Die Abspaltung der Schutzgruppen wurde mit HCl(g) in Dioxan durchgeführt. Die resultierenden Verbindungen **32a,b** sind hygroskopische Hydrochloride und liegen in öliger Form vor. Verbindung **32a** wurde daraufhin auch als Sulfat hergestellt, da diese bei Hydroxyguanidinen weniger hygroskopisch als Chlorid-Salze sein sollen.<sup>[177]</sup> Alle Endverbindungen wurden aufgrund mangelhafter Stabilität bei -20°C gelagert. Die gesamte Synthese der Prodrugs **32a,b** ist in Abb. 3.16 zusammengefasst.



**Abbildung 3.16:** Darstellung der vollständigen Synthese der AbMEG-Prodrugs **32a,b**. a) 30a, Acetonitril, 5 h, Rückfluss, 85%; b) 30b, Dioxan/Diethylether, NaOH, RT, 3d, 55%; c) HCl (g), Dioxan, 30 min, 90%; d) H<sub>2</sub>O/Dioxan, konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3h, 89%.

Da die Synthese des Thioharnstoffs **36c** nicht gelang und das Galaktosyl-Prodrug **32c** auf diesem Wege nicht erhalten werden konnte, wurde nach alternativen Methoden gesucht. Da es sich bei der Zielverbindung um ein *N,N',N''*-substituiertes Guanidin handelt, fallen viele Alternativen zum Aufbau der Guanidin-Funktion (z.B. über aktivierte Thioharnstoffe oder Cyanamide) weg. Zhu *et al.* berichteten von einer katalysatorvermittelten Addition von Aminen an Carbodiimide. Bei dem Katalysator Ytterbium Triflat (Yb(OTf)<sub>3</sub>) handelt es sich um eine Lewis Säure aus der Gruppe der Lanthanoide (Ln). Die katalytische Aktivität nimmt mit Abnahme des Ln<sup>3+</sup>-Ionenradius zu.<sup>[189]</sup> Da diese Reaktion auch mit nichtaktivierten Carbodiimiden (Bsp.: *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid) ablaufen soll, war die Idee aus dem leicht zugänglichen Thioharnstoff **29** mit einer geeigneten Methode das korrespondierende Carbodiimid **35** zu erzeugen. Chaudhari *et al.* publizierten eine Entschwefelungsmethode mit 2-Iodoxybenzoesäure (IBX, **39**). Die Reaktion verläuft in Gegenwart von Triethylamin (TEA) bei 0°C in Dichlormethan und liefert Ausbeuten von 85-92% nach bereits zehn Minuten.<sup>[190]</sup> Nichtaktivierte Thioharnstoffe bedurften längerer Reaktionszeiten und Raumtemperatur für eine erfolgreiche Umsetzung. Als Beispiel ist 1,3-Dicyclohexylthioharnstoff mit einer Ausbeute von 45% bei 120 Minuten Reaktionszeit angegeben. Der kombinierte Mechanismus der Bildung des Diimids und Weiterreaktion zum Guanidin ist in Abb. 3.17 am Beispiel des Thioharnstoffs **29** gezeigt.



**Abbildung 3.17:** Postulierter Mechanismus der Entschwefelung durch IBX am Beispiel von Thioharnstoff **29** und der Weiterreaktion des Carbodiimids **35** in Gegenwart von Yb(OTf)<sub>3</sub>. Abbildung modifiziert in Anlehnung an die Literatur <sup>[189,190]</sup>

Der postulierte Mechanismus verläuft wie folgt: Der Thioharnstoff **29** wird durch TEA an einem der Stickstoffe deprotoniert, woraufhin der Schwefel am Iod-Atom des IBX (**39**) angreift. Es kommt zur Ausbildung einer kovalenten Schwefel-Iod-Bindung (**40**). Durch Abspaltung des zweiten Stickstoff-Protons wird die Bindung zum Schwefel-Atom gelöst, freigewordener Schwefel präzipitiert und es kommt zur Bildung des Carbodiimids **35**. Der Katalysator (Yb(OTf)<sub>3</sub>, **42**) bildet mit dem Carbodiimid **35** einen aktivierten Komplex, der vom Amin **30c** nucleophil angegriffen werden kann. Vermittelt durch einen intramolekularen Protonentransfer werden Guanidin **31c** und Katalysator **42** freigesetzt.

Da es sich bei **29** um einen nichtaktivierten Thioharnstoff handelt, wurden längere Reaktionszeiten und Raumtemperatur gewählt. Als keine Umsetzung erkennbar war, wurde das in der Literatur gewählte Verhältnis von 1:1:2 für Thioharnstoff/IBX/TEA zugunsten des

IBX erhöht. Doch auch dadurch konnte keine Carbodiimid-Bildung **35** beobachtet werden. Ein Wechsel zu anderen Lösungsmitteln (Tetrahydrofuran, Acetonitril und Dimethylformamid), die auch in der Literatur angegeben sind, führte ebenfalls zu nicht detektierbaren Umsetzungen. Ein großes Problem stellt die schlechte Löslichkeit des IBX in den meisten Lösungsmitteln dar. In einem Review von Duschek und Kirsch [2011] wird nur DMSO als akzeptables Lösungsmittel bei Raumtemperatur angegeben, woraufhin auch dieses erfolglos getestet wurde.<sup>[191]</sup> Eine weitere Verlängerung der Reaktionszeit sowie Temperaturerhöhungen führten zu einer Gelbfärbung des Reaktionsansatzes, was auf gelösten Schwefel schließen lässt. Jedoch wurde durch DC- und massenspektroskopische Kontrolle ein nur sehr geringer Abbau des Thioharnstoffs **29** festgestellt. Eine Überprüfung der Reaktion anhand eines Modellversuchs mit dem aktivierten Thioharnstoff **23** und anschließender Yb(OTf)<sub>3</sub>-katalysierter Addition von *O*-Methylhydroxylamin (**30b**) führte zu starker Gelbfärbung der Lösung (Hinweis auf Schwefelfreisetzung). Das entsprechende Guanidin konnte mittels Massenspektrometrie detektiert werden. Somit ist belegt, dass die Strategie möglich, aber nicht auf Thioharnstoff **29** anzuwenden ist.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass die Prodrugs **32a** und **32b** erfolgreich synthetisiert werden konnten, aber für **32c** noch keine passende Strategie gefunden wurde.

### 3.4.3 Spektroskopische Analytik

#### 3.4.3.1 Einleitung

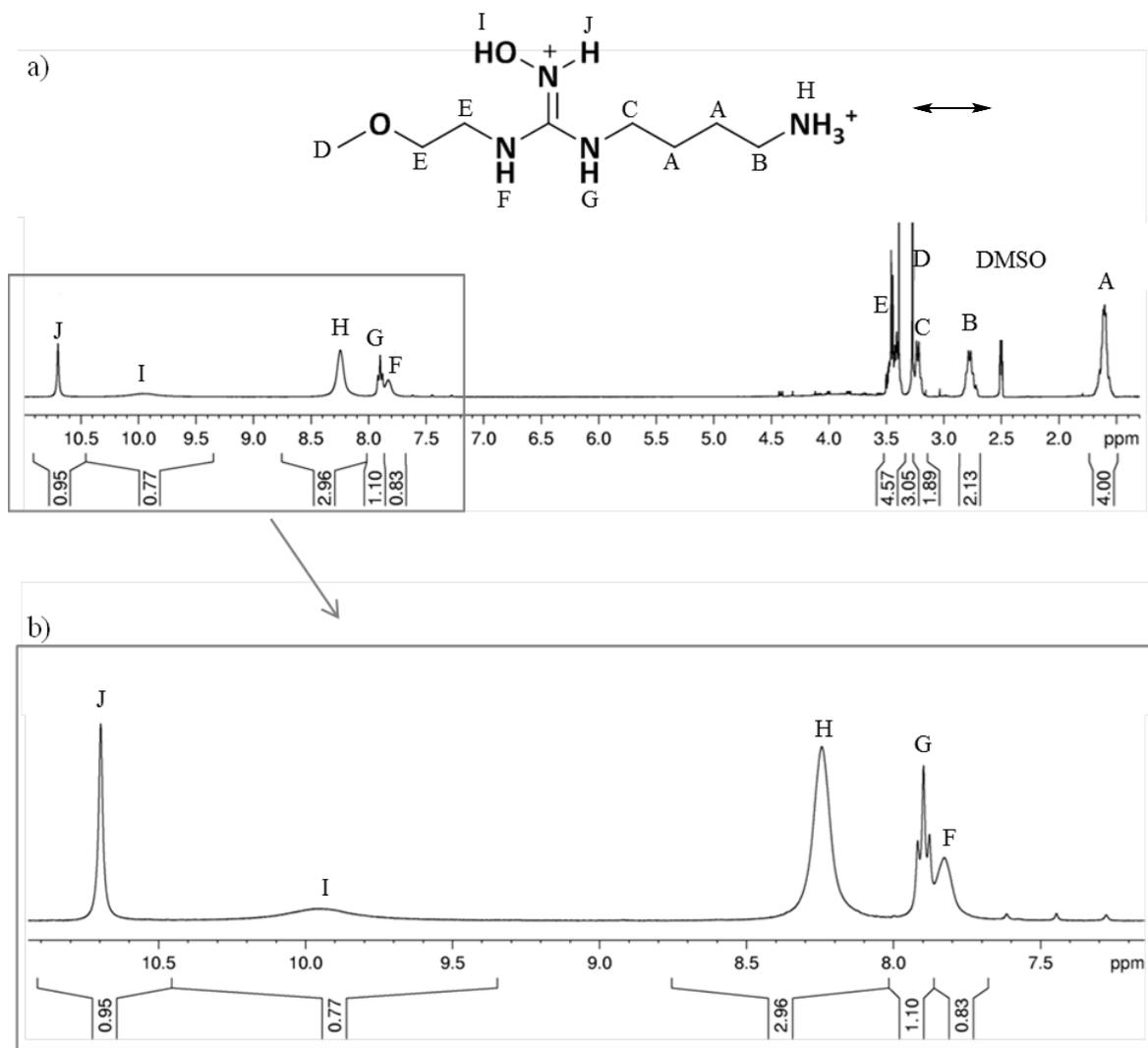
Zur Identifizierung und Strukturaufklärung wurden am Beispiel der Substanz **32a** Spektren der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ - Kerne gemessen. Um genauere Aussagen über den Protonierungs-Zustand der Stickstoff-Atome zu treffen, wurden zusätzlich  $^{15}\text{N}$ -Spektren gemessen.

Im Folgenden sind die NMR-Spektren der beiden unterschiedlichen Salze des *N*-OH-AbMEGs **32a** dargestellt. Das Hydrochlorid konnte in  $\text{DMSO-d}_6$  vermessen werden. Messungen bei der üblichen Temperatur von 300 K lieferten verbreiterte Signale sowohl im  $^1\text{H}$ - als auch im  $^{15}\text{N}$ -Spektrum. Diese Effekte sind besonders im paramagnetisch verschobenen Bereich zu beobachten. Ein Grund für dieses Phänomen könnten Aggregationseffekte der Guanidin-Protonen sein. Durch Erhöhung der Messtemperatur auf 323 K konnten eine bessere Aufspaltung und deutlichere Signale erzielt werden. Weitere Temperaturerhöhungen ergaben keine Unterschiede mehr.

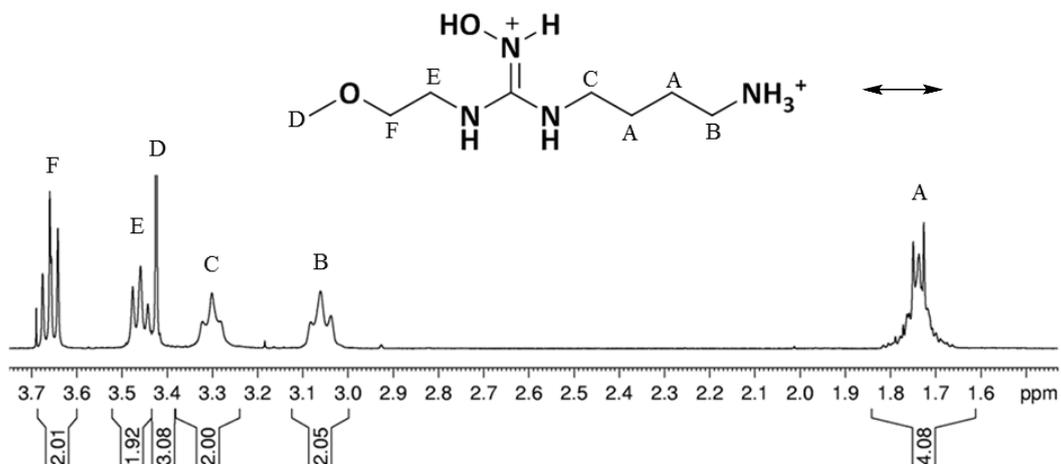
Aufgrund einer sehr schlechten  $\text{DMSO}$ -Löslichkeit musste das Sulfat in  $\text{D}_2\text{O}$  vermessen werden, weshalb die austauschbaren Protonen nicht erfasst werden konnten. Auf die Aufnahme eines  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrums wurde deshalb verzichtet.

#### 3.4.3.2 $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum

Dargestellt sind die Spektren beider Salze. Das Spektrum des Hydrochlorids in  $\text{DMSO-d}_6$  soll die Protonierung im paramagnetischen Bereich zeigen, das des Sulfats in  $\text{D}_2\text{O}$  ist besser geeignet zur Darstellung des diamagnetischen Bereichs, welcher in  $\text{DMSO-d}_6$  unzureichend aufgelöst ist und besonders der 2-Methoxyethyl-Rest der Verbindung nicht eindeutig belegt werden kann. Die chemischen Verschiebungen sind auf das Restlösungsmittelsignal bezogen. Die strukturelle Zuordnung der Signale erfolgte unter Zuhilfenahme eines 2D-Korrelationspektrums ( $\text{H,H-COSY}$ ).



**Abbildung 3.18:** a) *N*-OH-AbMEG Hydrochlorid (**32a**) in DMSO- $d_6$  bei 323 K. b) Vergrößerte Ansicht des paramagnetischen Bereichs von a) mit den austauschbaren Protonen



**Abbildung 3.19:** *N*-OH-AbMEG Sulfat (**32a**) in  $D_2O$

### 3.4.3.3 $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum

Dargestellt ist das Spektrum des Sulfats in  $\text{D}_2\text{O}$ . Alle Signale sind bezogen auf den internen Standard Natrium 4,4-Dimethyl-4-sila-pentansulfonat (DSS). Beim Spektrum des Hydrochlorids erfolgt eine Überlagerung von drei Signalen mit dem Restlösungsmittelsignal des DMSO. Da sich beide Spektren nicht wesentlich unterscheiden, wurde auf die zweite Darstellung verzichtet. Die strukturelle Zuordnung der Signale erfolgte unter Zuhilfenahme eines 2D-Korrelationspektrums (HSQC).

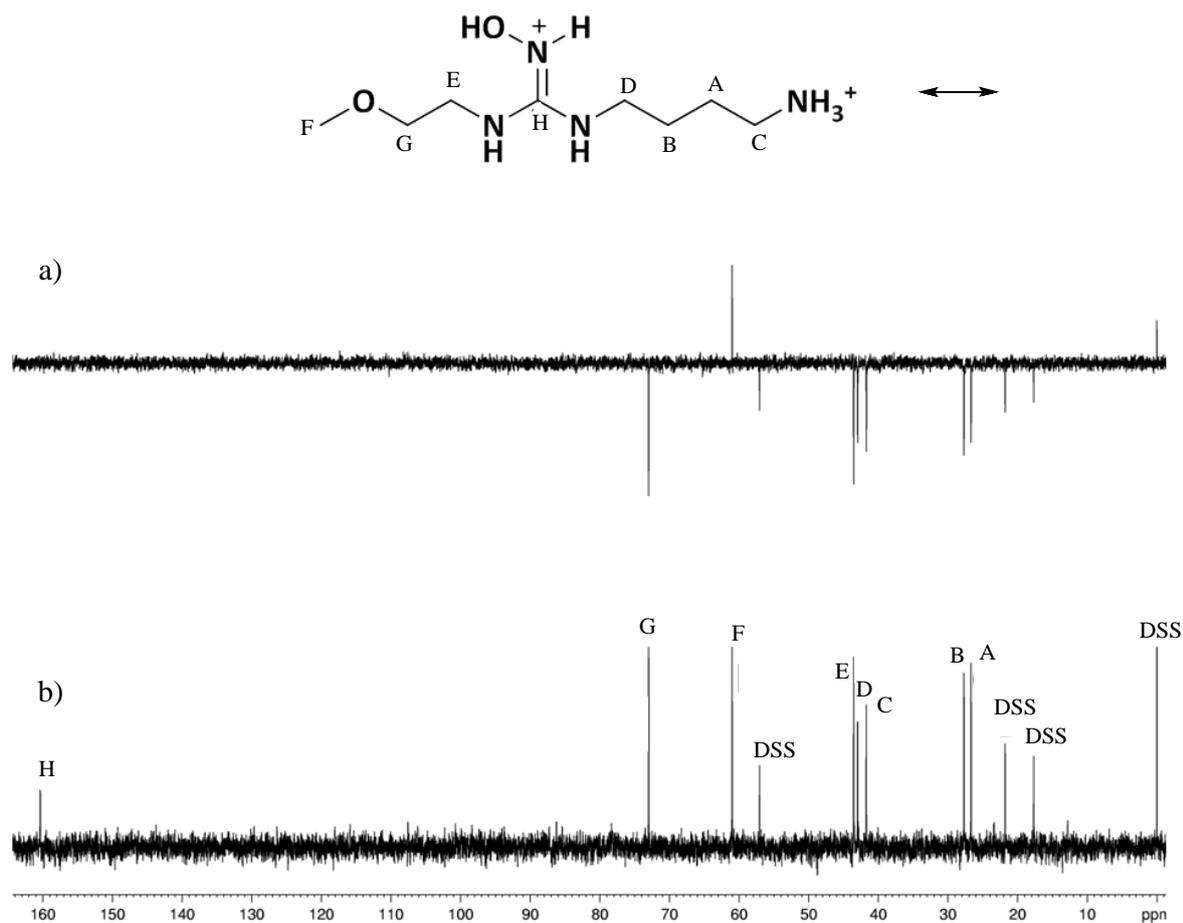


Abbildung 3.20: a) DEPT-135 und b)  $^{13}\text{C}$  entkoppelt

### 3.4.3.4 $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum

Für die  $^{15}\text{N}$ -Spektren wurde Nitromethan als externer Standard verwendet. Um auf die Ammoniak-Skala umzurechnen muss der Differenz-Betrag 380,2 der chemischen Verschiebung des Nitromethans addiert werden.

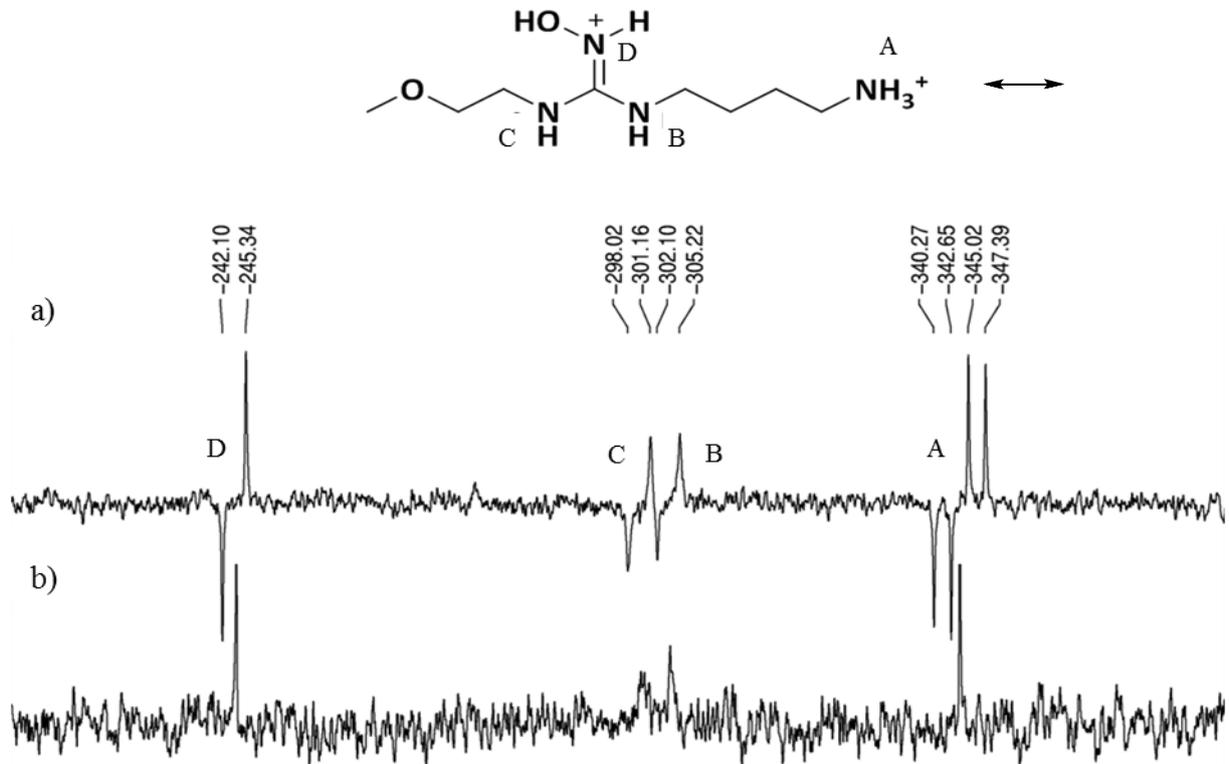


Abbildung 3.21: a)  $^{15}\text{N}$ -INEPT und b)  $^{15}\text{N}$  [ $^1\text{H}$ ]-entkoppelt, 323 K

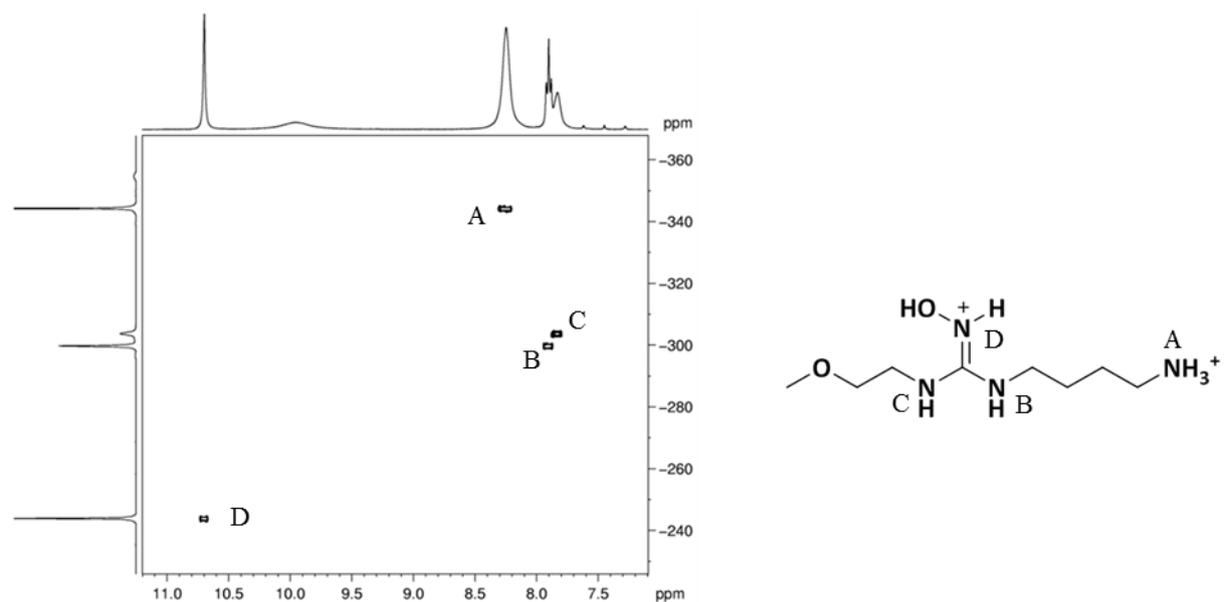
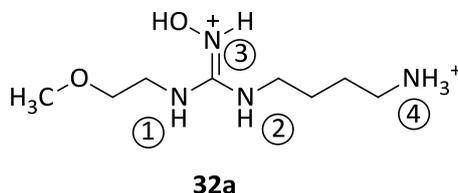


Abbildung 3.22:  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -Cosy bei 323K, hohe Auflösung

### 3.4.3.5 Auswertung und Diskussion

Die Auswertung der NMR-Spektren lässt darauf schließen, dass die Substanz wie in der vorgeschlagenen Struktur am N3-Stickstoff protoniert vorliegt:



Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum weist bereits auf die postulierte Protonierung hin, da dort im paramagnetischen Bereich vier Signale mit einem Integral von jeweils einem H-Atom und ein Signal mit einem Integral von drei H-Atomen vorliegen. Leider sind diese größtenteils verbreitert und nur eins wird entsprechend der Multiplizität aufgespalten. Ein genauerer Aufschluss ergibt sich durch die Analyse der  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren.

Die Protonierung erfolgt ausschließlich am doppelt-gebundenen Stickstoff der oximartigen Struktur, was dadurch belegt wird, dass nur drei Dubletts und ein Quartett (für das protonierte primäre Amin N4) im  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum zu erkennen sind. Auch weisen die Kopplungskonstanten der Stickstoffe N1 bis N3, die im Bereich zwischen 95 und 100 Hz liegen, auf eine  $\text{sp}^2$ -Hybridisierung der drei Stickstoffe hin. Läge eine Protonierung an N1 oder N2 vor, so müssten ein Dublett, ein Triplet und das Quartett im Spektrum zu sehen sein. Die Kopplungskonstante des Triplets müsste bei 70 Hz liegen und damit im Bereich der  $\text{sp}^3$ -hybridisierten Amin-Stickstoffe.<sup>[192]</sup>

Durch die spektroskopische Analyse können zwei Sachverhalte bewiesen werden. Erstens liegt die Verbindung in der oximartigen Struktur vor und zweitens erfolgt die Protonierung am „Oxim-Stickstoff“. Diese Daten liegen in Übereinstimmung mit vorherigen beschriebenen Strukturaufklärungen von Hydroxyguanidinen.<sup>[192]</sup>

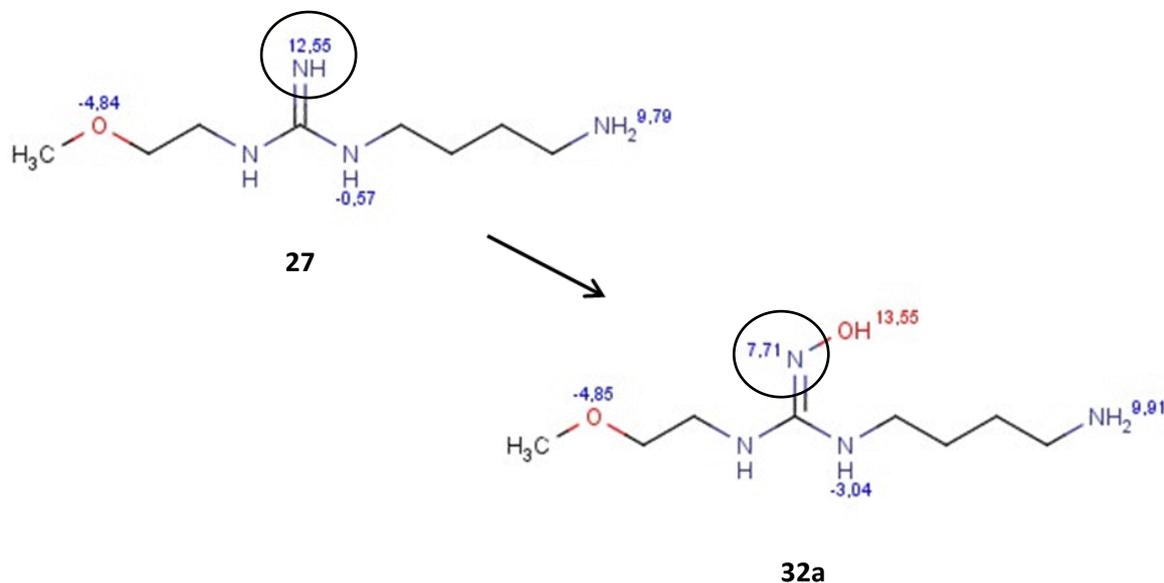
### 3.4.4 Physikochemische Eigenschaften

#### 3.4.4.1 Einleitung

Eine Beurteilung der angewandten Prodrug-Konzepte für AbMEG (**27**) soll anhand verschiedener physikochemischer Parameter erfolgen. Mittels errechneter  $pK_a$ -Werte soll die Reduktion der Basizität von Guanidin zum Hydroxyguanidin belegt werden. Darüber lässt sich die Verteilung der unterschiedlich protonierten Zustände (*microspecies distribution*) der Verbindungen ermitteln. Weiterhin soll auf die von Lipinski aufgestellte „rule of five“, sowie auf die ermittelte hydrolytische Stabilität der Verbindungen eingegangen werden.

#### 3.4.4.2 Berechnung der $pK_a$ -Werte

Dargestellt in Abb. 3.23 sind die mit dem MarvinSketch Calculator Plugin<sup>[193]</sup> berechneten  $pK_a$ -Werte für das Guanidin AbMEG (**27**) und dessen Hydroxyguanidin-Prodrug **32a**. Der Abfall der Basizität vom Guanidin zum Hydroxyguanidin wird dadurch deutlich, dass der Iminostickstoff im Guanidin einen  $pK_a$ -Wert von 12,55 aufweist und der im Hydroxyguanidin bei 7,71 liegt. Die  $pK_a$ -Wert-Berechnung des *O*-Methyl-Prodrugs deckt sich mit den Werten des nichtsubstituierten Hydroxyguanidins und wird deshalb nicht separat aufgeführt.



**Abbildung 3.23:** Mit MarvinSketch berechnete  $pK_a$ -Werte der Verbindungen **27** und **32a**. Kennzeichnung der Verschiebung des Iminostickstoffes vom Guanidin zum Hydroxyguanidin.<sup>[193]</sup>

Zusätzlich wurden  $pK_a$ -Werte mit einem zweiten Programm, der Schrödinger Software Jaguar, erzeugt.<sup>[194]</sup> Die berechneten Werte sind in Tab. 3.6 aufgeführt. Zum Vergleich wurden auch für andere Guanidine bzw. Hydroxyguanidine Berechnungen durchgeführt und die Ergebnisse zusammen mit empirisch ermittelten Daten in Tab. 3.7 dargestellt. Es konnte

dabei gezeigt werden, dass die mit MarvinSketch berechneten Werte gut mit den empirisch ermittelten Daten übereinstimmen und somit als Grundlage für weitere Analysen genutzt werden können. MarvinSketch liefert im Fall der Hydroxyguanidin-Funktion zu den empirischen Daten passendere Werte als Jaguar. Die Berechnungen mit MarvinSketch basieren auf empirisch berechneten physikochemischen Parametern, während Jaguar die  $pK_a$ -Werte quantenmechanisch berechnet. Die aus der Literatur entnommenen empirischen Daten sind potentiometrisch bestimmt worden.<sup>[195–197]</sup>

**Tabelle 3.6:**  $pK_a$ -Werte der Guanidin-Funktion der Verbindungen **27** und **32a** berechnet über verschiedene Methoden.

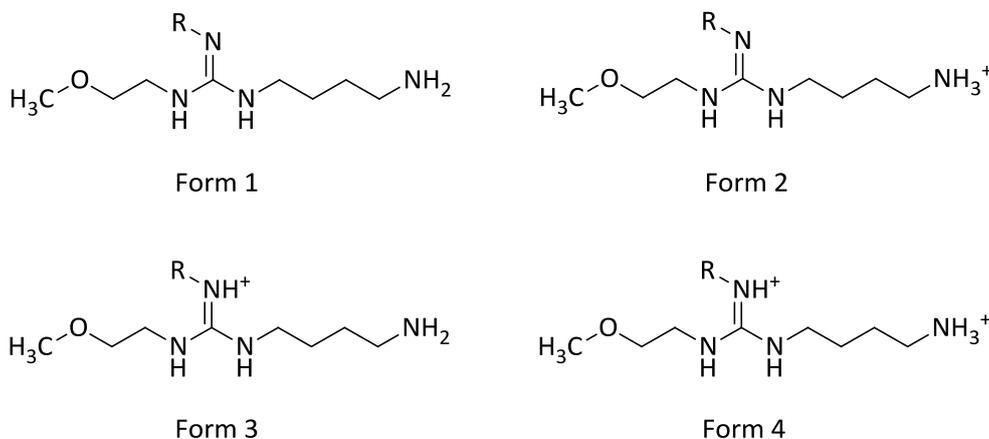
Verbindung	MarvinSketch	Jaguar
<b>27</b>	12,55	12,3
<b>32a</b>	7,71	10,0

**Tabelle 3.7:** Vergleich von experimentell-bestimmten mit berechneten  $pK_a$ -Werten verschiedener Guanidine.

Verbindung	MarvinSketch	empirisch
Guanidin	12,55	12,56 <sup>[196]</sup> , 13,6 <sup>[195]</sup>
<i>N</i> -Methyl-Guanidin	12,78	13,4 <sup>[195]</sup>
<i>N,N'</i> -Dimethyl-Guanidin	13,01	13,6 <sup>[195]</sup>
Hydroxyguanidin	7,64	7,96 <sup>[197]</sup>
Arginin	12,41	12,66 <sup>[196]</sup>
<i>N</i> <sup>0</sup> -Hydroxyarginin	7,46	n. b.

### 3.4.4.3 Berechnung der Protonierungs-Zustände (*microspecies distribution*)

Mit dem MarvinSketch Calculator Plugin<sup>[193]</sup> konnte auch die Verteilung der Protonierungszustände der Verbindungen **27**, **32a** und **32b** bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt werden. Eine Übersicht ist in Tab. 3.8 gegeben. Für die Möglichkeit zur oralen Applikation sollte möglichst viel der Substanz in deprotonierter Form vorliegen, damit eine passive Diffusion durch die Lipid-Doppelschichten der Darmzellen möglich ist. Form 1, die vollständig deprotonierte Substanz, liegt im Fall von AbMEG (**27**) im pH-Bereich von 7,4-9,0 nicht vor. Die Werte für die Prodrugs **32a,b** sind nahezu identisch und steigen pH-abhängig von 0,09% auf 10,54%. Einen besonders hohen Anteil nimmt in diesem pH-Bereich auch Form 2, bei der nur das primäre Amin protoniert ist, mit 27,75-84,53% ein. Beim AbMEG (**27**) tendiert dieser Anteil gegen 0%. Die Guanidin-Funktion liegt immer protoniert vor. Im Darm, der stellenweise ein schwach alkalisches Milieu aufweist, liegt somit zwar nur ein kleiner Prozentsatz nicht protoniert vor, doch kann dieser durch passive Diffusion absorbiert werden. Im Zuge der resultierenden Gleichgewichtseinstellung würde weitere, nicht protonierte Substanz gebildet werden, die wiederum absorbiert werden kann.



**Abbildung 3.24:** Mögliche Protonierungszustände der Verbindungen **27**, **32a,b**.

**Tabelle 3.8:** Übersicht über die prozentuale Verteilung der unterschiedlich protonierten Formen der Verbindungen **27**, **32a** und **32b** bei verschiedenen pH-Werten

<b>27</b>				
pH	Form 1 / %	Form 2 / %	Form 3 / %	Form 4 / %
7,4	0,00	0,00	0,41	99,59
8,2	0,00	0,01	2,50	97,59
9,0	0,00	0,03	13,94	86,03
<b>32a</b>				
pH	Form 1 / %	Form 2 / %	Form 3 / %	Form 4 / %
7,4	0,10	32,63	0,21	67,05
8,2	1,46	73,96	0,48	24,09
9,0	10,54	84,53	0,54	4,36
<b>32b</b>				
pH	Form 1 / %	Form 2 / %	Form 3 / %	Form 4 / %
7,4	0,09	27,75	0,23	71,93
8,2	1,37	69,51	0,56	28,55
9,0	10,41	83,48	0,68	5,43

Legende: Form 1: deprotoniert; Form 2: nur am Amin protoniert; Form 3: nur am Guanidin protoniert, Form 4: sowohl am Amin als auch am Guanidin protoniert.

#### 3.4.4.4 Lipinski's Rule of Five

Die von Christopher Lipinski 1997 aufgestellte *rule of five* ist eine Faustregel für die orale Verfügbarkeit chemischer Verbindungen und findet u. a. Anwendung in der Arzneistoffentwicklung. Folgende Bedingungen müssen erfüllt sein, damit die Substanz eine gute orale Bioverfügbarkeit aufweist, wenn die Substanz nur über Diffusion aufgenommen wird:<sup>[198]</sup>

- Nicht mehr als fünf Wasserstoff-Brücken-Donatoren (z. B. OH- oder NH-Gruppen)
- Nicht mehr als zehn Wasserstoff-Brücken-Akzeptoren (z. B. O- oder N-Atome)
- Ein Molekulargewicht  $\leq 500$  g/mol
- Einen Verteilungskoeffizienten ( $\log P$ ) zwischen Oktanol und Wasser  $\leq 5$

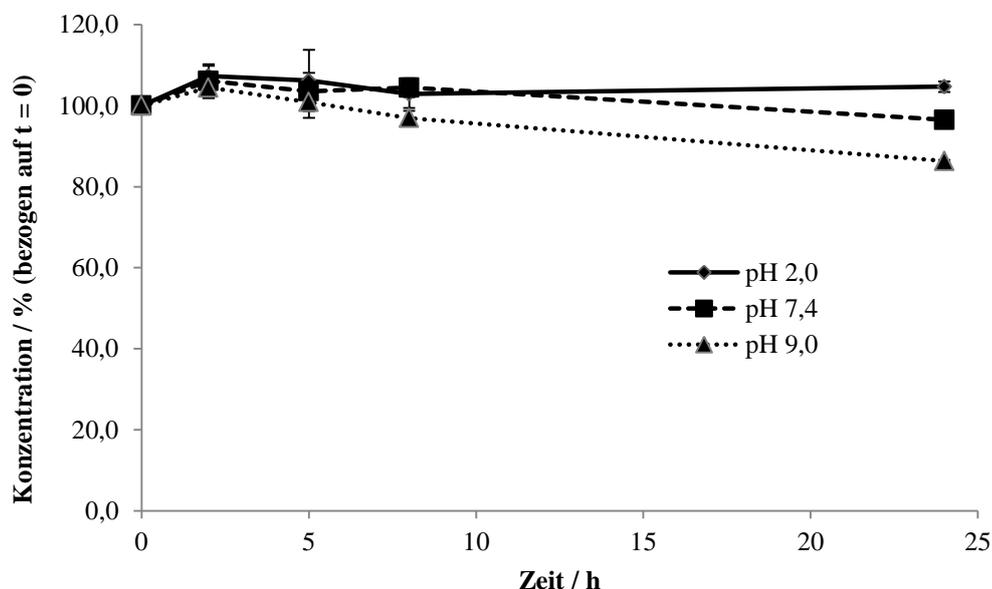
Die für AbMEG (**27**) und dessen Prodrugs **32a,b** mit dem MarvinSketch Calculator Plugin<sup>[193]</sup> ermittelten Werte sind in Tab. 3.9 zusammengefasst und beziehen sich auf die komplett unprotonierten Formen. Da diese für AbMEG (**27**) bei physiologischen pH-Werten nicht vorliegt, dienen dessen Werte nur zum Vergleich. Alle drei Substanzen sind in den geforderten vier Punkten regelkonform. Der  $\log P$ -Wert ist an dieser Stelle der interessanteste Parameter, da er die Lipophilie-Unterschiede der Verbindungen **32a** und **32b** aufzeigt. Je größer der  $\log P$ , desto höher ist die Lipophilie und desto besser ist die passive Diffusion durch Biomembranen. Die Obergrenze von fünf ist bedingt durch eine unzureichende Löslichkeit im wässrigen Medium. Der Unterschied des  $\log P$ -Wertes von -0,95 des Hydroxy-Prodrugs **32a** zu dem von -0,57 des *O*-Methyl-Prodrugs **32b** lässt vermuten, dass **32b** besser durch passive Diffusion absorbiert werden kann als **32a**.

**Tabelle 3.9:** Lipinski's rule of five für die freien Basen der Verbindungen, berechnet mit MarvinSketch.

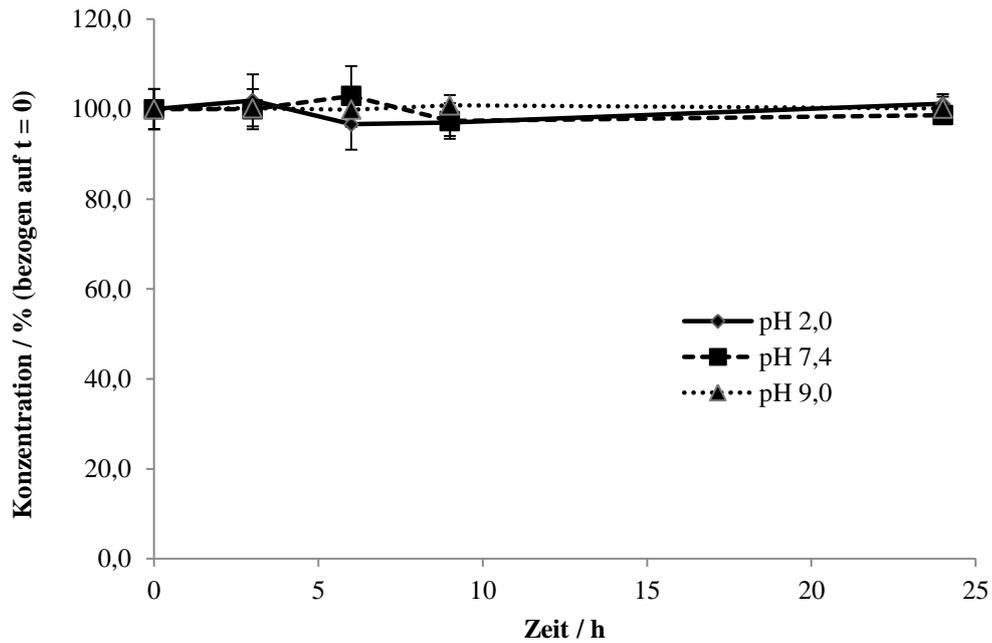
Verbindung	H-Donatoren	H-Akzeptoren	$\log P$	Molekulargewicht
<b>27</b>	4	5	-0,95	188
<b>32a</b>	4	6	-0,95	204
<b>32b</b>	3	6	-0,57	218

### 3.4.4.5 pH-Wert-abhängige hydrolytische Stabilität

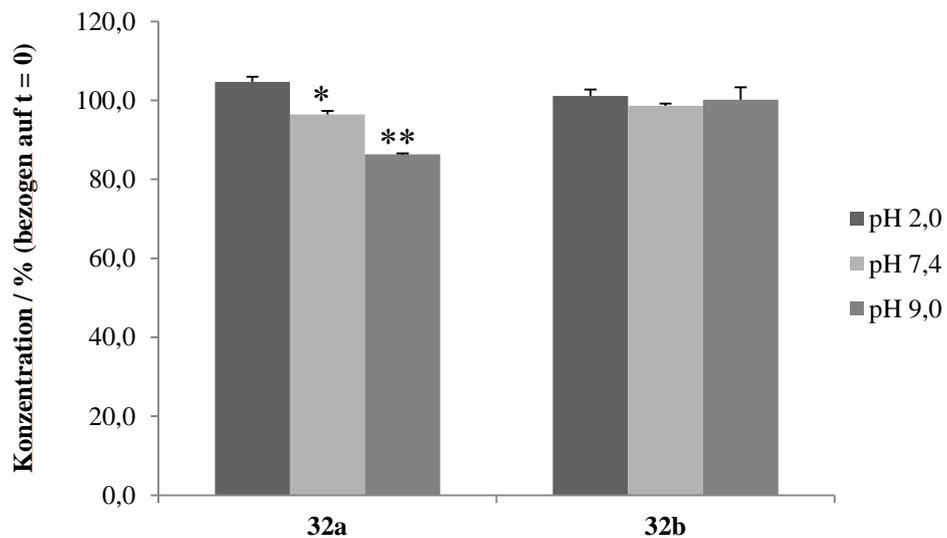
Die hydrolytische Stabilität der Verbindungen **32a** und **32b** wurde pH-Wert-abhängig überprüft, um zu zeigen, dass die Substanzen in ausreichendem Maß stabil gegenüber den unterschiedlichen pH-Bereichen im GIT sind. Getestet wurde bei pH 2,0, pH 7,4 und pH 9,0 in 10 mM Kaliumphosphatpuffer über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 37°C nach einer in Kap. 6.3.2.2 beschriebenen Methode. Das Diagramm in Abb. 3.25 zeigt die Konzentrationsabnahme der Substanz bezogen auf den Zeitpunkt  $t = 0$ . Insgesamt ist für Verbindung **32a** eine gute Stabilität gegeben. Bei pH 2,0 kommt es zu keiner Zersetzung, bei pH 7,4 nur geringfügig (96,5% nach 24 h) und auch bei pH 9,0 ist die Substanz weitestgehend stabil (86,3% nach 24 h). Durch Extrapolation der Werte bei pH 9,0 würde sich eine Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 75$  Stunden ergeben. Ein Vergleich der Unterschiede in der Substanzabnahme bei den unterschiedlichen pH-Werten ist in Abb. 3.27 gezeigt. Für Verbindung **32b** kann über den gesamten Zeitraum von 24 Stunden bei allen pH-Werten eine gute Stabilität gezeigt werden. Der gemessene Gehalt liegt zwischen 98 und 102%, was auf Schwankungen der Methode zurückzuführen ist. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte nicht festgestellt werden (Student's t-Test). Es erfolgt keine Zersetzung der Verbindung (s. Abb. 3.26, 3.27).



**Abbildung 3.25:** Hydrolytische Stabilität der Verbindung **32a**. Die gezeigten Daten sind  $MW \pm SD$  aus drei separaten Messungen. Die Versuche wurden wie in Kapitel 6.3.2.2 beschrieben durchgeführt.



**Abbildung 3.26:** Hydrolytische Stabilität der Verbindung **32b**. Die gezeigten Daten sind MW  $\pm$  SD aus drei separaten Messungen. Die Versuche wurden wie in Kapitel 6.3.2.2 beschrieben durchgeführt.



**Abbildung 3.27:** Vergleich der Hydrolytischen Stabilität der beiden Prodrugs **32a,b** nach 24 Stunden bei 37°C. \*statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu pH 2,0 (P = 0,006, Student's t-Test); \*\*statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu pH 7,4 (P = <0,001, Student's t-Test).

#### 3.4.4.6 Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass ein Austausch der Guanidin-Funktion gegen eine Hydroxyguanidin-Funktion zu einer Reduktion des  $pK_a$ -Wertes führt. Damit einher geht eine Erhöhung des unprotonierten Anteils der Verbindung in leicht alkalischer, wässriger Lösung. Dieses Ergebnis deckt sich mit experimentell bestimmter Daten ( $pK_a$ -Werte) verwandter Substanzen. Die Lipinski-Regeln werden alle erfüllt, allerdings ist der *clogP*-Wert relativ niedrig. Durch Einführung einer Methylgruppe an der Hydroxyfunktion konnte eine leichte Steigerung des *clogP*-Wertes und somit der Lipophilie der freien Base erreicht werden, was zusätzlich zu einer verbesserten Absorption durch passive Diffusion führt. Ein Nachteil dieser Modifikation ist jedoch die benötigte Bioaktivierung durch eine CYP450-abhängige *O*-Desalkylierungs-Reaktion. Dies kann zu unerwünschten Arzneimittelinteraktionen führen, da eine Vielzahl an zugelassenen Arzneistoffen über CYP450 metabolisiert wird.

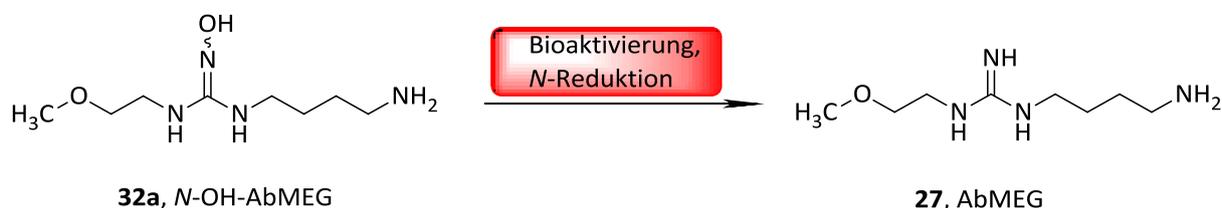
Für beide Prodrugs **32a,b** konnte eine gute pH-abhängige, hydrolytische Stabilität über einen Zeitraum von 24 Stunden gezeigt werden. Entgegen einiger älterer Studien mit anderen Hydroxyguanidinen ist das nichtsubstituierte Hydroxyguanidin unerwartet stabil gegenüber hydrolytischen Einflüssen. Diese Eigenschaft unterstreicht auch die Einsetzbarkeit des freien Hydroxyguanidins **32a** als mögliches Prodrug.

### 3.4.5 Untersuchungen zur Bioaktivierung des Hydroxyguanidins 32a

#### 3.4.5.1 Einleitung und Zielsetzung

Im folgenden Abschnitt wird die Untersuchung der Bioaktivierung des Prodrugs *N*-OH-AbMEG (**32a**) durch isolierte porcine Lebersubfraktionen und das rekombinante mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente (mARC)-haltige Enzymsystem beschrieben.<sup>[199]</sup> Es soll belegt werden, dass das Hydroxyguanidin zur aktiven Wirkform AbMEG metabolisiert wird.

Hintergrund zu der Annahme ist, dass viele Hydroxyamidine und –guanidine durch das *N*-reduktive Enzymsystem mARC, Cytochrom b5 und Cytochrom b5-Reduktase reduziert werden<sup>[119,200]</sup>. In der Schweineleber konnte die Lokalisation dieses Enzymsystems auf der äußeren Mitochondrienmembran (*outer membrane vesicles*, OMV) bestimmt und durch spezielle Reinigungstechniken isoliert werden<sup>[200]</sup>. Im Gegensatz zum NADPH-abhängigen mikrosomalen CYP450-Enzymsystem<sup>[201]</sup> ist das mARC-haltige Enzymsystem NADH-abhängig. Aufgrund der literaturbekannten Umsetzung ähnlicher Verbindungen durch mARC (s. Kap. 3.4.1) wird vermutet, dass *N*-OH-AbMEG (**32a**) gut durch Mitochondrien und weniger durch mikrosomale Enzyme metabolisiert wird.

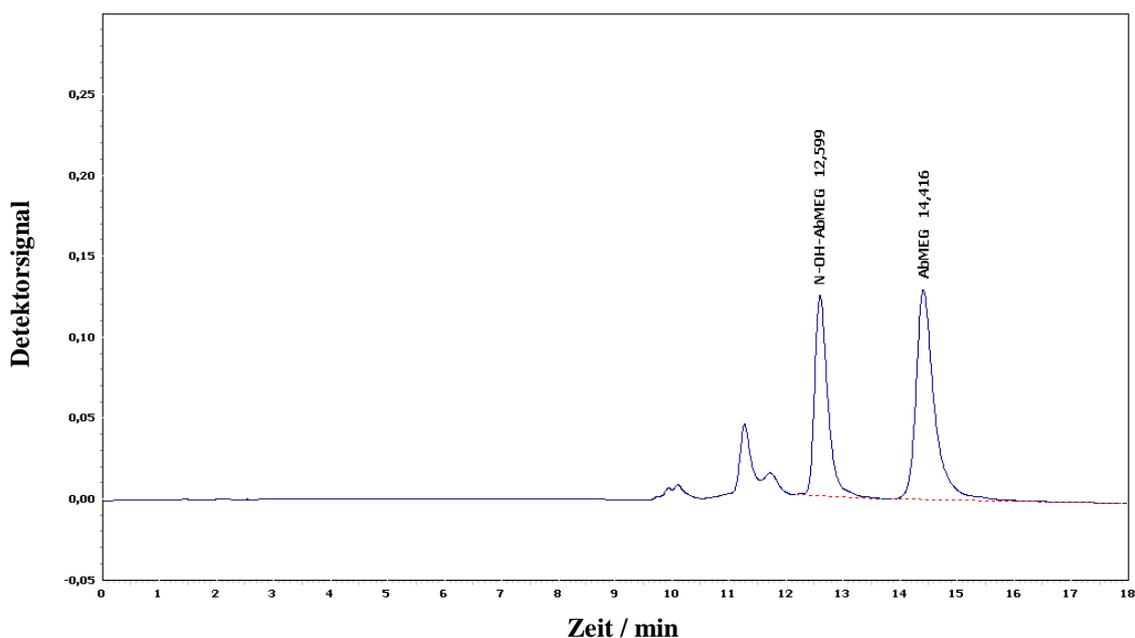


**Abbildung 3.28:** Bioaktivierung von *N*-OH-AbMEG (**32a**)

### 3.4.5.2 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.4.5.2.1 Kalibrierung und Wiederfindung

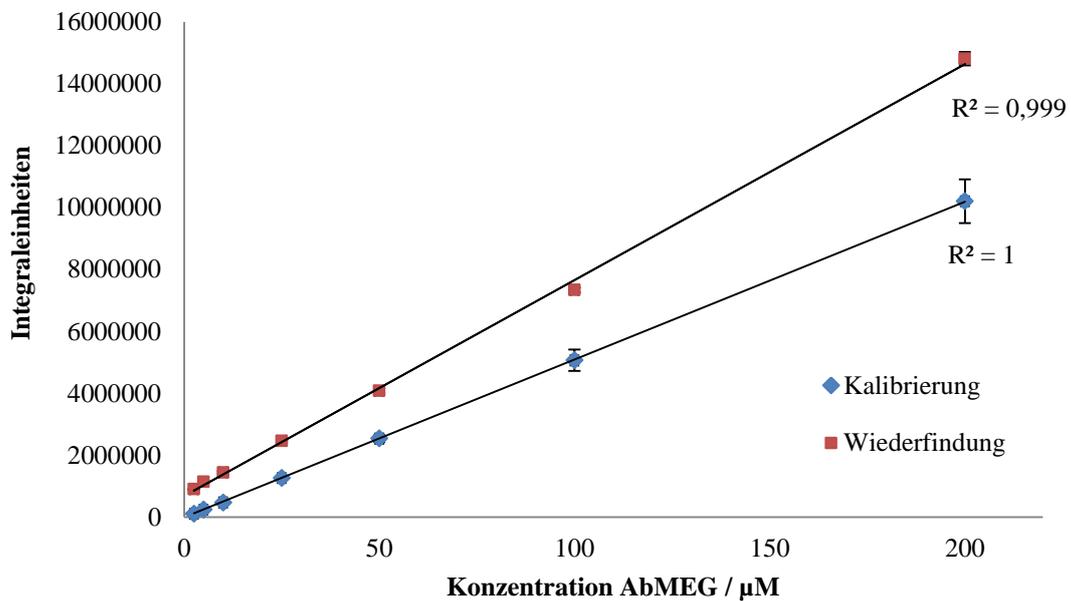
Die verwendeten HPLC-Methoden ermöglichen eine Trennung der strukturell ähnlichen Substanzen *N*-OH-AbMEG (**32a**) und AbMEG (**27**) nach einer Vorsäulenderivatisierung mit *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA)-Reagenz und Fluoreszenz-Detektion. Ein repräsentatives Chromatogramm für die HPLC-Methode aus Kap. 6.3.2.1 ist in Abb. 3.29 dargestellt.



**Abbildung 3.29:** Repräsentatives Chromatogramm der Standardsubstanzen. Die Signale zwischen 10 und 12 Minuten sind dem Derivatisierungsreagenz zuzuordnen, was durch Injektion von reinem Wasser belegt werden konnte. HPLC-Methode s. Kap. 6.3.2.1

Zur Kalibrierung wurde der Metabolit in 7 verschiedenen Konzentrationen (2,5–200  $\mu\text{M}$ ) in *Aqua bidest.* gelöst und mittels der in Kap. 6.3.2 beschriebenen HPLC-Analytik vermessen. Die Kalibriergeraden waren in den ermittelten Konzentrationsbereichen linear ( $R^2 = 1$ ). Die Richtigkeit für den ermittelten Bestimmungsbereich betrug  $97 \pm 4\%$ , wobei an der Bestimmungsgrenze (2,5  $\mu\text{M}$ ) die Richtigkeit 89% war. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde der Metabolit dem Inkubationsansatz mit hitzedenaturierten Mitochondrien (je 50  $\mu\text{g}$ ) den getesteten Konzentrationen zugesetzt. Die Inkubationsansätze wurden nach der in Kap. 6.3.2. beschriebenen Vorschrift aufgearbeitet und vermessen. Die Wiederfindung war im ermittelten Konzentrationsbereich linear ( $R^2 = 0,9999$ ). Die Wiederfindung, besonders bei niedrigen Konzentrationen (z.B. 2,5  $\mu\text{M}$  (711%)), zeigte ungewöhnlich hohe Werte, wahrscheinlich aufgrund unspezifischer Reaktionen der Proteine mit dem OPA-Reagenz. Die

Richtigkeit der Wiederfindung ergab einen Bestimmungsbereich von 10-200  $\mu\text{M}$  und betrug  $101 \pm 5 \%$ , an der Bestimmungsgrenze (10  $\mu\text{M}$ ) 109 % (s. Abb. 3.27)

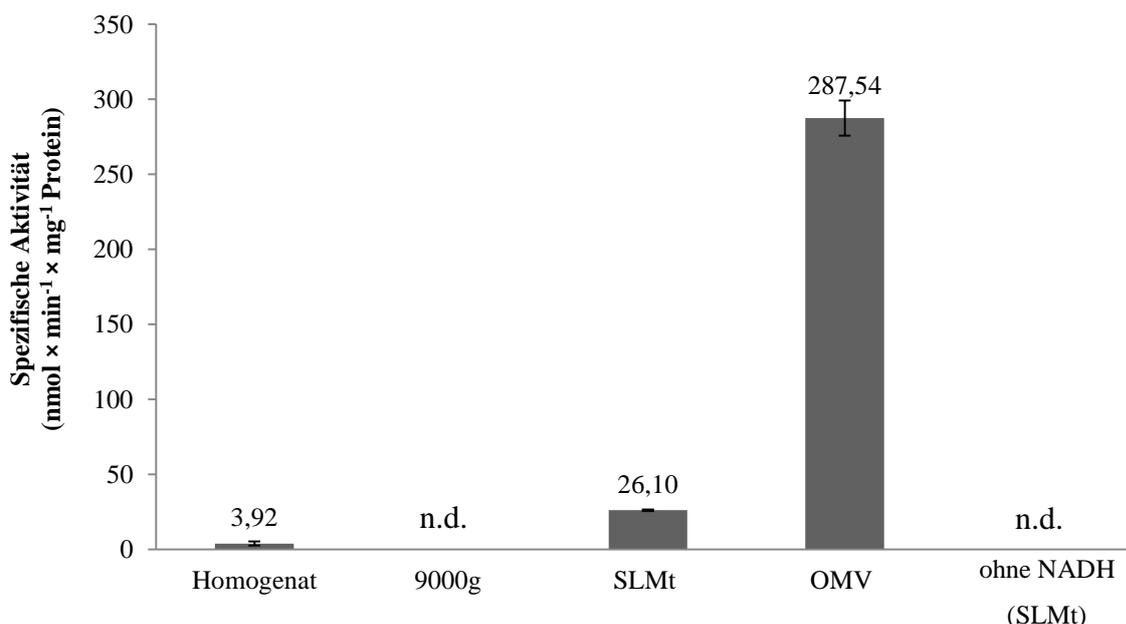


**Abbildung 3.30:** Repräsentative Kalibrierung und Wiederfindung für AbMEG (27). Die ermittelten Integraleinheiten sind  $\text{MW} \pm \text{SD}$  von drei separaten Ansätzen, die doppelt vermessen wurden.

### 3.4.5.2.2 *In vitro* Reduktionsassay mit subzellulären Fraktionen

Die durchgeführten Biotransformationsstudien zeigen, dass das Substrat *N*-OH-AbMEG (**32a**) durch die subzellulären Fraktionen der Schweineleber umgesetzt wird. Die ermittelte *N*-reduktive Aktivität des Homogenats ist in der mitochondrialen Fraktion (SLMt) ca. 10-fach und der OMV ca. 100-fach angereichert und stimmt mit der mARC-Marker-Aktivität (=Benzamidoxim (BAO)-Reduktion) überein.<sup>[202]</sup> In diesem Zusammenhang sei auch darauf hingewiesen, dass die Aktivität im 9000g Überstand (enthält zytosolische und mikrosomale Enzyme) deutlich reduziert bzw. nicht detektiert (Nachweisgrenze  $3 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ) wurde. Die Umsetzungsraten sind in Abb. 3.31 dargestellt.

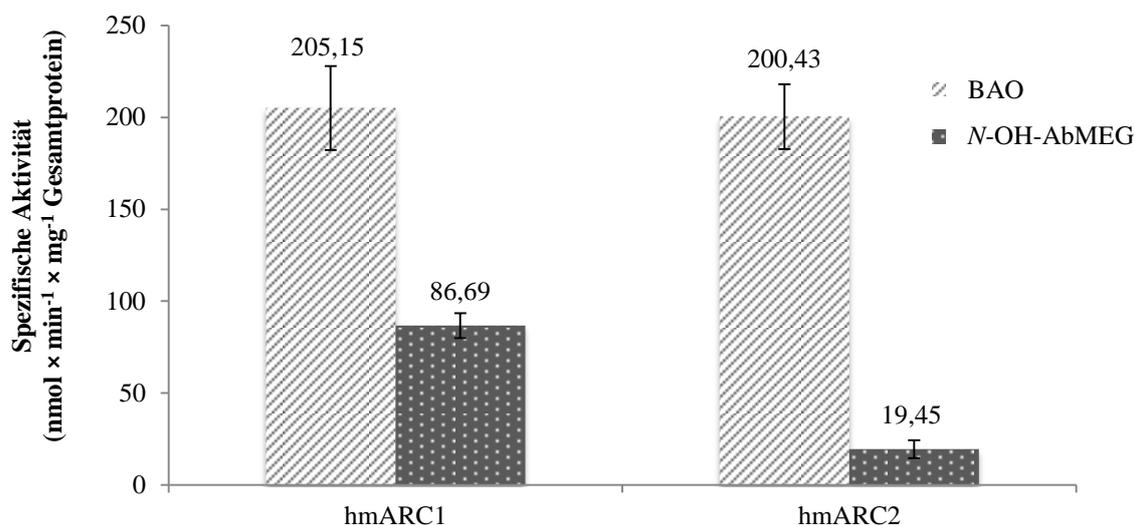
Identische Inkubationsansätze wurden mit NADPH als Co-Substrat durchgeführt, doch wurden dabei wesentlich niedrigere Umsetzungsraten erhalten (Daten nicht gezeigt), was ebenfalls ein Hinweis darauf ist, dass das Substrat durch das NADH-abhängige mARC-Enzymsystem und nicht primär durch CYP450 Enzyme metabolisiert wird.



**Abbildung 3.31:** Umsetzungsraten der Reduktion von *N*-OH-AbMEG (**32a**) zu AbMEG (**27**) durch Homogenat, 9000g Überstand, SLMt (Schweinelebermitochondrien) und OMV (*outer membrane vesicles*). Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 50 µg Protein (OMV 5 µg), 3 mM Substrat, 1 mM NADH in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,0 (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Bei den Werten handelt es sich um MW ± SD aus zwei separaten Inkubationen, die jeweils doppelt vermessen wurden. n. d., nicht detektiert.

### 3.4.5.2.3 *In vitro* Reduktionsassay mit dem rekombinantes Enzymsystem

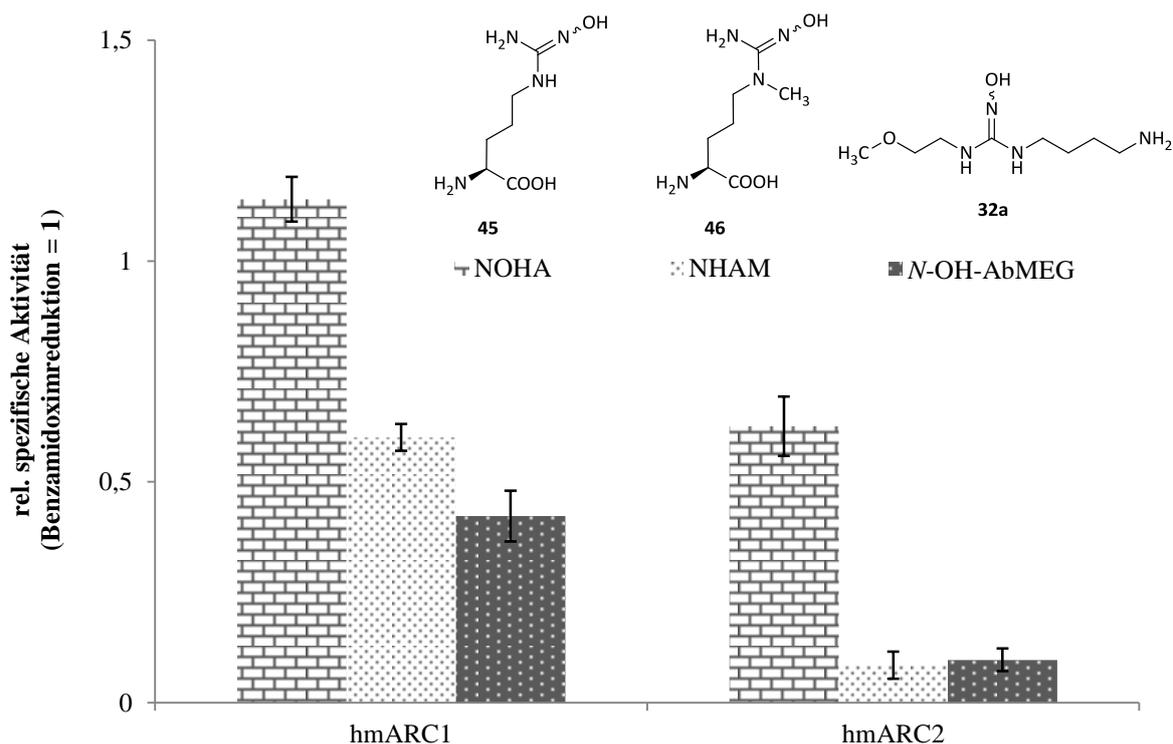
Die Untersuchungen mit dem rekombinanten mARC-haltigen Enzymsystem zeigen ebenfalls eine Umsetzung des Substrats *N*-OH-AbMEG (**32a**) zum aktiven Metaboliten AbMEG (**27**). Zum Vergleich wurde die Reduktion von Benzamidoxim (BAO) unter gleichen Bedingungen mit denselben Enzymchargen bestimmt. Gemessene Umsetzungsraten sind in Abb. 3.32 gezeigt.



**Abbildung 3.32:** Umsetzungsraten der Reduktion von *N*-OH-AbMEG (**32a**) zu AbMEG (**27**) bzw. BAO zu Benzamidin durch das rekombinante mARC-haltige Enzymsystem. Die Inkubationsansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 4,5-7,0 µg mARC (entspricht 75-116 pmol Mo), 75 pmol Häm/Cyt b5, 7,5 pmol FAD/b5 Reduktase, 3 mM Substrat, 1 mM NADH in 20 mM MES-Puffer pH 6,0 (Endvolumen 150 µl). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Die ermittelten Umsetzungsraten sind MW ± SD aus drei separat durchgeführten Inkubationen, die jeweils mind. doppelt inkubiert wurden.

Es kann deutlich gezeigt werden, dass das Substrat **32a** durch hmARC-1 schneller umgesetzt wird als durch hmARC-2 (Faktor 4) wohingegen die spezifische Aktivität beider Isoenzyme für BAO gleich ist. Diese Ergebnisse liegen in Übereinstimmung mit denen anderer Substrate, die an diesem Enzymsystem getestet wurden. Mit Ausnahme von NOHA wurden alle getesteten Substrate durch hmARC-1 schneller metabolisiert, als durch hmARC-2.<sup>[172,203,204]</sup>

Ein direkter Vergleich zwischen der Umsetzungsrate des Substrats **32a** mit denen von NOHA (**45**) und NHAM (**46**) über die Literatur-Daten von Kotthaus *et al.*<sup>[172]</sup> ist schwierig, da verschiedene Enzymchargen und unterschiedliche Inkubationsbedingungen gewählt wurden. Deshalb wurde eine Normierung über die jeweilige Umsetzungsrate von BAO durchgeführt. Die Daten sind in Abb. 3.33 dargestellt.



**Abbildung 3.33:** Zur Berechnung der relativen spez. Enzymaktivität wurde die spezifische Reduktion von NOHA (**45**), NHAM (**46**) und *N*-OH-AbMEG (**32a**) auf die spezifische Reduktion von BAO normiert. Die dargestellten SD berücksichtigen die Streuung der spezifischen Umsetzungsraten. Für die Reduktion von NOHA und NHAM wurden die Literaturdaten von Kotthaus *et al.* verwendet.<sup>[172]</sup>

Es kann gezeigt werden, dass alle Substrate annähernd gleich umgesetzt werden, bzw. die Reduktion von NOHA (**45**) etwas schneller verläuft als die der anderen Substrate. Durch die Normierung kann weiterhin gezeigt werden, dass eigentlich auch NOHA durch hmARC-1 schneller umgesetzt wird als durch hmARC-2 (s. o.). Eine mögliche Erklärung könnte in der Zugänglichkeit der Hydroxylgruppe liegen. Bei NOHA (**45**) liegt diese gut zugänglich vor, da das Guanidin nur einfach *N*-substituiert ist. Die anderen beiden Verbindungen enthalten zwei Alkyl-Substituenten. Unterschiede liegen hier besonders im Substitutionsmuster: Bei NHAM (**46**) liegt das Guanidin *N,N*-disubstituiert und bei *N*-OH-AbMEG (**32a**) *N,N'*-disubstituiert vor. Inwiefern dieses Substitutionsmuster einen Einfluss hat, müsste durch weitere Studien untermauert werden und ist an dieser Stelle nur spekulativ. Hilfreich für eine Erklärung wäre eine Röntgenkristallstruktur von hmARC, die bisher jedoch nicht existiert.

### 3.4.6 Diskussion

Eine Inhibition der DDAH-1 wird bei verschiedenen Erkrankungen als nützliche therapeutische Maßnahme erachtet (s. Kap. 1.4.3.2). Für einen Einsatz beim septischen Schock kann die stark basische, hydrophile Substanz AbMEG (**27**) direkt intravenös appliziert

werden. Da es sich meist um akute, lebensbedrohliche Fälle handelt, ist hier eine schnelle Wirkung erforderlich und eine vorherige Bioaktivierung eher von Nachteil. Bei anderen Anwendungsgebieten hingegen ist die Entwicklung von AbMEG-Prodrugs sinnvoll. Bei Indikationen wie z. B. Morbus Alzheimer oder Migräne, ist der Einsatz einer oralen Therapie wünschenswert, da besonders im ersten Fall eine Dauermedikation notwendig ist. Für eine gute Patienten-Compliance und einem damit verbundenen Therapieerfolg sind orale Arzneimittel am besten geeignet. Bisher sind keine DDAH-1-Inhibitoren in der Arzneimitteltherapie zugelassen. Die Entwicklung von Prodrugs zur Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit könnte dieses Ziel einen Schritt näher bringen.

Zwei Prodrugs von AbMEG (**27**) konnten erfolgreich synthetisiert werden, das Hydroxyguanidin **32a** und das *O*-methylierte Hydroxyguanidin **32b**. Die Guanidin-Funktion wurde hierbei über unterschiedliche Thioharnstoffe aufgebaut. Die Abspaltung der Schutzgruppen war ebenfalls in guten Ausbeuten möglich. Die Verbindungen **32a** und **32b** konnten in über drei Syntheseschritte in Gesamtausbeuten von 66% bzw. 40% hergestellt werden. Die Synthese des Galaktosyl-Prodrugs **32c** war bisher leider nicht möglich.

Es konnte rechnerisch gezeigt werden, dass die synthetisierten Prodrugs **32a,b** verbesserte physikochemische Eigenschaften aufweisen als AbMEG (**27**). Eine orale Bioverfügbarkeit ist auch ohne vorhandene Transporter durch passive Diffusion wahrscheinlich. Ein Beweis für diese These müsste durch geeignete zellbasierte bzw. *in vivo*-Studien noch erbracht werden.

Weiterhin konnte für beide Prodrugs eine ausreichende hydrolytische Stabilität bei pH 2,0, pH 7,4 und pH 9,0 demonstriert werden. Die stärkste Zersetzung findet bei pH 9,0 (37°C) nach 24 Stunden statt und beträgt lediglich 14% des freien Hydroxyguanidins **32a**. Das *O*-Methyl-Derivat **32b** unterliegt innerhalb der Versuchszeit keinerlei Zersetzungsprozessen. Somit ist selbst das nichtsubstituierte Hydroxyguanidin stabiler als zuvor erwartet. Eine Bioaktivierung von **32a** zum aktiven Metaboliten konnte anhand der Untersuchung an porcinen Leberfraktionen und dem rekombinanten humanen mARC-haltigen Enzymsystem belegt werden. Die Untersuchung der *O*-Desalkylierung von **32b** steht noch aus. Eine solche Umsetzung wurde anhand der strukturverwandten Verbindung *O*-Methyl-NOHA im Arbeitskreis bereits gezeigt und ist daher auch für die vorliegende Verbindung sehr wahrscheinlich.<sup>[167]</sup>

### 3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neue DDAH-Inhibitoren entwickelt werden, die in ihren Eigenschaften den bisher bekannten Verbindungen überlegen sind. Zu diesen Eigenschaften zählen eine gute biologische Aktivität (Potenz) an der DDAH, eine Selektivität gegenüber den NOSs und der Arginase sowie verbesserte Arzneistoffqualitäten. Ferner sollte die Synthese neuer Derivate zur Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen beitragen. Hierbei sollte insbesondere der Einfluss bestimmter Substitutionsmuster auf einen Verzicht der Carboxylgruppe ohne gleichzeitigen Verlust der biologischen Aktivität untersucht werden. Die Grundlage dieses Ansatzes bilden die bereits bekannten Inhibitoren L-257 ( $K_i = 13 \mu\text{M}$ ) und dessen Weiterentwicklung AbMEG (**27**,  $K_i = 18 \mu\text{M}$ ) sowie der derzeit potenteste DDAH-Inhibitor Vinyl-NIO ( $K_i = 2 \mu\text{M}$ ) und decVNIO ( $K_i = 768 \mu\text{M}$ ).

Das Ziel den 2-Methoxyethyl-Rest der Leitstrukturen L-257 bzw. AbMEG auf Amidine zu übertragen, konnte durch die Synthese der homologen Reihen von Methoxyalkyl-*N*-imino-*L*-ornithinen (NIOs, **1a-c**) bzw. deren decarboxylierten Derivaten (NIOdecs, **2a-c**) erreicht werden. Weiterhin wurde basierend auf diesen Verbindungen ein *nor-L*-Ornithin-Derivat (**21**) generiert. Sämtliche neue Amidine konnten über Pinner-Synthesen in guten Ausbeuten erzielt werden. Darüber hinaus war die Synthese des decarboxylierten Derivates von Butenyl-Arg (**22**,  $K_i = 57 \mu\text{M}$ ), das AbBG (**26**), erfolgreich. Die Guanidin-Funktion konnte in sehr guten Ausbeuten über einen intermediären Thioharnstoff aufgebaut werden.

In *in vitro*-Experimenten wurde die Aktivität jeder neuen Verbindung an den Enzymen des NO-Stoffwechsels (DDAH, NOSs, Arginase) untersucht. Dabei wurde die stärkste Inhibitoraktivität an der DDAH bei dem NIO-Derivat **1b** ( $K_i = 9 \mu\text{M}$ ) festgestellt. Generell konnte gezeigt werden, dass Amidine mit Carboxylfunktion im Vergleich zu solchen ohne diese Funktionalität eine wesentlich bessere Hemmpotenz aufwiesen. Folglich konnte auch die Tendenz der Docking-Ergebnisse aus Kapitel 2.3 in diesem Punkt bestätigt werden. Die vorausgesagte Potenz des Derivates **1c** hingegen konnte nicht nachgewiesen werden. In den experimentellen Untersuchungen hat sich dieses als das NIO-Derivat mit der geringsten Hemmwirkung herausgestellt. Die Testdaten der NIOdecs (**2a-c**) weisen darauf hin, dass nicht der 2-Methoxyethyl-Rest des AbMEGs (**27**) für dessen gute Inhibitoraktivität verantwortlich ist, da das Amidin-Analogon des AbMEGs nur eine sehr geringe Hemmwirkung besitzt. Es existiert bisher kein Amidin-Derivat ohne Carboxylgruppe, das eine gute Hemmwirkung an der DDAH aufweist.

Verbindung **21** basiert im Unterschied zu **1a-c** auf *nor*-L-Ornithin und zeigt erwartungsgemäß keine Inhibitoraktivität. Die These, dass die Kettenlänge zwischen Aminogruppe und Amidin- bzw. Guanidin-Funktion für eine gute Hemmwirkung mindestens vier C-Atome betragen muss, kann somit bekräftigt werden.

Das AbBG (**26**) zeigt eine deutliche, mit Butenyl-Arg (**22**,  $K_i = 57 \mu\text{M}$ ) vergleichbare Inhibitoraktivität an der DDAH ( $K_i = 59 \mu\text{M}$ ). Neben AbMEG (**27**) existiert insofern eine weitere Verbindung, die die Behauptung aus Kapitel 2.4.1, dass die stärkeren Wechselwirkungen der Guanidin-Funktion, im Vergleich zur Amidin-Funktion, eine entscheidende Rolle für die Wirkung spielt, unterstützt. Der 2-Methoxyethyl-Rest kann folglich durch vergleichbare Substituenten ersetzt werden.

Bezüglich einer Selektivität gegenüber Arginase und NOSs hat sich gezeigt, dass der potenteste neu entwickelte DDAH-Inhibitor **1b** im Vergleich zu den anderen neuen Verbindungen auch hier die stärkste Hemmung aufweist und dementsprechend am wenigsten selektiv ist. Folglich besitzt AbMEG (**27**) nach wie vor die besten Eigenschaften in Hinsicht auf Inhibitorpotenz, kombiniert mit Selektivität und Arzneistoffqualität.

Zur Steigerung der oralen Bioverfügbarkeit sollten für diese Verbindung Prodrugs entwickelt werden. Konzepte zur Senkung der Basizität, Erhöhung der Lipophilie bzw. Ansteuerung von Transportern wurden in Betracht gezogen. Die Synthesen des Hydroxyguanidins **32a** und des *O*-Methyl-Hydroxyguanidins **32b** waren über den Weg der Thioharnstoffe möglich. Das Prodrug mit dem Galaktosyl-Rest **32c** zur Ausnutzung von Glukose-Transportern konnte bisher jedoch nicht hergestellt werden.

Die Prodrugs **32a,b** zeigen rechnerisch deutlich verbesserte physikochemische Eigenschaften (gesenkte Basizität, erhöhte Lipophilie) als AbMEG (**27**). Eine gesteigerte orale Bioverfügbarkeit durch passive Diffusion ist dadurch sehr wahrscheinlich. Ebenfalls konnte für beide Verbindungen eine sehr gute hydrolytische Stabilität festgestellt werden. Im Gegensatz zu anderen Hydroxyguanidinen wie z. B. NOHA (98% Zersetzung nach 24 h),<sup>[167,171]</sup> war **32a** auch bei pH 9 über 24 Stunden stabil (nur 14% Zersetzung). Eine für die Wirkung im Körper erforderliche Bioaktivierung zum aktiven Metaboliten von **32a** konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Die *O*-Desalkylierung von **32b** wurde bisher nicht überprüft ist aber über mikrosomale CYP450-Enzyme sehr wahrscheinlich.<sup>[167,179]</sup>

In folgenden Arbeiten sollten die berechneten physikochemischen Eigenschaften für die Prodrugs experimentell überprüft werden. Ebenfalls sollte eine Aktivierung des Prodrugs **32b** durch *O*-Desalkylierung und anschließender Reduktion zum Guanidin bewiesen werden. Obwohl für beide Prodrugs eine sehr gute, hydrolytische Stabilität nachgewiesen wurde, kann eine oxidative Stabilität kritisch sein. Bei anderen Hydroxyguanidinen wurde bereits gezeigt, dass eine *O*-Substitution zu einer deutlichen Verbesserung führt.<sup>[171]</sup> Folglich sollte besonders das *O*-Methyl-Prodrug **32b** gegenüber oxidativen Einflüssen stabil sein, was es zu überprüfen gilt. Weiterhin interessant wäre die Überprüfung der Inhibitoren in Zellkultur, sowie durch geeignete *in vivo*-Studien. Hier könnte AbMEG (**27**) z. B. in einem septischen-Schock-Tiermodell getestet werden, bzw. die AbMEG-Prodrugs **32a,b** sollten auf ihre orale Bioverfügbarkeit untersucht werden.

Ferner ist es von großem Interesse das Galaktosyl-Prodrug **32c** zu synthetisieren, da dieses durch Ausnutzung von Glukose-Transportern im Darm eine größere Bioverfügbarkeit verspricht. Da das freie Hydroxyguanidin stabiler ist, als angenommen, könnte z. B. eine Substitution an der Hydroxylgruppe ausprobiert werden.

Zur weiteren Aufklärung des Bindemodus von AbMEG im aktiven Zentrum der DDAH, wäre es nach wie vor spannend eine Röntgenkristallstruktur durch Ko-Kristallisation mit dem Protein zu erzeugen.

## 4 Hemmung der Arginase

---

### 4.1 Einleitung und Zielsetzung

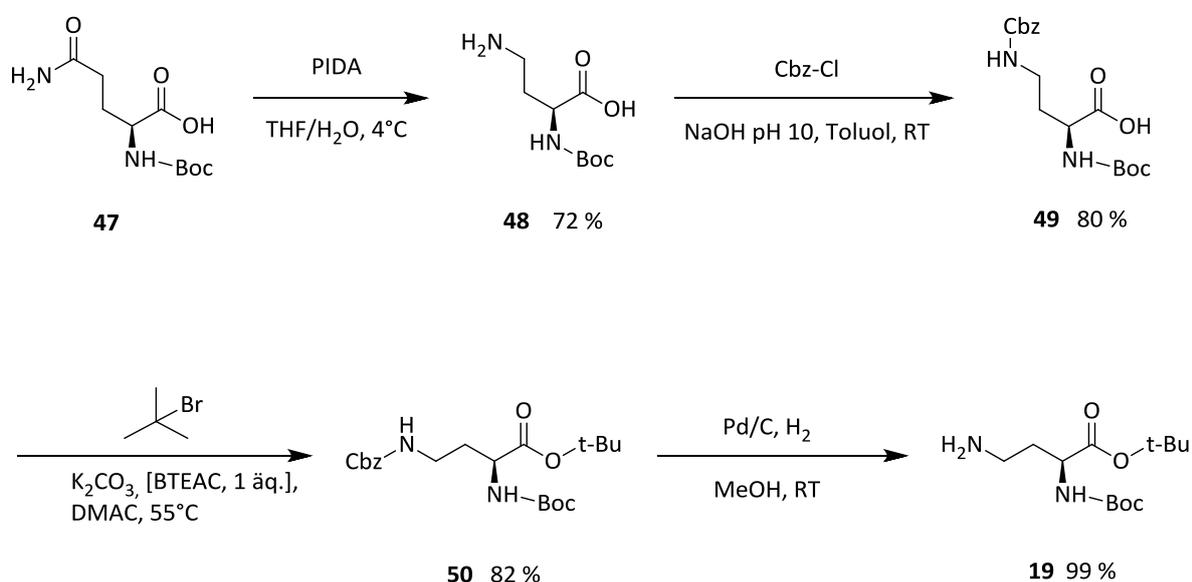
Im folgenden Kapitel werden Synthese und *in vitro*-Testung eines neuen potentiellen Arginase-Inhibitors, dem  $N^{\omega}$ -Hydroxy- $N^{\gamma}$ -methyl-*nor*-L-arginin (*nor*-NHAM), vorgestellt. Das besondere Interesse an der Entwicklung dieser Substanz liegt in der Hemmpotenz strukturverwandter Verbindungen (NOHA, *nor*-NOHA, NHAM) begründet und wurde bereits in Kapitel 1.5.2 erläutert. Der therapeutische Nutzen einer Arginase-Hemmung ist in Kapitel 1.4.2 diskutiert worden.

### 4.2 Synthese

In Anlehnung an die Synthese des NHAM (**46**) sollte die Hydroxyguanidin-Funktion über eine Cyanamid-Zwischenstufe aufgebaut werden.<sup>[205,206]</sup> Da der einzige strukturelle Unterschied von NHAM (**46**) zu *nor*-NHAM (**54**) eine Methyleneinheit in der Grundkette ist, musste als Ausgangsverbindung *nor*-L-Ornithin anstelle von L-Ornithin gewählt werden. Ein wichtiger Aspekt der Syntheseplanung war die Entwicklung eines geeigneten Schutzgruppenkonzeptes, um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden. Strategisch sinnvoll war es, die Schutzgruppen für die  $\alpha$ -Amino- und die Carboxylgruppe so zu wählen, dass sie am Ende des Prozesses simultan abgespalten werden können. Erfüllt wird dieses Kriterium u. a. von der säurelabilen Boc-Schutzgruppe für das Amin und einem *tert*-Butylester für die Carboxylgruppe.<sup>[207]</sup> Eine solche Verbindung **19** ist zwar kommerziell erhältlich, jedoch sehr teuer, weshalb das Edukt selbst synthetisiert wurde.

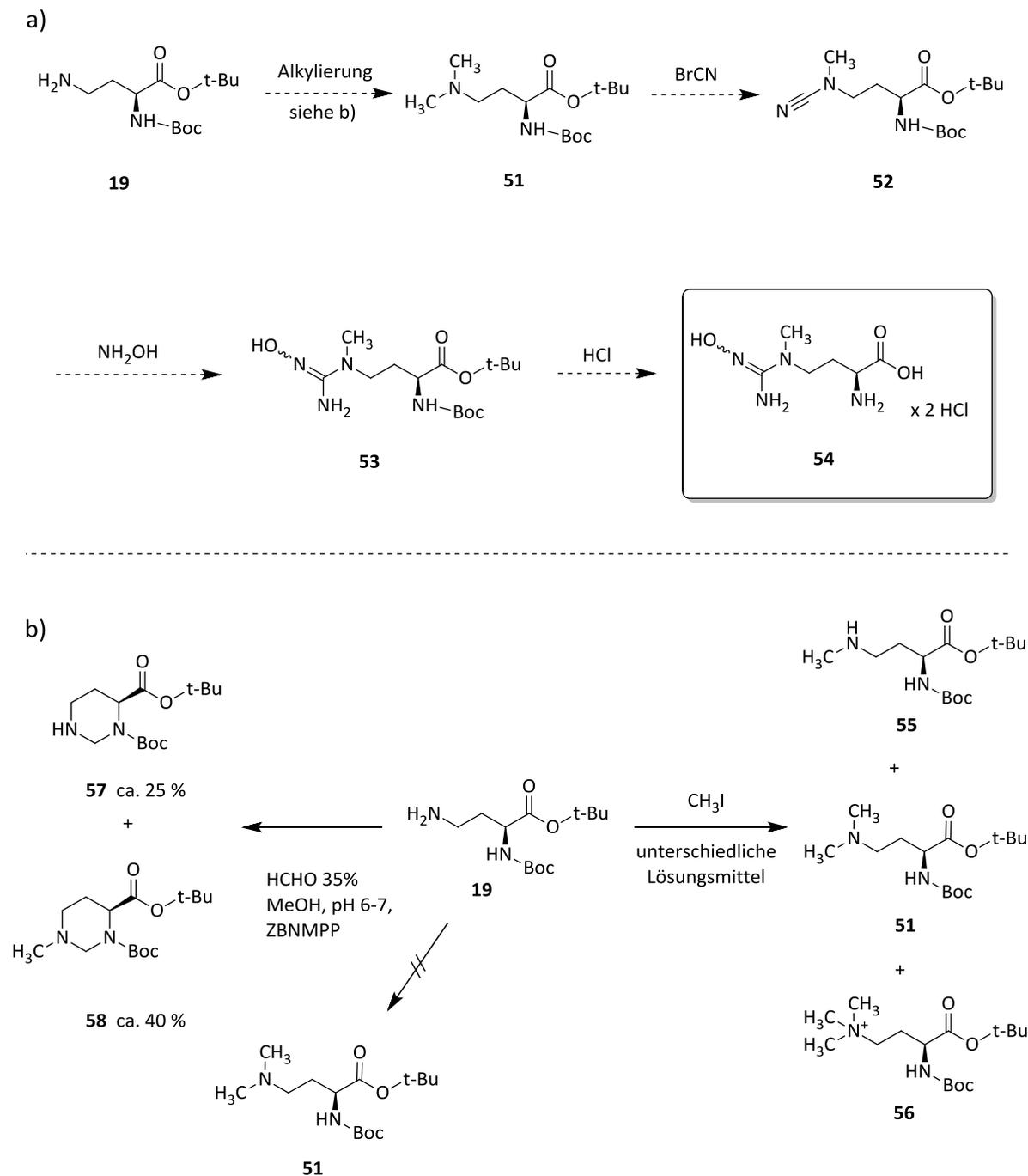
Aus  $N^{\alpha}$ -Boc-geschütztem L-Glutamin **47** konnte in einer Art Hofmann-Umlagerung mittels Iodosobenzoldiacetat (PIDA) nach einer Vorschrift von Andruszkiewicz und Rozkiewicz das  $N^{\alpha}$ -Boc-*nor*-L-ornithin (**48**) hergestellt werden.<sup>[208]</sup> Vor der Veresterung der Carboxylgruppe mit dem *tert*-Butyl-Rest musste die neu entstandene  $\gamma$ -Aminogruppe geschützt werden. An dieser Stelle war es wichtig, diese neue Schutzgruppe so zu wählen, dass bei deren Abspaltung die beiden anderen Gruppen erhalten bleiben. Als geeignet erwies sich hier die Cbz-Schutzgruppe, welche hydrogenolytisch entfernt werden kann. Dieses Konzept wurde bereits von Moali *et al.* für die Synthese von *nor*-NOHA erfolgreich umgesetzt.<sup>[91]</sup> In Anlehnung an deren Vorschrift wurde die Schutzgruppe mit Cbz-Cl durch Rühren in

NaOH/Toluol über Nacht eingeführt. Nach Extraktion konnte Verbindung **49** als kristalliner Schaum isoliert werden. Ebenfalls nach Moali *et al.* war es möglich die Carboxylfunktion zu verestern. Hierzu wurde die Aminosäure **49** mit *tert*-Butylbromid in *N,N*-Dimethylacetamid (DMAC) unter Phasentransferkatalyse durch Benzyltriethylammoniumchlorid (BTEAC) umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde die an allen funktionellen Gruppen geschützte Verbindung **50** als Öl erhalten. Im Anschluss an die katalytische Hydrierung mit Wasserstoff (4 bar) über Pd/C in Methanol und mindestens 24 Stunden Reaktionszeit wurde das am  $\gamma$ -Stickstoff freie Amin **19** quantitativ in einer Gesamtausbeute von 47% erhalten. Das Schutzgruppenkonzept ist in Abb. 4.1 dargestellt.



**Abbildung 4.1:** Darstellung des geschützten Amins **19** ausgehend von *N*<sup>α</sup>-Boc-geschütztem L-Glutamin (**47**).<sup>[91,208]</sup>

Die weitere Synthesestrategie zum Aufbau der Hydroxyguanidinfunktion ist in Abb. 4.2 a) gezeigt. In einem ersten Schritt sollte Amin **19** zum Dimethylamin **51** alkyliert werden. Dialkylierte Amine können durch einen Von-Braun-Abbau mit Bromcyan durch Substitution einer Alkylgruppe zu dem entsprechenden Cyanamid-Derivate umgesetzt werden,<sup>[205,209]</sup> Ausgehend von **51** würde durch diese Reaktion das Produkt **52** erhalten werden. Da Cyanamide als Zwischenstufe für den Aufbau von Guanidin-Funktionen genutzt werden können,<sup>[210,211]</sup> würde eine weitere Umsetzung mit Hydroxylamin im vorliegenden Fall zum Hydroxyguanidin *N*<sup>α</sup>-Boc-*O*-*tert*-butyl-*nor*-NHAM **53** erfolgen. Durch die Reaktion mit einer starken Säure, z. B. HCl, können beide Schutzgruppen simultan entfernt werden, sodass man das Endprodukt als Dihydrochlorid **54** erhalten würde.



**Abbildung 4.2:** a) Synthesestrategie zur Darstellung der Zielverbindung *nor*-NHAM (**54**).<sup>[205]</sup> b) Durchgeführte Methoden zur Synthese des dimethylierten Amins **51**.<sup>[163,212,213]</sup>

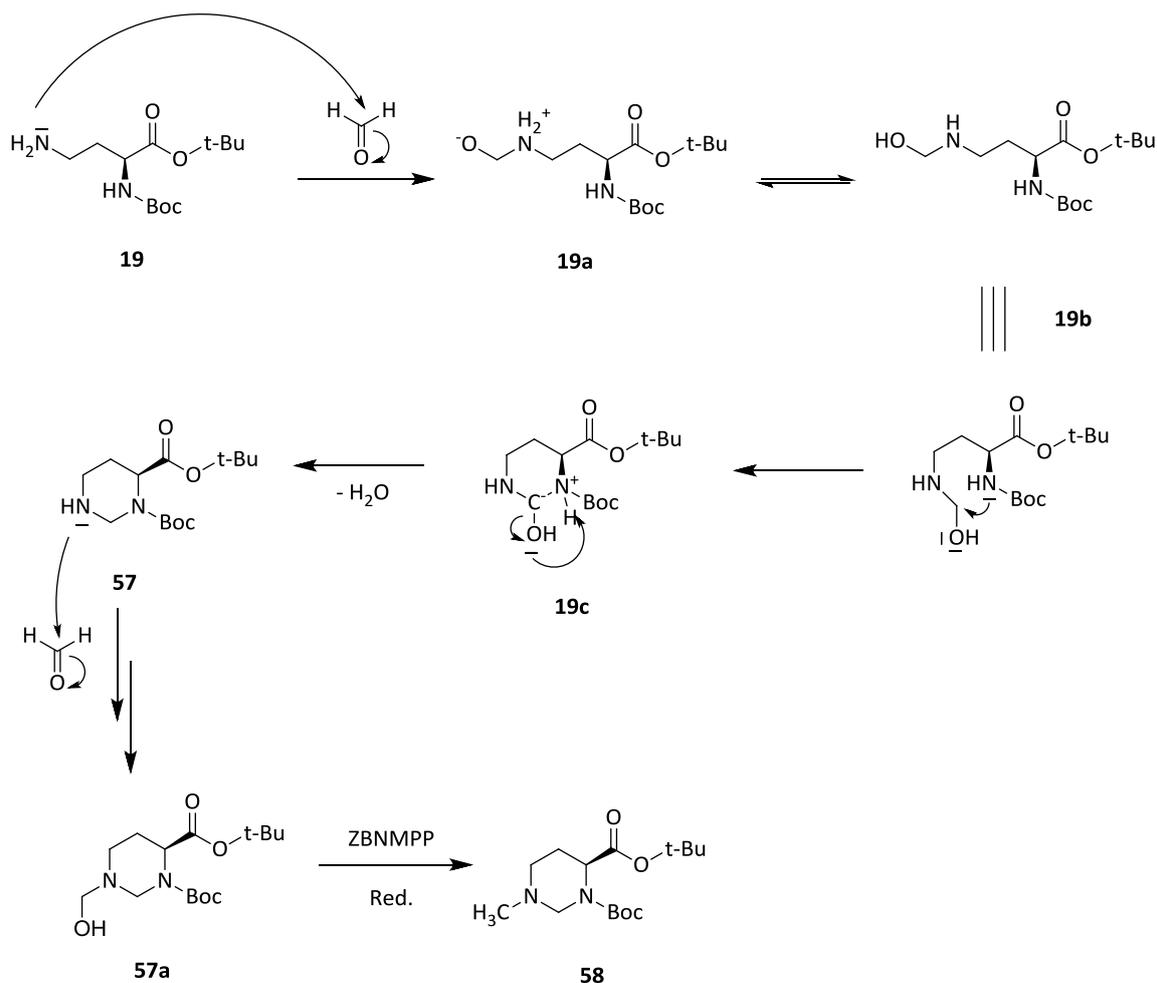
In Abb. 4.2 b) sind die verschiedenen Versuche den  $\gamma$ -Stickstoff des geschützten *nor*-L-Ornithins **19** zu methylieren dargestellt. In vorangegangenen Arbeiten von Schnörwangen und Töpker werden Alkylierungen an Stickstoff mit Methyljodid, Kaliumcarbonat ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) in Diethylether bzw. reduktiv mit Paraformaldehyd, Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) und Natriumborhydrid ( $\text{NaBH}_4$ ) in Methanol beschrieben.<sup>[163,212]</sup> Beide Ansätze wurden für die Synthese von **51** getestet. Die Alkylierung mit Methyljodid führte auch bei Variation von Reaktionsbedingungen und Lösungsmitteln, wie z.B. Dioxan, Diethylether, Nitromethan, u. a.

zu Gemischen aus Edukt **19**, mono- **55**, di- **51** und trimethylierter **56** (quartärer Stickstoff) Verbindung. Aufgrund des +I-Effektes der Methylgruppen wird die Nucleophilie des Amino-Stickstoffs bekanntlich erhöht, was die verhältnismäßig stärkere Detektion der quarternisierten Verbindung **56** erklärt. Abhängig vom Lösungsmittel ist die Zusammensetzung der Produkte unterschiedlich. Nachteile dieser Methode sind die Schwierigkeit einer Trennung der Substanzen voneinander und die resultierende schlechte Ausbeute des gewünschten Produktes.

Die in der Dissertation von Töpker beschriebene Methode zur reduktiven Alkylierung konnte nicht reproduziert werden. Jedoch sind in der Literatur weitere Varianten dieser Reaktion zu finden, wie z. B. von Alinezhad *et al.*<sup>[214]</sup> (s. Abb. 4.3) Nach dieser Vorschrift erfolgte die Umsetzung von **19** mit wässriger 35%iger Formalinlösung in Methanol bei pH 6-7. Als Reduktionsmittel wurde Zinkborhydrid-*N*-methylpiperidin (ZBNMPP) eingesetzt, welches nach einer Vorschrift der gleichen Autoren hergestellt wurde.<sup>[213,215]</sup> Der pH-Wert der Reaktionslösung wurde mit 10%iger Salzsäure in Methanol eingestellt. Nach Isolation des entstandenen Produktes durch Säulenchromatographie an Kieselgel, stellte sich jedoch heraus, dass statt der gewünschten Verbindung **51** ein Gemisch aus den zwei zyklisierten Produkten **57** und **58** entstanden ist.

Ein von Underwood und Carr beschriebener Fall der Zyklisierung verlief ähnlich. Jedoch handelt es sich dabei nicht um Aminogruppen, die trotz Schutzgruppe reagieren, sondern um primäre Amine.<sup>[216]</sup> Ein vorgeschlagener, an die Literatur angelehnter Mechanismus der Reaktion ist in Abb. 4.3 dargestellt. Das Halbaminal **19a/b** der Reaktion von Verbindung **19** mit einem Molekül Formaldehyd bildet unter Kondensation ein sechsgliedriges Zyklisierungsprodukt **57**, welches thermodynamisch stabil ist. Diese Reaktion läuft anscheinend schneller ab als die Reduktion der Hydroxyl-Gruppe durch das ZBNMPP. Bei Töpker wurde die reduktive Alkylierung mit L-Ornithin, also einer Verbindung, die eine Methylengruppe länger ist, durchgeführt. In dem Fall würde es zur Bildung eines siebengliedrigen Rings kommen, welcher thermodynamisch weniger stabil ist. Demzufolge scheint eine Zyklisierung hier nicht bevorzugt abzulaufen, sodass das dimethylierte Produkt erhalten wurde.

Im Anschluss an den Ringschluss kann **57** durch Reaktion mit weiterem Formaldehyd und anschließender Reduktion zu Verbindung **58** methyliert werden.

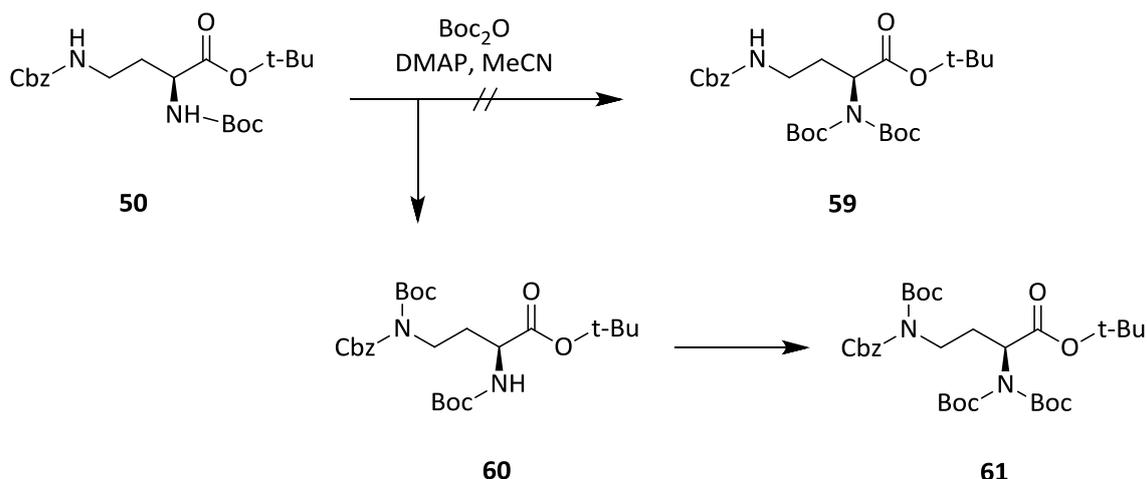


**Abbildung 4.3:** Vorgeschlagener Mechanismus zur Bildung der cyclischen Nebenprodukte **57** und **58** bei der reduktiven Alkylierung von Amin **19** mit Formaldehyd und ZBNMPP. Mechanismus angelehnt an Literaturangaben.<sup>[216]</sup>

Verschiedene Ansätze wurden unternommen, um die Zyklisierung durch Änderung der Reaktionsbedingungen zurückzudrängen und die Reaktion in Richtung der dimethylierten Verbindung **51** zu lenken. Zunächst wurde die Reihenfolge der Reaktanden-Zugabe geändert: Das Reduktionsmittel wurde als erstes hinzugefügt, dann der pH-Wert eingestellt und als letztes die Formalin-Lösung hinzugefügt. Ein zweiter Ansatz war der zusätzliche Austausch des Reduktionsmittels zu  $\text{NaBH}_4$ , da dieses eine stärkere Reduktionskraft besitzt.<sup>[217]</sup> Allerdings führte das zu einem raschen Anstieg des pH-Wertes und zu schneller Zersetzung des  $\text{NaBH}_4$ . Die dritte Idee war die Erniedrigung der Reaktionstemperatur. Die Literaturvorschrift schreibt Raumtemperatur vor. Deshalb wurde zunächst auf  $0^\circ\text{C}$  gekühlt und in weiteren Versuchen auf bis zu  $-78^\circ\text{C}$ . Einzig die Änderung der Reaktanden-Reihenfolge führte zur Entstehung des Dimethylamins **51**. Dennoch war die Zyklisierung die überlegene Reaktion und die Ausbeute des gewünschten Produktes sehr gering. Anfallende Kosten und zeitlicher Aufwand sind bei dieser Methode sehr unwirtschaftlich.

Beide Methylierungs-Varianten haben den Nachteil, das gewünschte Produkt in nur sehr geringem Ausmaß zu liefern, so dass es sinnvoller war, das Schutzgruppenkonzept zu überdenken. Eine zweite Boc-Schutzgruppe an der  $\alpha$ -Aminofunktion müsste die Ringbildung vollständig verhindern und das gewünschte Produkt so durch reduktive Alkylierung in guten Ausbeuten erhalten werden.

In Abbildung 4.4 ist der Versuch dargestellt, eine zweite Boc-Schutzgruppe in Anlehnung an die Literatur mittels Di-*tert*-butyldicarbonat ((Boc)<sub>2</sub>O) in Acetonitril und DMAP-Katalyse bei Raumtemperatur in die dreifach geschützte Aminosäure **50** einzuführen um zu Verbindung **59** zu gelangen.<sup>[218–220]</sup> Bei der Reaktionskontrolle via Dünnschichtchromatographie (DC) bildete sich zunächst ein Produkt und im weiteren Reaktionsverlauf ein zweites. Die Auswertung der NMR-Spektren beider isolierter Verbindungen ergab, dass die zweite Boc-Gruppe zunächst an den  $\gamma$ -Stickstoff bindet (zu Verbindung **60**). Die Weiterreaktion zu **61** erfolgt vermutlich erst nach nahezu vollständiger Reaktion des Edukts **50** durch überschüssiges Boc-Anhydrid.



**Abbildung 4.4:** Darstellung des Einführungsversuches einer zweiten Boc-Schutzgruppe an Verbindung **50** durch (Boc)<sub>2</sub>O unter DMAP-Katalyse in Acetonitril.<sup>[218–220]</sup>

Die Erkenntnis dieser Reaktion ist, dass bevor das N <sup>$\alpha$</sup> -Atom doppelt Boc substituiert werden kann, erst das N <sup>$\gamma$</sup> -Atom doppelt geschützt sein muss. Folglich ist eine Änderung des Schutzgruppenkonzeptes direkt am Beginn der Synthese erforderlich. Eine Überlegung war, die  $\gamma$ -Aminogruppe in einen Zyklus einzubinden und somit in einem Schritt doppelt zu schützen, damit kein freies, substituierbares Wasserstoffatom mehr vorliegt. Ein Beispiel für eine solche Schutzgruppe ist das Phthalimid.

Ein von N <sup>$\alpha$</sup> -Boc-*nor*-L-ornithin (**48**) ausgehender, dem neuen Schutzgruppenkonzept angepasster, vollständiger Syntheseweg bis zum *nor*-NHAM (**54**) ist in Abbildung 4.5

dargestellt. Erste Versuche Verbindung **48** in Anlehnung an die Literatur mit Phthalsäureanhydrid (**62**) in Chloroform zum Rückfluss zu erhitzen, führten zwar zu einer Additionsreaktion am  $\gamma$ -Stickstoff, der Ringschluss zum Phthalimid **63** unter Kondensation von Wasser gelang unter diesen Reaktionsbedingungen jedoch nicht.<sup>[221]</sup> Ein Wechsel zu höher siedenden Lösungsmitteln wie z. B. Perchlorethylen oder Chlorbenzol führte schließlich zum Produkt **63**, welches anschließend mit *tert*-Butylbromid verestert wurde. Die Phthalimidschutzgruppe wurde auch in Verbindung **19** eingeführt, was direkt zur dreifachgeschützten Aminosäure **64** führte. Hiervon ausgehend konnte mit (Boc)<sub>2</sub>O wie oben beschrieben eine zweite Boc-Schutzgruppe an der  $\alpha$ -Aminogruppe eingeführt werden. Der Reaktionsansatz musste dabei teilweise mehrere Tage gerührt werden und absolut wasserfrei sein, andernfalls wurden schlechte Umsetzungsraten mit reduzierter Ausbeute erzielt. Eine Rückgewinnung des Edukts war zwar möglich, jedoch bilden sich im Verlauf langer Reaktionszeiten Nebenprodukte, die mit Substanzverlusten einhergingen.

Phthalimid-Spaltungen werden in der Literatur häufig durch Hydrazinolyse erreicht, wie z. B. bei der bekannten Gabrielsynthese.<sup>[162]</sup> Die Reaktion wird dabei meist mit den Reagenzien Hydrazin oder Methylhydrazin durchgeführt, welche aufgrund ihres kanzerogenen Charakters ersetzt werden sollten. Alternative Möglichkeiten sind z. B. die Entschützung mit NaBH<sub>4</sub> und Essigsäure<sup>[222]</sup> oder mit Methylamin,<sup>[223]</sup> bzw. vermutlich einer ganzen Reihe anderer primärer Amine (z. B. Ehanolamin s. Kap. 3.4.2), deren Einsatz in der Literatur jedoch wenig beschrieben ist. Ausgesucht wurde die Aminolyse mit Methylamin, da diese eine einfache, günstige und schnelle Variante versprach. Ferner sind alle eingesetzten Substanzen flüchtig und somit leicht zu entfernen. Zum Entschützen wurde die vollgeschützte Verbindung **65** mit wässriger Methylamin-Lösung (40%) und Ethanol versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Lösungsmittel und Methylamin wurden am Rotationsverdampfer entfernt und das freie Amin **66** durch Extraktion aus dem Ansatz isoliert. Fortgefahren wurde nach der oben beschriebenen Methode durch reduktive Alkylierung mit Formalinlösung und ZBNMPP zum dimethylierten Produkt **67**. Nach der Aufreinigung über Kieselgel wurde dieses durch Von-Braun-Abbau mit Bromcyan in Dioxan durch Rühren unter Schutzgasatmosphäre zum entsprechenden Cyanamid-Derivat **68** umgesetzt. Dieses wurde ebenfalls mittels Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt.

Der Aufbau der Guanidin- bzw. Hydroxyguanidin-Funktion aus dem Cyanamid konnte durch Reaktion mit der freien Hydroxylamin-Base erreicht werden. Die Umsetzung erfolgte in trockenem Methanol unter Stickstoff-Atmosphäre bei Raumtemperatur. Erhalten wurde das

geschützte *nor*-NHAM **69**. Verschiedene Versuche zur Darstellung einer geschützten Hydroxylfunktion durch Umsetzung von **68** mit *O*-THP-Hydroxylamin sowohl in Dioxan als auch Methanol mit DIPEA oder TEA als Hilfsbasen verliefen erfolglos. Der letzte Syntheseschritt war die Entfernung aller Schutzgruppen mit HCl in Dioxan, um zum Endprodukt *nor*-NHAM Dihydrochlorid **54** zu gelangen. Bei optimalen Reaktionsbedingungen konnte eine Gesamtausbeute von 14% erreicht werden.

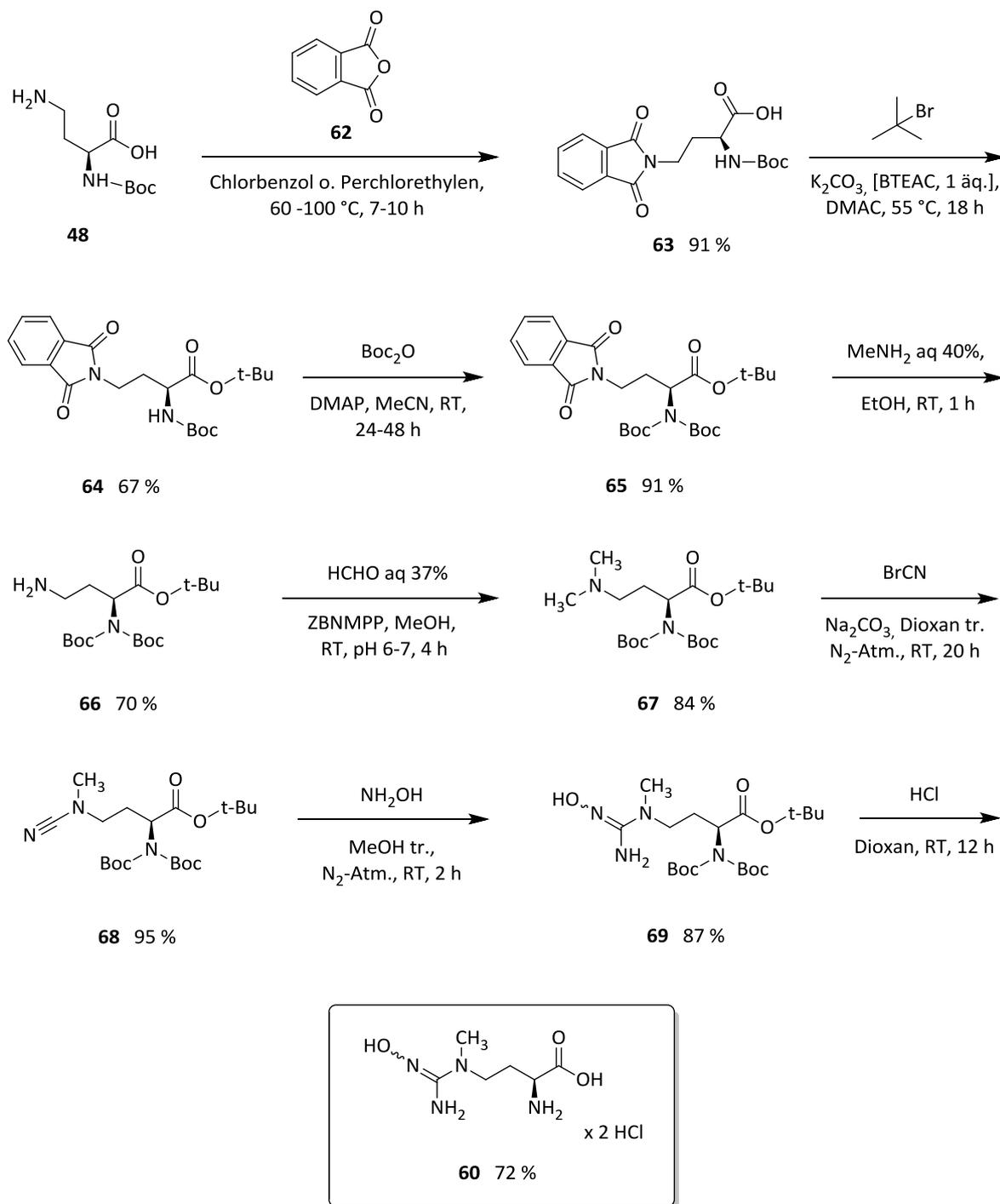
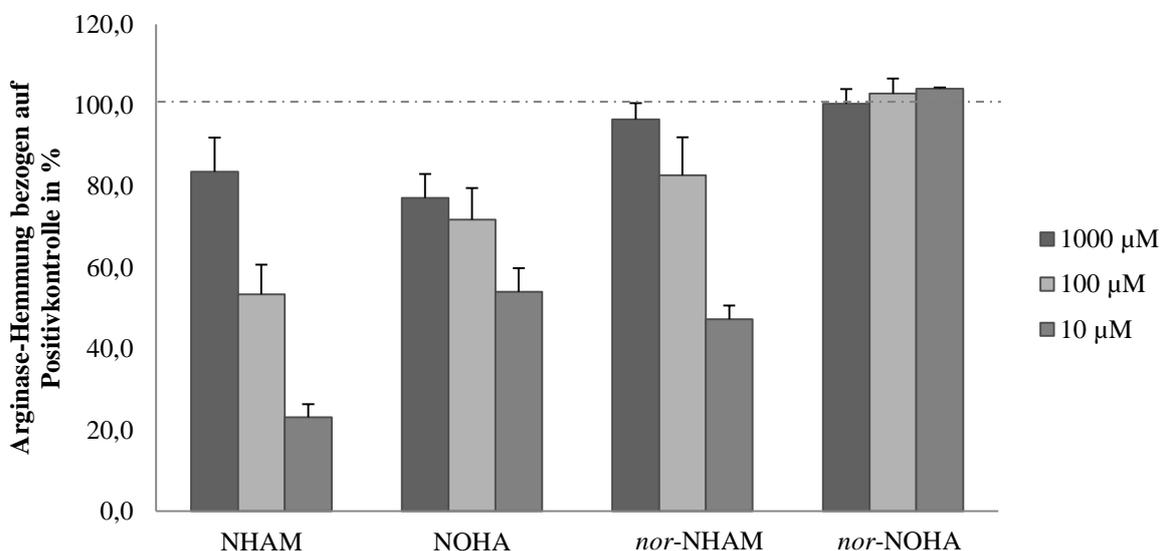


Abbildung 4.5: Finale Synthese der Zielverbindung *nor*-NHAM (**54**) mit optimiertem Schutzgruppenkonzept.

### 4.3 *In vitro*-Testung an der Arginase

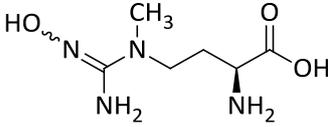
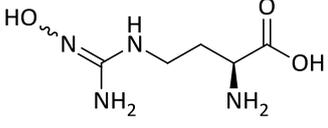
Hemmstudien zur Untersuchung der Inhibitorqualität von *nor*-NHAM (**54**) erfolgten an boviner Arginase I mittels eines kolorimetrischen Plattenreader-Assays (s. Kap. 6.2.2.2). Quantifiziert wurde die aus L-Arginin durch Arginase-Katalyse gebildete Menge an Harnstoff. Mit der Synthese des *nor*-NHAM (**54**) wurde angestrebt, eine gesteigerte Hemmpotenz im Vergleich zu strukturverwandten Verbindungen zu erzielen. Deshalb wurden die ermittelten Hemmdaten mit denen von NOHA (**45**), *nor*-NOHA (**70**) und NHAM (**46**) verglichen. Um eine gute Vergleichbarkeit zu schaffen, wurden diese unter gleichen Bedingungen mitinkubiert. Die bestimmten Hemmdaten sind in Abb.4.6 gezeigt.



**Abbildung 4.6:** Hemmung an der bovinen Arginase I. Die gezeigten Daten sind MW  $\pm$  SD von mindestens vier Inkubationen.

Ferner wurde für *nor*-NHAM der  $K_i$ -Wert ermittelt, indem unterschiedliche Konzentrationen an Inhibitor mit unterschiedlichen Konzentrationen an Substrat inkubiert wurden. Bei den angegebenen  $K_i$ -Werten handelt es sich um den  $K_{ic}$ -Wert, der die Affinität eines kompetitiven Inhibitors zum katalytischen Zentrum beschreibt. Für jede Inhibitor-Konzentration wurden  $K_m$  und  $V_{max}$ -Werte berechnet, aus denen dann der  $K_i$ -Wert bestimmt wurde. Ebenso wurde der  $K_i$ -Wert für *nor*-NOHA ermittelt, obwohl dieser vielfach in der Literatur zu finden ist. Es sollte sichergestellt werden, dass keine fehlerhafte Interpretation der Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Testbedingungen erfolgt. Die ermittelten Daten sind in Tab. 4.1 aufgeführt.

**Tabelle 4.1:** Ermittelte  $K_i$ -Werte an der bovinen Arginase I. Die gezeigten Daten sind  $MW \pm SD$ . Die  $K_i$ -Wert-Bestimmung wurde mindestens doppelt durchgeführt.

Verbindung	Struktur	$K_i / \mu M$
<i>nor</i> -NHAM (54)		$4 \pm 1$
<i>nor</i> -NOHA (70)		$0,5 \pm 0,2$

#### 4.4 Diskussion und Ausblick

Die Synthese des *nor*-NHAM (54) gestaltete sich komplizierter als erwartet. Der geplante Syntheseweg in Anlehnung an die NHAM-Synthese bestand aus acht Schritten, die mehr oder weniger nach Literaturangaben modifiziert wurden. Das erste Problem ergab sich bei der Methylierung des doppelt geschützten *nor*-L-Ornithins (19). Durch Alkylierung mit Methyljodid wurden Substanzgemische unterschiedlich methylierter Produkte erhalten und bei der eleganteren, reduktiven Alkylierung kam es zur Zyklisierung des Edukts. Daraufhin wurde das gewählte Schutzgruppenkonzept überdacht und eine zweite Boc-Schutzgruppe an der  $\alpha$ -Aminogruppe eingeführt. Zuerst wurde versucht, diese auf Stufe der Cbz-, Boc- und *tert*-Butyl-geschützten Verbindung 50 einzuführen. Jedoch stellte sich heraus, dass dabei die  $\gamma$ -Aminofunktion bevorzugt doppelt geschützt wird. Deshalb wurde eine Änderung zu Beginn der Syntheseplanung vorgenommen und anstelle der Cbz-Schutzgruppe zuerst eine Phthalimid-Schutzgruppe am  $N^\gamma$ -Atom der Verbindung 48 eingeführt. Daraufhin gelang die weitere Synthese über eine Cyanamid-Zwischenstufe und lieferte *nor*-NHAM nach neun Syntheseschritten in einer Gesamtausbeute von 14% unter optimalen Synthesebedingungen.

Die *in vitro*-Testung an der bovinen Arginase I erfolgte nach einem im Arbeitskreis etablierten Plattenreader-Assay. Die erhaltenen Hemmdaten von *nor*-NHAM wurden mit denen der strukturverwandten Inhibitoren NOHA (45), *nor*-NOHA (70), und NHAM (46) verglichen. Dabei zeigte sich, dass *nor*-NHAM zwar ein potenterer Hemmstoff als NOHA und NHAM, jedoch weniger potent als *nor*-NOHA ist. Dies konnte auch bei der Bestimmung der  $K_i$ -Werte gezeigt werden, bei der *nor*-NOHA eine ca. 10fach höhere Affinität zur Arginase aufwies als *nor*-NHAM.

Hintergrund zur Synthese des *nor*-NHAM waren die Hemmeigenschaften von NOHA ( $K_i = 30 \mu\text{M}$ ), NHAM ( $K_i = 17 \mu\text{M}$ ) und *nor*-NOHA ( $K_i = 0,5 \mu\text{M}$ ) an der Arginase. Die Tatsache, dass die Einführung einer Methylgruppe am  $\text{N}^\delta$ -Atom bei NOHA eine Steigerung der Hemmpotenz ergab, führte zu der Annahme, dass selbige am  $\text{N}^\gamma$ -Atom bei *nor*-NOHA auch zu einer Steigerung der Hemmpotenz führen müsste. Leider konnte dies im *in vitro*-Experiment nicht bestätigt werden. Des Weiteren konnte auch die Überlegenheit von NHAM gegenüber NOHA nicht reproduziert werden. Der zuvor ermittelte  $K_i$ -Wert für NHAM wurde bei einem pH-Wert von 9,4 bestimmt. Da für die Hemmpotenz von NOHA bei physiologischem pH und dem von 9,4 kein Unterschied festgestellt wurde,<sup>[65]</sup> wurde postuliert, dass selbiges auch für NHAM gilt.<sup>[224]</sup> In dieser Arbeit wurden die Hemmdaten bei physiologischem pH bestimmt, was eine Ursache für die festgestellte Diskrepanz der Ergebnisse sein kann. Die durchgeführten Untersuchungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Einführung einer Methylgruppe am  $\text{N}^\delta$ - bzw.  $\text{N}^\gamma$ -Atom eher zu einer Affinitätsminderung als zu einer Steigerung führt.

Dennoch konnte mit *nor*-NHAM ein neuer, sehr potenter Inhibitor der Arginase entwickelt werden. Obwohl die Einführung der Methylgruppe zu einem gewissen Affinitätsverlust zum Enzym geführt hat, kann dies aus Sicht der Metabolisierung einen Vorteil bedeuten. Betrachtet man die Untersuchung der Biotransformation von NOHA und NHAM, so ist erkennbar, dass NOHA schneller metabolisiert wird als NHAM. Die auf die Reduktion von BAO normierten Daten sind in Kapitel 3.4.5.2.3 dargestellt. Da es sich bei *nor*-NOHA und *nor*-NHAM jeweils um die *nor*-L-Arginin-Derivate der oben genannten Verbindungen handelt, dürfte die Metabolisierung hier ähnlich verlaufen. Für *nor*-NHAM heißt das, dass es zwar in seiner Affinität zum Enzym und damit in der Hemmstärke *nor*-NOHA unterlegen ist, jedoch geringeren Metabolisierungs-Prozessen unterliegt und somit eine längere Halbwertszeit aufweist. Dies kann sich in einer verlängerten Wirkdauer bemerkbar machen. Besonders interessant ist dieser Aspekt für die Anwendung bei der Indikation Asthma bronchiale. Je seltener ein Arzneistoff eingenommen (inhaliert) werden muss, desto besser ist die Patienten-Compliance und der Therapieerfolg.

In fortführenden Arbeiten wären von Interesse, diese aufgestellten Hypothesen durch geeignete Biotransformations- und Wirksamkeitsstudien zu belegen. Zunächst sollte die Biotransformation durch *in vitro*-Testungen an subzellulären Fraktionen sowie dem rekombinanten, mARC-haltigen Enzymsystem untersucht werden, um zu zeigen, dass *nor*-NHAM langsamer metabolisiert wird als *nor*-NOHA. Des Weiteren besteht die

Notwendigkeit, die an boviner Arginase gewonnenen *in vitro*-Ergebnisse am humanen Enzym zu reproduzieren bzw. mögliche Unterschiede zu analysieren. In diesem Zusammenhang sollten zusätzlich die hier verglichenen Substanzen hinsichtlich ihrer Selektivität gegenüber anderen wichtigen Enzymen der physiologischen NO-Bereitstellung (NOSs und DDAH) untersucht werden, um eine antagonistische Wirkung auszuschließen. Für NHAM und andere methylierte Arginine wurde festgestellt, dass die NOSs nur sehr schwach und die DDAH gar nicht gehemmt werden.<sup>[205]</sup> Für *nor*-NHAM dürfte die gleiche gute Selektivität gegeben sein.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

---

Stickstoffmonoxid (NO) erfüllt im Stoffwechsel viele physiologische Funktionen. Eine Dysregulation ist mit unterschiedlichen Krankheiten sowohl durch erhöhte als auch erniedrigte NO-Spiegel assoziiert. Daher stellt die Beeinflussung seiner Konzentration einen wertvollen therapeutischen Ansatz dar. Hierbei ist es wichtig, unterschiedliche Gewebe und Funktionen des NO zu unterscheiden, damit möglichst gezielt therapiert werden kann. Bereitgestellt wird NO aus L-Arginin durch die NO-Synthasen (NOSs), aber die NO-Bioverfügbarkeit wird u. a. auch indirekt durch andere Enzyme beeinflusst.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich auf die Hemmstoffentwicklung für zwei dieser Enzyme, die Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) und die Arginase, konzentriert. Die DDAH baut die physiologischen Hemmstoffe ( $N^G, N^G$ -Dimethyl-L-arginin (ADMA),  $N^G$ -Monomethyl-L-arginin (NMMA)) der NOSs ab. Ihre Inhibition führt zur Erhöhung der Hemmstoff-Spiegel und senkt darüber die NO-Freisetzung durch die NOSs. Gleichzeitig gibt es auch Krankheiten, wie z. B. Morbus Alzheimer, die mit einem erniedrigten ADMA-Spiegel in Verbindung stehen und eine DDAH-Hemmung hier ein direkter Therapieansatz bedeutet. Die Arginase konkurriert mit den NOSs um das gemeinsame Substrat L-Arginin. Eine Enzymhemmung steigert die Substratverfügbarkeit für die NOSs, was in einer NO-Erhöhung resultiert. Bei einigen Krankheitsbildern, z. B. Asthma bronchiale, und auch im Alter ist die Arginase-Aktivität/Expression gesteigert, sodass eine Hemmung in diesem Kontext von großem Interesse ist.

Auf Basis der bekannten Röntgenkristallstrukturen der hDDAH-1 wurde im Rahmen dieser Arbeit mit AFMoC ein 3D-QSAR-Modell zur Vorhersage der biologischen Aktivität neuer DDAH-Inhibitoren erstellt. Mit einem  $q^2$ -Wert von 0,59 besitzt dieses Modell eine gute Vorhersagekraft. Aufgrund des vergleichsweise kleinen Trainingsdatensatzes von 15 bekannten Inhibitoren wurde ein Mix-Koeffizient aus AFMoC und DrugScore errechnet und in fortführenden Berechnungen eingesetzt. Der erstellte Testdatensatz besteht aus einer Reihe bekannter Strukturen (R-Reihe), jedoch ohne bekannten  $K_i$ -Wert, und einer Reihe hypothetischer neuer Inhibitoren (TV-Reihe). Für diese Verbindungen wurden mit dem Modell  $pK_i$ -Werte berechnet. Als beste Verbindung wurde TV 24 vorhergesagt, das Amidin-

Analogon des potenten, bekannten Inhibitors L-257 ( $K_i = 13 \mu\text{M}$ ). Für Verbindungen ohne Carboxylgruppe wurden deutlich niedrigere  $pK_i$ -Werte (geringere Hemmpotenz) berechnet als für die Derivate mit Carboxylgruppe.

Anhand der Schrödinger Software Glide wurden die Bindemodi substratanaloger, Guanidin- und Amidin-basierter Inhibitoren im Komplex mit der hDDAH-1 näher betrachtet. Anhand der berechneten Wasserstoffbrückenbindungen konnte gezeigt werden, dass bei Guanidin- im Gegensatz zu Amidin-basierten Hemmstoffen die Carboxylgruppe als verzichtbar einzustufen ist, ohne dass die biologische Aktivität bedeutend abnimmt.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten DDAH-Inhibitoren sollten in den Aspekten Hemmpotenz, Selektivität gegenüber den NOSs und der Arzneistoffqualitäten bekannten Inhibitoren überlegen sein. Ferner sollten sie zur Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen beitragen. Als Leitstrukturen für die Synthese dienten die bekannten hDDAH-1-Inhibitoren L-257 ( $K_i = 13 \mu\text{M}$ ) und dessen Weiterentwicklung AbMEG (**27**,  $K_i = 18 \mu\text{M}$ ) sowie der derzeit potenteste DDAH-Inhibitor Vinyl-NIO ( $K_i = 2 \mu\text{M}$ ) und decVNIO ( $K_i = 768 \mu\text{M}$ ).

Mittels Pinner-Synthese konnte der 2-Methoxyethyl-Rest des L-257/AbMEG auf Amidine in guten Ausbeuten übertragen werden. Homologe Reihen von Methoxyalkyl-*N*-imino-*L*-ornithinen (NIOs, **1a-c**) bzw. deren decarboxylierten Derivaten (NIOdecs, **2a-c**) sowie das Methoxypropyl-*N*-imino-*nor-L*-ornithin (**21**) wurden synthetisiert. Darüber hinaus wurde das decarboxylierte Derivat von Butenyl-Arg (**22**), das AbBG (**26**), über eine Thioharnstoff-Zwischenstufe mit EDCI als Entschwefelungsreagenz in guten Ausbeuten hergestellt.

In *in vitro*-Experimenten wurde die Aktivität der Verbindungen an zentralen Enzymen der NO-Bereitstellung (DDAH, NOSs, Arginase) untersucht. Dabei wurde die stärkste Potenz an der DDAH bei dem NIO-Derivat **1b** ( $K_i = 9 \mu\text{M}$ ) festgestellt. Bezüglich der Struktur-Wirkungsbeziehungen lieferten die *in vitro*-Testdaten wichtige Erkenntnisse. Es konnte gezeigt werden, dass Amidine mit Carboxyl-Funktion im Vergleich zu solchen ohne diese Funktionalität eine wesentlich bessere Hemmpotenz aufweisen, was die Ergebnisse der Docking-Studie aus Kapitel 2.3 in diesem Punkt bestätigt. Ferner kann die These, dass die Kettenlänge zwischen Aminogruppe und Amidin- bzw. Guanidin-Funktion für eine gute Hemmwirkung mindestens vier C-Atome betragen muss, bekräftigt werden. Die schon länger bekannte Verbindung AbMEG (**27**) zeigt eine hohe Hemmpotenz, obwohl die  $\alpha$ -Carbonsäure nicht mehr vorhanden ist. Offenbar wird durch die Guanidin-Funktion dieser Verbindung eine

so hohe Wechselwirkung erreicht, dass die Carbonsäure entbehrlich wird. Dies zeigt sich auch an der Verbindung AbBG (**26**), die ebenfalls eine Guanidin-Funktion trägt und keine Carbonsäure und trotzdem ebenfalls so gut hemmt wie die Verbindung mit Carbonsäure (**22**). Amidine, mit einem Stickstoff weniger und damit geringeren Wechselwirkungen, benötigen hingegen die Carbonsäure, um eine gute Aktivität aufzuweisen (s. **1a-c** (mit Carbonsäure) und **2a-c** (ohne Carbonsäure)). Zur Absicherung dieser Aussage sollte in fortführenden Arbeiten eine Röntgenkristallstruktur der hDDAH-1 im Komplex mit AbMEG (**27**) erzeugt werden, um den Bindemodus zu untersuchen.

In Hinblick auf eine Selektivität gegenüber Arginase und NOSs hat sich der potenteste neu entwickelte DDAH-Inhibitor **1b** als die am wenigsten selektive Verbindung im Vergleich zu den anderen neuen Substanzen herausgestellt. Demnach bleibt AbMEG (**27**) der Kandidat mit den besten Eigenschaften in den drei gewünschten Aspekten Hemmpotenz, Selektivität und Arzneistoffcharakter.

Zur Steigerung der oralen Bioverfügbarkeit sollten Prodrugs für AbMEG (**27**) entwickelt werden. Hierfür wurden Konzepte zur Senkung der Basizität, Erhöhung der Lipophilie und Ansteuerung von Transportern betrachtet. In die basische Guanidin-Funktion wurde eine Hydroxylgruppe eingeführt, die für weitere Derivate methyl- bzw. galaktosylsubstituiert werden sollte. Das Hydroxyguanidin **32a** und das *O*-Methyl-Hydroxyguanidin **32b** konnten über intermediäre Thioharnstoffe mit EDCI als Entschwefelungsreagenz in guten Ausbeuten aufgebaut werden. Diese Thioharnstoffe beinhalten bereits *O*-substituierte Hydroxylamine und ermöglichen dadurch einen neuen Ansatz zur Darstellung *O*-substituierter Hydroxyguanidine. Das *O*-Galaktosyl-Prodrug **32c** konnte auf diesem und anderen getesteten Wegen bisher nicht hergestellt werden.

Die Prodrugs **32a,b** stellen durch ihre verbesserten physikochemischen Eigenschaften eine Optimierung von AbMEG (**27**) dar. Zu diesen Eigenschaften zählen eine gesenkte Basizität ( $\text{pK}_{\text{a}}(\text{Guanidin}, 27) = 12,55$ ;  $\text{pK}_{\text{a}}(\text{Hydroxyguanidin } 32\text{a,b}) = 7,71$ ) sowie für das *O*-methylierte Prodrug (**32b**) eine erhöhte Lipophilie ( $\text{clogP}_{(27,32\text{a})} = -0,95$ ;  $\text{clogP}_{(32\text{b})} = -0,57$ ). Eine bessere orale Bioverfügbarkeit ist dadurch aller Voraussicht nach gegeben. Im Gegensatz zu anderen literaturbeschriebenen Hydroxyguanidinen konnte für beide Prodrugs eine sehr gute hydrolytische Stabilität festgestellt werden. Die stärkste Zersetzung fand bei dem freien Hydroxyguanidin **32a** bei pH 9,0 statt, bei dem nach 24 Stunden bei 37°C noch 86% der Verbindung detektierbar war. Eine Bioaktivierung zum aktiven Metaboliten konnte für **32a**

gezeigt werden. Die Aktivierung von **32b** durch *O*-Desalkylierung und anschließende Reduktion wurde bisher nicht überprüft, ist aber für ähnliche Verbindungen beschrieben und daher sehr wahrscheinlich. Interessant für folgende Arbeiten ist die weiterführende Charakterisierung der hier vorgestellten Prodrugs sowie eine Untersuchung der *in vivo*-Wirksamkeit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuer Hemmstoff der Arginase, das *N*<sup>6</sup>-Hydroxy-*N*<sup>7</sup>-methyl-*nor*-L-arginin (*nor*-NHAM, **54**), synthetisiert. Begründung für diesen Ansatz bieten die Hemmeigenschaften bekannter strukturverwandter Verbindungen. Die Einführung einer Methylgruppe am *N*<sup>δ</sup>-Atom bei NOHA (**45**) führte in vorangegangenen Arbeiten zu einer Steigerung der Hemmpotenz ( $K_{i(\text{NOHA}, 45)} = 30 \mu\text{M}$ ;  $K_{i(\text{NHAM}, 46)} = 17 \mu\text{M}$ ), genauso wie eine Verkürzung der Hauptkette um eine Methyleneinheit ( $K_{i(\text{nor-NOHA}, 70)} = 0,5 \mu\text{M}$ ). Eine Kombination dieser Modifikationen, sprich die Einführung einer Methylgruppe am *N*<sup>γ</sup>-Atom bei *nor*-NOHA, war aus rationaler Sicht ein vielversprechender Ansatz und sollte in einer weiteren Steigerung der Hemmpotenz resultieren. Die Synthese des *nor*-NHAM gelang durch ein striktes Schutzgruppenkonzept, bei dem es wichtig war, die  $\alpha$ -Aminogruppe der Ausgangsverbindung *nor*-L-Ornithin doppelt zu schützen. Die Zielverbindung konnte in einer insgesamt neun Stufen umfassenden Synthese in einer Gesamtausbeute von 14% aufgebaut werden.

Durch Vergleich der *in vitro*-Daten an der bovinen Arginase I zeigte sich, dass *nor*-NHAM zwar ein potenterer Hemmstoff als NOHA und NHAM ist, *nor*-NOHA jedoch unterlegen ist. Bei der Bestimmung der  $K_i$ -Werte konnte gezeigt werden, dass *nor*-NOHA ( $K_i = 0,5 \mu\text{M}$ ) eine ca. 10fach höhere Affinität zur Arginase besitzt als *nor*-NHAM ( $K_i = 4 \mu\text{M}$ ). Allerdings konnte die, der Synthese zugrunde liegende, in vorherigen Arbeiten beschriebene Überlegenheit von NHAM gegenüber NOHA ebenfalls nicht reproduziert werden. Die Einführung einer Methylgruppe am *N*<sup>δ</sup>- bzw. *N*<sup>γ</sup>-Atom führt laut neuesten Erkenntnissen eher zu einer Affinitätsminderung als zu einer Steigerung.

*nor*-NHAM ist ein neuer, sehr potenter Inhibitor der Arginase, der *in vivo* in einem geringeren Ausmaß als *nor*-NOHA metabolisiert werden sollte, analog zur bekannten Biotransformation von NHAM vs. NOHA. Dies würde in einer längeren Halbwertszeit und somit längeren Wirkdauer bzw. einer besseren Bioverfügbarkeit durch einen geringeren First-Pass-Effekt resultieren. *nor*-NHAM sollte daher *nor*-NOHA einer Anwendung als Arzneistoff vorgezogen werden.

In fortführenden Arbeiten ist es wichtig, die hier aufgestellten Hypothesen zum *nor*-NHAM durch geeignete Studien zu belegen. Dabei gilt es insbesondere, die langsamere Biotransformation zu beweisen. Des Weiteren sollten die Verbindungen am humanen Enzym sowie auf Selektivität gegenüber NOSs und DDAH untersucht werden. Zum Erreichen einer guten oralen Bioverfügbarkeit sollten Prodrugs analog zur Darstellung anderer Hydroxyguanidine (NOHA (**45**), *N*-OH-AbMEG (**32a**)) synthetisiert werden. Dies ist besonders für Indikationen wie der endothelialen oder auch der erektilen Dysfunktion, die mit altersabhängiger, erhöhter Arginase-Aktivität in Zusammenhang stehen und einer peroralen Applikation bedürfen interessant.

## 6 Experimenteller Teil

---

### 6.1 Synthesen

#### 6.1.1 Geräte und Materialien

##### NMR-Spektroskopie

Kernresonanzspektrometer Bruker ARX 300, Bruker Topspin 2.1 Software

$^1\text{H}$ -NMR: Messfrequenz = 300.13 MHz

$^{13}\text{C}$ -NMR: Messfrequenz = 75.47 MHz

$^{15}\text{N}$ -NMR: Messfrequenz = 30.42 MHz

Interne Standards: Tetramethylsilan (TMS) bei  $\text{CDCl}_3$ , Natrium 4,4-Dimethyl-4-sila-pentansulfonat (DSS) bei  $\text{D}_2\text{O}$ . Bei  $\text{DMSO-d}_6$  wurden die Verschiebungen auf die Restlösungsmittelsignale bezogen. Zur Charakterisierung der Signale werden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett eines Dubletts, dddd = Dublett eines Dubletts eines Dubletts eines Dubletts, t = Triplett, q = Quartett, sx = Sextett, m = Multiplett, br = verbreitertes Signal,  $J$  = Kopplungskonstante in Hz

Die Auswertung erfolgt nach den Regeln für Spektren 1. Ordnung.

##### Massenspektrometrie

Bruker Esquire-LC, Elektrosprayionisierung (ESI),

Methode A: Direkteinlass als Methanol-Wasser-Lösung

Methode B: Säule: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8,  $125 \times 4.6$  mm, 5  $\mu\text{m}$ ; Eluent A: 10% Acetonitril, 90% 0,1%ige Essigsäure; Eluent B: 95% Acetonitril, 5% 0,1 %ige Essigsäure; Gradient: 0-5 min (0-60% B), 5-10 min (60-100% B), 10-12 min (100%B), 12-13 min (100-0% B), 13-15 min (0% B); Flussrate: 1 ml/min

##### Hochauflösende Massenspektrometrie

Bruker Daltonics Apex II 7 Tesla FT-ICR Massenspektrometer, ESI am Institut für Analytische Chemie der Universität Leipzig

### Schmelzpunkte

Schmelzpunktapparatur Stuart Scientific SMP3, die Angabe der Schmelzpunkte erfolgt unkorrigiert.

### Elementaranalysen

Institut für Anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (CHNS-Analysator der Firma HEKAtech GmbH).

### Dünnschichtchromatographie:

DC-Fertigplatten: Polygram SIL G/UV<sub>254</sub> 0.2 mm Kieselgel (Macheryl-Nagel, Düren)

Detektion erfolgte durch:

- UV-Licht bei 254 nm (Fluoreszenzlöschung),
- Ninhydrin-Sprühlösung: 150 mg Ninhydrin, 47,5 ml *i*-Propanol, 2,5 ml Eisessig
- FCNP-Sprühlösung: 1 g NaOH, 1 g Nitroprussid-Natrium, 1 g K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] gelöst zu 60 ml Wasser. Vor Anwendung mit der gleichen Menge Aceton zu verdünnen.
- Cer(IV)sulfat-Oxidations-Sprühlösung: 0,2% (m/v) Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 5% (m/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5% (m/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Mo<sub>3</sub>O<sub>7</sub> in Ethanol
- Iod-Kammer

### Präparative Chromatographie

Die säulenchromatographische Aufreinigung der Rohprodukte erfolgte über Kieselgel G60, 0,063-0,2 mm (Macheryl-Nagel, Düren)

Die Flashchromatographie über RP<sub>18</sub>-Säulen (RediSep<sup>®</sup>) wurde mit der CombiFlash<sup>®</sup> RETRIEVE durchgeführt.

### Chemikalien

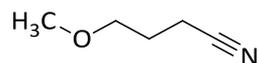
Die verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen ABCR, Acros, Bachem, CNH Technologies, Fluorochem Ltd, LT Pharmatech, Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen und ohne vorherige Aufreinigung verwendet.

Das Reduktionsmittel Zinkborhydrid-*N*-methylpiperidin (ZBNMPP) wurde nach einer Literaturvorschrift von Alinezhad *et al.* synthetisiert.<sup>[214]</sup>

## 6.1.2 Synthesevorschriften

### 6.1.2.1 Darstellung von Methoxyalkylamidinen

#### 6.1.2.1.1 4-Methoxybutyronitril (8)<sup>[157]</sup>



*Synthese nach Zhi et al.* [2003].<sup>[157]</sup>

Eine Lösung von 5 g (32,7 mmol) 1-Brom-3-methoxypropan in 5 ml Methanol wird tropfenweise über 30 Minuten zu einer rührenden Lösung von 3,4 g (52,3 mmol) KCN in 5 ml Methanol und 5 ml Wasser gefügt. Der Ansatz wird 20 Stunden zum Rückfluss erhitzt, abkühlen gelassen und mit 10 ml Wasser versetzt. Die wässrige Phase wird 4-mal mit je 10 ml Ethylacetat extrahiert, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und am Rotationsverdampfer einkonzentriert. Zur weiteren Aufreinigung wird das Produkt mittels Mikrodestillationsapparatur destilliert. Siedepunkt: 168-169°C

Ausbeute: 1,7 g einer farblosen Flüssigkeit (52%) (Literatur: 86%)

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

δ/ppm = 1.78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.50 (t, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CN), 3.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3.38 (t, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>)

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.

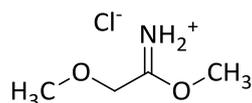
### 6.1.2.1.2 Methoxyalkylimidoester

Allgemeine Vorschrift in Anlehnung an Bretscher et al. [2003]:<sup>[156]</sup>

20 mmol des entsprechenden Methoxyalkylnitrils werden in 40 mmol trockenem Methanol gelöst und 30 Minuten lang in einem Eis-Wasserbad auf ca. 5 °C gekühlt. Anschließend wird HCl (g) für ca. 5 Minuten durch die Lösung geleitet. Der Kolben wird verschlossen und 20-24 Stunden im Kühlschrank stehen gelassen. Dann wird die Lösung auf 100 ml trockenen Diethylether gegossen und ein Feststoff präzipitiert.

Alle Imidoester hydrolysieren sehr schnell, sodass sowohl die Massen- als auch die NMR-Spektren Zersetzungsprodukte enthalten.

#### 6.1.2.1.2.1 2-Methoxyethanimidsäuremethylester Hydrochlorid (9a)



Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und über Phosphorpentoxid getrocknet. Die Lagerung erfolgt im Kühlschrank.

Ausbeute: 2,65g feines, weißes Pulver (95%)

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

δ/ppm = 3.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O-CH<sub>2</sub>), 4.13 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 4.39 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 11.56 (br s, 2H, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>).

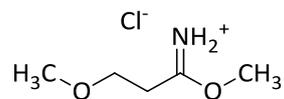
#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

δ/ppm = 59.2 (CH<sub>3</sub>-O), 59.9 (O-CH<sub>3</sub>), 68.0 (O-CH<sub>2</sub>), 177.5 (C=N)

#### MS (ESI)

m/z = 104 [M + H]<sup>+</sup>

### 6.1.2.1.2.2 3-Methoxypropanimid säuremethylester Hydrochlorid (9b)



Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und über Phosphorpentoxid getrocknet. Die Lagerung erfolgt unter Argon im Kühlschrank.

Ausbeute: 2,76 g feines, weißes, leicht hygroskopisches Pulver (90%)

#### $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ )

$\delta/\text{ppm} = 2.91$  (t,  $^3J = 6.0$  Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O-CH<sub>2</sub>), 3.62 (t,  $^3J = 6.0$  Hz, 2H, CH<sub>3</sub>-O-CH<sub>2</sub>), 4.10 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 11.89 (br s, 2H, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)

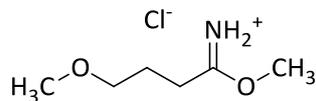
#### $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ )

$\delta/\text{ppm} = 33.0$  (CH<sub>2</sub>-C=N), 58.0 (CH<sub>3</sub>-O), 59.6 (O-CH<sub>3</sub>), 66.7 (O-CH<sub>2</sub>), 178.3 (C=N)

#### MS (ESI)

$m/z = 118$  [M + H]<sup>+</sup>

### 6.1.2.1.2.3 4-Methoxybutanimidsäuremethylester Hydrochlorid (9c)



Der Diethylether wird vom ausgefallenen Feststoff abdekantiert, da das Produkt sehr hygroskopisch ist und sich beim Abfiltrieren sofort verflüssigt. Anschließend wird das Restlösungsmittel im Vakuum entfernt und über Phosphorpentoxid getrocknet. Die Lagerung erfolgt unter Argon im Kühlschrank.

Ausbeute: 3,05 g weißes, stark hygroskopisches Pulver (92%)

#### $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ )

$\delta/\text{ppm} = 1.99$  (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 2.81 (t,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-C=N}$ ), 3.28 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 3.43 (t,  $^3J = 5.6$  Hz, 2H,  $\text{O-CH}_2$ ), 4.24 (s, 3H,  $\text{O-CH}_3$ ), 11.44, 12.35 (2 x br s, 2 x 1H,  $\text{NH}_2^+$ )

#### $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ )

$\delta/\text{ppm} = 25.0$  ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 29.8 ( $\text{CH}_2\text{-C=N}$ ), 57.8 ( $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 59.6 ( $\text{O-CH}_3$ ), 70.1 ( $\text{O-CH}_2$ ), 179.8 ( $\text{C=N}$ )

#### MS (ESI)

$m/z = 154$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ , 132 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$

### 6.1.2.1.3 Methoxyalkylamidine, geschützte Vorstufen

Methode A – *Vorschrift in Anlehnung an Bretscher et al. [2003].<sup>[156]</sup>*

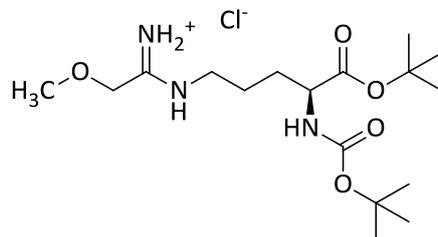
Es werden 1 mmol des entsprechenden Amins **10**, **11** oder **19** und 3 mmol des jeweiligen Imidoesters **9a-c** in 10 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird mit Natronlauge auf pH 10 eingestellt und im Laufe der Reaktion regelmäßig kontrolliert und gegebenenfalls erneut eingestellt. Der Ansatz wird zwei Stunden bei 0°C und danach zwei weitere Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wird mit verdünnter Salzsäure auf pH 7 eingestellt und über Nacht rühren gelassen. Am Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel bei ca. 45°C im Vakuum abgezogen.

#### Methode B

Es werden 1 mmol des Amins **10** und 3 mmol des jeweiligen Imidoesters **9a-b** in 15 ml Methanol gelöst. Zu dieser Lösung werden 1 ml DIPEA und ein Kristall DMAP hinzugefügt. Der Ansatz wird 8 Stunden bei 0°C und dann unter langsamer Erwärmung auf Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer im Vakuum abgezogen.

Eine weitere Aufreinigung erfolgt bei beiden Methoden über eine Kieselgelsäulenchromatographie mit Ethylacetat/Methanol (6:1) als Elutionsmittel.

**6.1.2.1.3.1 *N*<sup>2</sup>-(*t*-Butoxycarbonyl)-*N*<sup>5</sup>-(1-imino-2-methoxyethyl)-L-ornithin-*t*-butylester  
Hydrochlorid (12a)**



Die Darstellung erfolgt nach Methode B.

Ausbeute: 280 mg eines farblosen Öls (71%)

DC:  $R_f = 0,44$  (Ethylacetat/Methanol 3:2)

Detektion: Ninhydrin

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 1.39 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.40 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.52-1.70 (m, 4H, 3,4-CH<sub>2</sub>), 3.25 (m, 2H, 5-CH<sub>2</sub>), 3.51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3.78 (m, 1H, CH), 4.25 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 7.10 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, NH-Boc), 9.01, 9.17, 9.55 (3 x br s, 3 x 1H, NH, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)

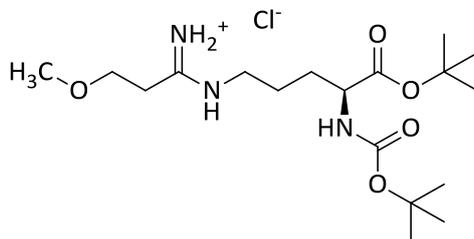
<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 24.0 (4-CH<sub>2</sub>), 27.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.7 (3-CH<sub>2</sub>), 28.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 41.2 (5-CH<sub>2</sub>), 54.0 (CH), 58.9 (CH<sub>3</sub>), 68.0 (2'-CH<sub>2</sub>), 78.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 80.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.5 (C=O-Boc), 163.7 (C=O<sup>t</sup>Bu), 171.6 (C=N)

MS (ESI)

$m/z = 360$  [M + H]<sup>+</sup>

**6.1.2.1.3.2 *N*<sup>2</sup>-(*t*-Butoxycarbonyl)-*N*<sup>5</sup>-(1-imino-3-methoxypropyl)-L-ornithin-*t*-butylester Hydrochlorid (12b)**



Die Darstellung erfolgt nach Methode B.

Ausbeute: 323 mg eines farblosen Öls (79%)

DC:  $R_f = 0,51$  (Ethylacetat/Methanol 3:2)

Detektion: Ninhydrin

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 1.38 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.39 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.50-1.73 (m, 4H, 3,4-CH<sub>2</sub>), 2.69 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.1 Hz, 2H, 2'-CH<sub>2</sub>), 3.20 (m, 2H, 5-CH<sub>2</sub>), 3.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3.64 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.1 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3.77 (m, 1H, CH), 7.10 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, 1H, NH-Boc), 8.80, 9.31, 9.77 (3 x br s, 3 x 1H, NH, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)

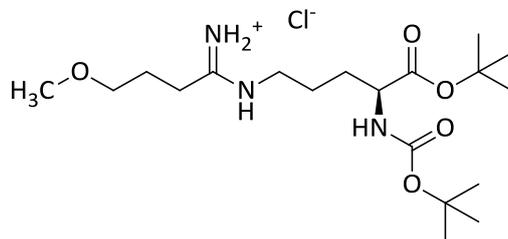
<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 24.0 (4-CH<sub>2</sub>), 27.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.7 (3-CH<sub>2</sub>), 28.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.7 (2'-CH<sub>2</sub>), 41.4 (5-CH<sub>2</sub>), 54.0 (2-CH), 57.9 (CH<sub>3</sub>), 68.4 (3'-CH<sub>2</sub>), 78.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 80.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.5 (C=O-Boc), 165.0 (C=O<sup>t</sup>Bu), 171.6 (C=N)

MS (ESI)

$m/z = 374$  [M + H]<sup>+</sup>

**6.1.2.1.3.3 *N*<sup>2</sup>-(*t*-Butoxycarbonyl)-*N*<sup>5</sup>-(1-imino-4-methoxybutyl)-*L*-ornithin-*t*-butylester Hydrochlorid (12c)**



Die Darstellung erfolgt nach Methode A.

Ausbeute: 351 mg eines farblosen Öls (83%)

DC:  $R_f = 0,21$  (Ethylacetat/Methanol 9:1)

Detektion: Ninhydrin

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

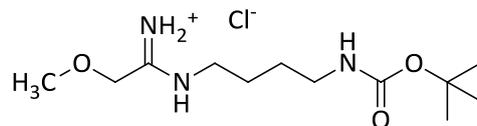
$\delta$ /ppm = 1.38, 1.39 (2 x s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.49-1.89 (m, 6H 3,4,3'-CH<sub>2</sub>), 2.44 (t, <sup>3</sup>J = 7.7 Hz, 2H, 2'-CH<sub>2</sub>), 3.17 (m, 2H, 5-CH<sub>2</sub>), 3.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3.33 (t, <sup>3</sup>J = 6.1, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3.78 (m, 1H, 2-CH), 7.09 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, NH-Boc), 8.61, 9.13, 9.49 (3 x br s, 3 x 1H, NH, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 24.0 (4-CH<sub>2</sub>), 26.8 (3'-CH<sub>2</sub>), 27.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.7 (3-CH<sub>2</sub>), 28.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.4 (2'-CH<sub>2</sub>), 41.3 (5-CH<sub>2</sub>), 54.0 (2-CH), 57.8 (CH<sub>3</sub>), 70.6 (4'-CH<sub>2</sub>), 78.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 80.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.5 (C=O-Boc), 166.9 (C=O<sup>t</sup>Bu), 171.6 (C=N)

MS (ESI)

$m/z = 388$  [M + H]<sup>+</sup>

6.1.2.1.3.4 *N*-[4-(*t*-Butoxycarbonyl)-aminobutyl]methoxymethanamin Hydrochlorid (13a)

Die Darstellung erfolgt nach Methode A.

Ausbeute: 294 mg eines farblosen Öls (90%)

DC:  $R_f = 0,23$  (Ethylacetat/Methanol 7:3)

Detektion: Ninhydrin

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )

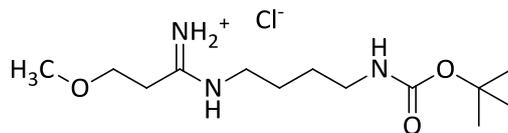
$\delta/\text{ppm} = 1.37$  (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.38-1.53 (m, 4H,  $2',3'\text{-CH}_2$ ), 2.92 (q,  $^3J = 6.6$  Hz, 2H,  $4'\text{-CH}_2$ ), 3.28 (t,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H,  $1'\text{-CH}_2$ ), 3.34 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 4.27 (s, 2H,  $\text{O-CH}_2$ ), 6.82, 9.12, 9.23, 9.70 (4 x br s, 4 x 1H, 2 x NH,  $\text{NH}_2^+$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )

$\delta/\text{ppm} = 24.7$  ( $3'\text{-CH}_2$ ), 26.6 ( $2'\text{-CH}_2$ ), 28.2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 39.2 ( $4'\text{-CH}_2$ ), 41.4 ( $1'\text{-CH}_2$ ), 58.8 ( $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 67.9 ( $\text{O-CH}_2$ ), 77.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 155.6 ( $\text{C=O}$ ), 163.4 ( $\text{C=N}$ )

MS (ESI)

$m/z = 260$   $[\text{M} + \text{H}]^+$

6.1.2.1.3.5 *N*-[4-(*t*-Butoxycarbonyl)-aminobutyl]-2-methoxyethanamidin Hydrochlorid (13b)

Die Darstellung erfolgt nach Methode A.

Ausbeute: 213 mg eines weißen Schaums (67%)

DC:  $R_f = 0,30$  (Ethylacetat/Methanol 4:1)

Detektion: Ninhydrin

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )

$\delta/\text{ppm} = 1.37$  (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.39-1.52 (m, 4H, 2',3'- $\text{CH}_2$ ), 2.68 (t,  $^3J = 6.3$  Hz, 2H, 2- $\text{CH}_2$ ), 2.92 (q,  $^3J = 6.5$  Hz, 2H, 4'- $\text{CH}_2$ -NH), 3.21 (t,  $^3J = 6.5$  Hz, 2H, 1'- $\text{CH}_2$ ), 3.25 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -O), 3.62 (t,  $^3J = 6.2$  Hz, 2H, O- $\text{CH}_2$ ), 6.84 (t,  $^3J = 5.4$  Hz, 1H, NH-Boc), 8.78, 9.25, 9.72 (3 x br s, 3 x 1H, NH,  $\text{NH}_2^+$ )

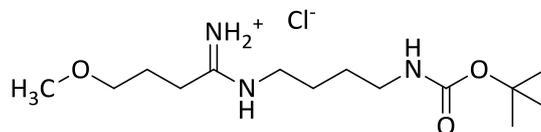
$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )

$\delta/\text{ppm} = 24.6$  (3'- $\text{CH}_2$ ), 26.7 (2'- $\text{CH}_2$ ), 28.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 32.8 (2- $\text{CH}_2$ ), 39.3 (4'- $\text{CH}_2$ ), 41.5 (1'- $\text{CH}_2$ ), 58.0 ( $\text{CH}_3$ -O), 68.4 (O- $\text{CH}_2$ ), 77.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 155.6 (C=O), 165.0 (C=N)

MS (ESI)

$m/z = 274$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ , 218 [ $\text{M} - \text{C}_4\text{H}_8 + \text{H}$ ] $^+$

**6.1.2.1.3.6 N-[4-(t-Butoxycarbonyl)-aminobutyl]-3-methoxypropanamidin Hydrochlorid (13c)**



Die Darstellung erfolgt nach Methode A.

Ausbeute: 278 mg eines farblosen Öls (86%)

DC:  $R_f = 0,37$  (Ethylacetat/Methanol 7:3)

Detektion: Ninhydrin

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )

$\delta/\text{ppm} = 1.38$  (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.39-1.53 (m, 4H,  $2',3'\text{-CH}_2$ ), 1.84 (m, 2H, 3- $\text{CH}_2$ ), 2.44 (t,  $^3J = 7.7$  Hz, 2H, 2- $\text{CH}_2$ ), 2.93 (q,  $^3J = 6.1$  Hz, 2H,  $4'\text{-CH}_2$ ), 3.18 (t,  $^3J = 6.9$  Hz, 2H,  $1'\text{-CH}_2$ ), 3.24 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 3.34 (t,  $^3J = 6.1$  Hz, 2H,  $\text{O-CH}_2$ ), 6.82 (t,  $^3J = 5.1$  Hz, 1H,  $\text{NH-Boc}$ ), 8.65, 9.05, 9.45 (3 x br s, 3 x 1H,  $\text{NH}$ ,  $\text{NH}_2^+$ )

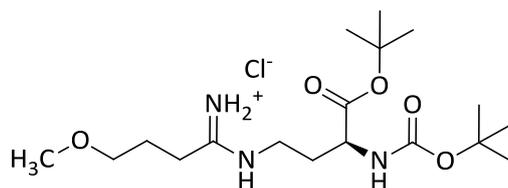
$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )

$\delta/\text{ppm} = 24.6$  ( $3'\text{-CH}_2$ ), 26.7 ( $2'\text{-CH}_2$ ), 26.8 (3- $\text{CH}_2$ ), 28.2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 29.5 (2- $\text{CH}_2$ ), 39.3 ( $4'\text{-CH}_2$ ), 41.5 ( $1'\text{-CH}_2$ ), 57.8 ( $\text{CH}_3\text{-O}$ ), 70.6 ( $\text{O-CH}_2$ ), 77.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 155.6 ( $\text{C=O}$ ), 166.9 ( $\text{C=N}$ )

MS (ESI)

$m/z = 288$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$

**6.1.2.1.3.7 *N*<sup>2</sup>-(*t*-Butoxycarbonyl)-*N*<sup>4</sup>-(1-imino-4-methoxybutyl)-*nor*-L-ornithin-*t*-butylester Hydrochlorid (20)**



Die Darstellung erfolgt nach Methode A.

Ausbeute: 209 mg eines farblosen Öls (51 %)

DC:  $R_f = 0,34$  (Ethylacetat/Methanol 7:3)

Detektion: Ninhydrin

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 1.38 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.39 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.77-1.91 (m, 4H 3,3'-CH<sub>2</sub>), 2.47 (t, <sup>3</sup>*J* = 8.1 Hz, 2H, 2'-CH<sub>2</sub>), 3.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3.25 (m, 2H, 4-CH<sub>2</sub>) 3.33 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.2, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3.87 (m, 1H, 2-CH), 7.27 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.7 Hz, 1H, NH-Boc), 8.88, 9.47, 9.77 (3 x br s, 3 x 1H, NH, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 26.7 (3'-CH<sub>2</sub>), 27.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.2 (3-CH<sub>2</sub>), 29.4 (2'-CH<sub>2</sub>), 38.9 (4-CH<sub>2</sub>), 52.1 (CH), 57.8 (CH<sub>3</sub>), 70.6 (4'-CH<sub>2</sub>), 78.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 80.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.4 (C=O-Boc), 167.1 (C=O<sup>t</sup>Bu), 171.2 (C=N)

MS (ESI)

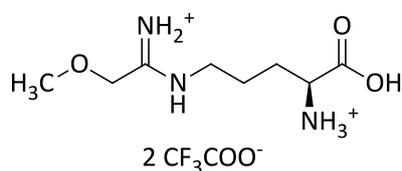
$m/z = 374$  [M + H]<sup>+</sup>

### 6.1.2.1.4 Methoxyalkylamidin - Trifluoracetate

Vorschrift in Anlehnung an Martin et al. [2006].<sup>[169]</sup>

0,5 mmol der geschützten Amidine **12a-c**, **13a-c** oder **20** werden in 5 ml TFA/Dichlormethan (1:1) für ca. 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Vakuum einkonzentriert. Der Rückstand wird mit etwas Wasser versetzt und zweimal mit Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase wird am Rotationsverdampfer einkonzentriert und über eine RP-18-Säule mittels Flashchromatographie aufgereinigt. Als Elutionsmittel dient *Aqua bidest.*

#### 6.1.2.1.4.1 *N*<sup>5</sup>-(1-Imino-2-methoxyethyl)-L-ornithinium Bis(trifluoracetat) (**1a**)



Ausbeute: 129 mg farbloses Öl (65%)

DC:  $R_f = 0,14$  (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig 8:2:0.5)

Detektion: Ninhydrin

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 1.50-1.90 (m, 4H, 3,4-CH<sub>2</sub>), 3.28 (m, 2H, 5-CH<sub>2</sub>), 3.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3.92 (m, 1H, CH), 4.23 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 8.32 (s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.97, 9.12, 9.46 (3 x br s, 3 x 1H, NH, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 23.2 (4-CH<sub>2</sub>), 27.3 (3-CH<sub>2</sub>), 41.0 (5-CH<sub>2</sub>), 51.7 (CH), 59.0 (CH<sub>3</sub>), 67.9 (2'-CH<sub>2</sub>), 164.0 (C=O), 170.8 (C=N)

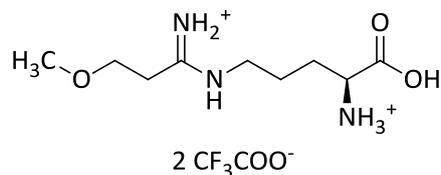
#### MS (ESI)

$m/z = 204$  [M + H]<sup>+</sup>, 187 [M - NH<sub>3</sub> + H]<sup>+</sup>

#### HRMS (ESI) für C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>:

berechnet: 160,14444

gemessen: 160,14450

6.1.2.1.4.2  $N^5$ -(1-Imino-3-methoxypropyl)-L-ornithinium Bis(trifluoracetat) (1b)

Ausbeute: 134 mg farbloses Öl (67%)

DC:  $R_f = 0,10$  (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig 8:2:0.5)

Detektion: Ninhydrin

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 1.53-1.90 (m, 4H, 3,4-CH<sub>2</sub>), 2.65 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.1 Hz, 2H, 2'-CH<sub>2</sub>), 3.23 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.2 Hz, 2H, 5-CH<sub>2</sub>), 3.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3.64 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.1 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3.80 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.2 Hz, 1H, 2-CH), 8.80, 9.31, 9.77 (3 x br s, 3 x 1H, NH, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 23.1 (4-CH<sub>2</sub>), 27.2 (3-CH<sub>2</sub>), 33.0 (2'-CH<sub>2</sub>), 40.9 (5-CH<sub>2</sub>), 51.6 (CH), 58.9 (CH<sub>3</sub>), 67.9 (O-CH<sub>2</sub>), 164.0 (C=O), 170.8 (C=N)

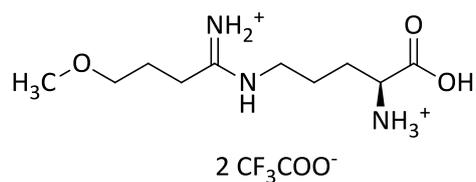
MS (ESI)

$m/z = 218$  [M + H]<sup>+</sup>

HRMS (ESI) für C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>:

berechnet: 218,14992

gemessen: 218,15005

6.1.2.1.4.3  $N^5$ -(1-Imino-4-methoxybutyl)-L-ornithinium Bis(trifluoracetat) (1c)

Ausbeute: 135 mg farbloses Öl (75 %)

DC: R<sub>f</sub> = 0,12 (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig 8:2:0.5)

Detektion: Ninhydrin

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 1.54-1.86 (m, 6H, 3,3',4-CH<sub>2</sub>), 2.41 (t, <sup>3</sup>J = 7.7 Hz, 2H, 2'-CH<sub>2</sub>), 3.18 (t, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 2H, 5-CH<sub>2</sub>), 3.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3.32 (t, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3.41 (t, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 1H, CH), 8.85, 9.03, 9.95 (3 x br s, 3 x 1H, NH, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 23.3 (4-CH<sub>2</sub>), 26.6 (3'-CH<sub>2</sub>), 27.9 (3-CH<sub>2</sub>), 29.7 (2'-CH<sub>2</sub>), 41.3 (5-CH<sub>2</sub>), 52.9 (CH), 57.9 (CH<sub>3</sub>), 70.6 (O-CH<sub>2</sub>), 167.1 (C=O), 170.3 (C=N)

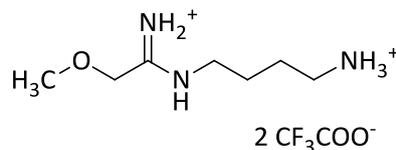
MS (ESI)

m/z = 232 [M + H]<sup>+</sup>

HRMS (ESI) für C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>:

berechnet: 232,16557

gemessen: 232,16559

6.1.2.1.4.4 *N*-(4-Aminobutyl)methoxymethanamidinium Bis(trifluoracetat) (2a)

Ausbeute: 133 mg weiße, wachsartige Plättchen (67%)  
 Smp.: 83 °C  
 DC:  $R_f = 0,10$  (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig 8:2:0.5)  
 Detektion: Ninhydrin

 $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )

$\delta/\text{ppm} = 1.57$  (m, 4 H, 2',3'-CH<sub>2</sub>), 2.81 (m, 2H, 4'-CH<sub>2</sub>), 3.28 (m, 2H, 1'-CH<sub>2</sub>), 3.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 4.23 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 7.90 (br s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.99, 9.12, 9.48 (3 x br s, 3 x 1H, NH, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)

 $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )

$\delta/\text{ppm} = 24.1$  (3'-CH<sub>2</sub>), 24.2 (2'-CH<sub>2</sub>), 38.3 (4'-CH<sub>2</sub>), 40.9 (1'-CH<sub>2</sub>), 58.9 (CH<sub>3</sub>-O), 67.9 (O-CH<sub>2</sub>), 163.8 (C=N)

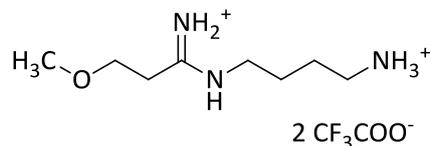
MS (ESI)

$m/z = 160$  [M + H]<sup>+</sup>, 143 [M - NH<sub>3</sub> + H]<sup>+</sup>

HRMS (ESI) für C<sub>7</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sup>+</sup>:

berechnet: 160,14444

gemessen: 160,14450

6.1.2.1.4.5 *N*-(4-Aminobutyl)-2-methoxyethanamidinium Bis(trifluoracetat) (2b)

Ausbeute: 130 mg eines farblosen Öls (63%)

DC: R<sub>f</sub> = 0,17 (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig 8:2:0.5)

Detektion: Ninhydrin

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

δ/ppm = 1.57 (m, 4 H, 2',3'-CH<sub>2</sub>), 2.65 (t, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 2H, 2-CH<sub>2</sub>), 2.81 (m, 2H, 4'-CH<sub>2</sub>), 3.22 (m, 2H, 1'-CH<sub>2</sub>), 3.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3.60 (t, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 7.93 (br s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.73, 9.14, 9.55 (3 x br s, 3 x 1H, NH, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

δ/ppm = 24.1 (3'-CH<sub>2</sub>), 24.2 (2'-CH<sub>2</sub>), 33.0 (2-CH<sub>2</sub>), 38.2 (4'-CH<sub>2</sub>), 41.1 (1'-CH<sub>2</sub>), 58.0 (CH<sub>3</sub>-O), 68.2 (O-CH<sub>2</sub>), 165.3 (C=N)

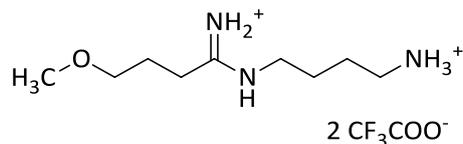
MS (ESI)

m/z = 174 [M + H]<sup>+</sup>

HRMS (ESI) für C<sub>8</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sup>+</sup>:

berechnet: 174,16009

gemessen: 174,16008

6.1.2.1.4.6 *N*-(4-Aminobutyl)-3-methoxypropanamidinium Bis(trifluoracetat) (2c)

Ausbeute: 120 mg eines farblosen Öls (52%)

DC:  $R_f = 0,19$  (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig 8:2:0.5)

Detektion: Ninhydrin

 $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ )

$\delta/\text{ppm} = 1.57$  (m, 4H, 2',3'-CH<sub>2</sub>), 1.83 (m, 2H, 3-CH<sub>2</sub>), 2.42 (t,  $^3J = 7.8$  Hz, 2H, 2-CH<sub>2</sub>), 2.81 (m, 2H, 4'-CH<sub>2</sub>), 3.20 (q,  $^3J = 5.6$  Hz, 2H, 1'-CH<sub>2</sub>), 3.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3.34 (t,  $^3J = 6.1$  Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 7.87 (s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.62, 9.08 9.46 (3 x br s, 3 x 1H, NH, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>)

 $^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ )

$\delta/\text{ppm} = 24.1$  (3'-CH<sub>2</sub>), 24.3 (2'-CH<sub>2</sub>), 26.7 (3-CH<sub>2</sub>), 29.7 (2-CH<sub>2</sub>), 38.3 (4'-CH<sub>2</sub>), 41.1 (1'-CH<sub>2</sub>), 57.9 (CH<sub>3</sub>-O), 70.5 (O-CH<sub>2</sub>), 167.2 (C=N)

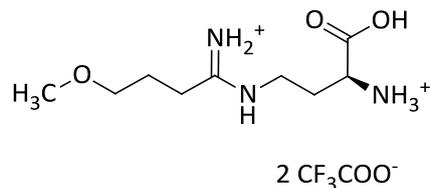
MS (ESI)

$m/z = 188$  [M + H]<sup>+</sup>

HRMS (ESI) für C<sub>9</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sup>+</sup>:

berechnet: 188,17574

gemessen: 188,17579

6.1.2.1.4.7  $N^4$ -(1-Imino-4-methoxybutyl)-*nor*-L-ornithinium Bis(trifluoracetat) (21)

Ausbeute: 65 mg eines farblosen Öls (30%)

DC:  $R_f = 0,11$  (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig 8:2:0.5)

Detektion: Ninhydrin

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 1.78-1.97 (m, 4H 3,3'-CH<sub>2</sub>), 2.43 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.8 Hz, 2H, 2'-CH<sub>2</sub>), 3.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3.34 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.0, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3.35 (m, 1H, CH), 3.46 (m, 2H, 4-CH<sub>2</sub>), 8.24 (br s, 1H, NH), 9.02 (s, 1H, NH), 9.87 (br s, 1H, NH)

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 26.4 (3-CH<sub>2</sub>), 29.3 (3'-CH<sub>2</sub>), 29.9 (2'-CH<sub>2</sub>), 39.1 (4-CH<sub>2</sub>), 50.7 (CH), 57.9 (CH<sub>3</sub>), 70.6 (2'-CH<sub>2</sub>), 167.8 (C=O), 170.1 (C=N)

MS (ESI)

$m/z = 218$  [M + H]<sup>+</sup>

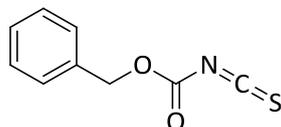
HRMS (ESI) für C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>:

berechnet: 218,14992

gemessen: 218,14999

### 6.1.2.2 Darstellung von Methoxyalkylguanidinen

#### 6.1.2.2.1 *N*-Benzyloxycarbonylisothiocyanat (**25**)<sup>[128,168,169]</sup>



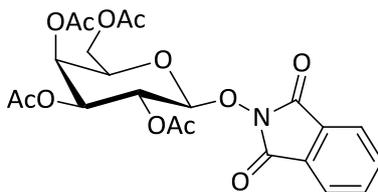
*Synthese nach Schade.*<sup>[128]</sup>

Zu 100 ml Perchlorethylen werden 500 mg 18-Krone-6, 4,5 g frisch gepulvertes und gut getrocknetes KSCN<sup>[168]</sup> sowie 5,0 ml Chlorameisensäurebenzylester (Cbz-Cl, **24**) gegeben und 12 Stunden bei 80-90°C kräftig gerührt. Dem Reaktionsgemisch werden unter Eiskühlung 100 ml *n*-Hexan zugegeben und der Niederschlag über Celite filtriert. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das erhaltene Rohprodukt in einer Reinheit von ca. 90% (lt. DC und <sup>1</sup>H-NMR) ohne weitere Aufreinigung für weitere Synthesen verwendet.

Ausbeute: 80% (Literatur: 80-90%)

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.

#### 6.1.2.2.2 *N*-[(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranos-1-yl)oxy]phthalimid (**43**)



*Vorschrift in Anlehnung an die Literatur.*<sup>[128,184,185]</sup>

1,10 g (2,66 mmol) 1-Brom-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-α-D-galactopyranose (**42**) und 2,13 g (13,03 mmol) *N*-Hydroxyphthalimid werden in 22 ml Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung werden 0,91 g Tetrabutylammoniumhydrogensulfat und 22 ml 1 M NaOH gegeben. Es wird 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 21 ml Dichlormethan zum Ansatz gegeben. Die organische Phase wird sechs Mal mit je 10 ml Wasser und zwei Mal mit je 10 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und im Anschluss über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das

Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum abgezogen und das erhaltene Rohprodukt über Kieselgel mit Toluol/Ethylacetat 1:1 aufgereinigt.

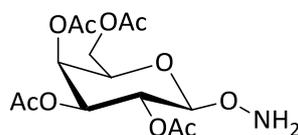
Ausbeute: 0,76 g weißer, kristalliner Schaum (58%) (Literatur: 55-80%)

DC:  $R_f = 0,51$  (Ethylacetat/Toluol 1:1)

Detektion: UV, Cer(IV)sulfat-Oxidation

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.<sup>[128]</sup>

### 6.1.2.2.3 1-Aminoxy-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galaktopyranose (35)



Vorschrift in Anlehnung an die Literatur:<sup>[128,186]</sup>

410 mg (0,83 mmol) *N*-[(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-galactopyranos-1-yl)oxy]phthalimid (**43**) werden in 15 ml trockenem Ethanol gelöst. 189  $\mu$ l (3 mmol) Ethanolamin werden dazu gegeben und der Ansatz wird 25 Minuten gerührt. Durch Zugabe von 8 ml gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung wird die Reaktion beendet. Die Lösung wird mit 10 ml Wasser verdünnt und drei Mal mit je 10 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 10 ml gesättigter  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgt über Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat 1:3 als Elutionsmittel.

Ausbeute: 150,4 mg weißer, kristalliner Schaum (50%)

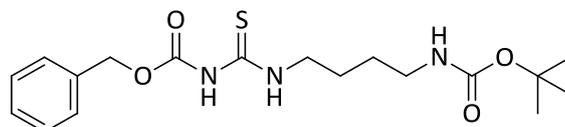
DC:  $R_f = 0,32$  (Cyclohexan/Ethylacetat 1:3)

Detektion: Cer(IV)sulfat-Oxidation

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.<sup>[128]</sup>

### 6.1.2.2.4 Thioharnstoffe

#### 6.1.2.2.4.1 *N*-Benzyloxycarbonyl-*N'*-[4-(*t*-butoxycarbonylamino)-butyl]thioharnstoff (23)



Vorschrift in Anlehnung an Linton et al. [2000]:<sup>[168]</sup>

1,5 g (8,0 mmol) *N*<sup>1</sup>-(*t*-Butoxycarbonyl)-1,4-diaminobutan (**10**) werden in 250 ml trockenem Dichlormethan gelöst und auf 0°C gekühlt. 16 ml einer 0,5 M Lösung von *N*-Benzyloxycarbonylisothiocyanat (CbzNCS) in Dichlormethan werden über 30 Minuten zum Ansatz hinzugegeben. Das Gemisch wird über zwei Stunden gerührt dabei langsam auf Raumtemperatur gebracht. Der Ansatz wird am Rotationsverdampfer auf 100 ml eingedunstet und nacheinander mit jeweils 25 ml 1%iger Salzsäure, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Es wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Es bildet sich ein weißer Niederschlag, der in Cyclohexan umkristallisiert wird.

Ausbeute: 2,5 g feines weißes Pulver (82%)  
 Smp.: 143°C  
 DC: R<sub>f</sub> = 0,20 (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1)  
 Detektion: Ninhydrin, UV, Iod

#### <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

δ/ppm = 1.43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.49-1.76 (m, 4H, 2',3'-CH<sub>2</sub>), 3.15 (q, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 2H, 4'-CH<sub>2</sub>), 3.66 (q, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, 1'-CH<sub>2</sub>), 4.62 (br t, 1H, NH-Boc), 5.1 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Cbz), 7.34-7.37 (m, 5H, ArH), 8.26 (s, 1H, NH-C=O), 9.66, (br t, 1H, NH-CH<sub>2</sub>)

#### <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

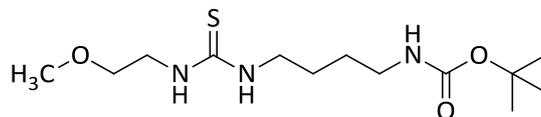
δ/ppm = 25.6 (3'-CH<sub>2</sub>), 27.4 (2'-CH<sub>2</sub>), 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 40.1 (4'-CH<sub>2</sub>), 45.2 (1'-CH<sub>2</sub>), 68.2 (CH<sub>2</sub>-Cbz), 79.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 128.3, 128.8, 128.9 (5C, ArCH), 134.5 (ArC), 152.6 (C=O-Cbz), 156.0 (C=O-Boc) 179.1 (C=S)

#### MS (ESI)

m/z = 382.6 [M + H]<sup>+</sup>, 326.6 [M - C<sub>4</sub>H<sub>8</sub> + H]<sup>+</sup>

Elementaranalyse C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S (381.5)

Ber.	C 56.67	H 7.13	N 11.01	S 8.40
Gef.	C 56.96	H 7.25	N 11.18	S 8.36

6.1.2.2.4.2 *N*-[4-(*t*-Butoxycarbonylamino)-butyl]-*N'*-(2-methoxyethyl)thioharnstoff (29)

Vorschrift in Anlehnung an Linton et al. [2000]:<sup>[168]</sup>

1,92 g (10,2 mmol) *N'*-(*t*-Butoxycarbonyl)-1,4-diaminobutan (**10**) werden in 250 ml trockenem Dichlormethan gelöst und auf 0°C gekühlt. 1,2 g (10,2 mmol) 2-Methoxyethylisothiocyanat (**28**) gelöst in 20 ml Dichlormethan werden über 30 Minuten zum Ansatz hinzugegotft. Das Gemisch wird über zwei Stunden gerührt, dabei langsam auf Raumtemperatur gebracht und weitere 18 Stunden gerührt. Der Ansatz wird am Rotationsverdampfer auf 100 ml eingeeengt und nacheinander mit jeweils 25 ml 1%iger Salzsäure, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Es wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

Ausbeute: 2,9 g hellgelbes Öl (93%)

DC: R<sub>f</sub> = 0,25 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:2)

Detektion: FCNP, Ninhydrin, UV, Iod

#### <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

δ/ppm = 1.37 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.45-1.58 (m, 4H, 2,3-CH<sub>2</sub>), 3.07 (q, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, 2H, 4-CH<sub>2</sub>), 3.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O), 3.43 (br s, 2H, 1-CH<sub>2</sub>), 3.47 (t, <sup>3</sup>J = 4.7 Hz, 2H, 2'-CH<sub>2</sub>), 3.57 (m, 2H, 1'-CH<sub>2</sub>), 4.79 (br t, 1H, NH-Boc), 6.44, 6.90 (br s, 2 x 1H, NH)

#### <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

δ/ppm = 26.1 (3-CH<sub>2</sub>), 27.6 (2-CH<sub>2</sub>), 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 40.0 (4-CH<sub>2</sub>), 44.2 (2'-CH<sub>2</sub>), 44.4 (1-CH<sub>2</sub>), 58.9 (CH<sub>3</sub>-O), 71.8 (1'-CH<sub>2</sub>), 79.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 156.4 (C=O-Boc) 182.5 (C=S)

#### MS (ESI)

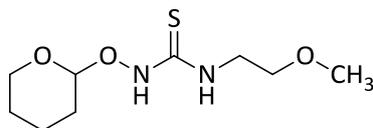
m/z = 328 [M + Na]<sup>+</sup>, 306 [M + H]<sup>+</sup>, 250 [M - C<sub>4</sub>H<sub>8</sub> + H]<sup>+</sup>

#### Elementaranalyse C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S (305.4)

Ber. C 51.12 H 8.91 N 13.76 S 10.50

Gef. C 51.15 H 9.01 N 13.90 S 10.03

### 6.1.2.2.4.3 *N*-(2-Methoxyethyl)-*N'*-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yloxy)thioharnstoff (36a)



1 g (8,5 mmol) *O*-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)hydroxylamin (**30a**) und 1 g (8,5 mmol) 2-Methoxyethylisothiocyanat (**28**) werden in 30 ml trockenem Acetonitril gelöst und fünf Stunden zum Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wird am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt und der Rückstand in 50 ml Dichlormethan aufgenommen. Nacheinander wird mit jeweils 10 ml 1%iger Salzsäure, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, anschließend wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Die Lagerung muss aufgrund schneller Zersetzung bei -20°C erfolgen.

Ausbeute: 1,7 g farblose bis weiße Kristalle (85%)

Smp.: 107°C

DC: R<sub>f</sub> = 0,42 (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1)

Detektion: FCNP, Ninhydrin, UV, Iod

#### <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

δ/ppm = 1.50-1.90 (m, 6H, 4',5',6'-CH<sub>2</sub>), 3.38 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.59 (m, 2H, 2-CH<sub>2</sub>), 3.55-3.65, 3.77-3.98 (m, 2 x 1H, 3'-CH<sub>2</sub>), 3.85 (m, 2H, 1-CH<sub>2</sub>), 4.86 (dd, <sup>3</sup>J = 2.7 Hz, 1H, 1'-CH), 7.52 (br s, 1H, NH-CH<sub>2</sub>), 8.37 (s, 1H, O-NH)

#### <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

δ/ppm = 19.6, 24.8, 28.6 (4',5',6'-CH<sub>2</sub>), 43.9 (1-CH<sub>2</sub>), 58.7 (CH<sub>3</sub>-O), 64.2 (3'-CH<sub>2</sub>), 70.5 (2-CH<sub>2</sub>), 103.7 (1'-CH), 182.9 (C=S)

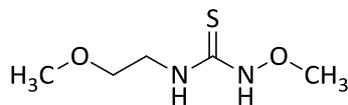
#### MS (ESI)

m/z = 257 [M + Na]<sup>+</sup>, 235 [M + H]<sup>+</sup>, 151 [M - C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O + H]<sup>+</sup>

#### Elementaranalyse C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S (234.2)

Ber. C 46.13 H 7.74 N 11.96 S 13.68

Gef. C 46.80 H 7.92 N 12.01 S 13.93

6.1.2.2.4.4 *N*-Methoxy-*N'*-(2-methoxyethyl)thioharnstoff (36b)

Vorschrift in Anlehnung an die Literatur:<sup>[225]</sup>

1.884 g (40 mmol) *O*-Methylhydroxylamin Hydrochlorid (**30b**) werden in 10 ml Diethylether gelöst und mit 3 ml 4%iger NaOH gelöst. 887 mg (7.6 mmol) 2-Methoxyethylisothiocyanat (**28**) in 20 ml 1,4-Dioxan werden langsam dazu getropft. Der Ansatz wird drei Tage bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Vakuum eingengt. Die Aufreinigung erfolgt säulenchromatographisch über Kieselgel mit Cyclohexan/Ethylacetat (1:2) als Elutionsmittel.

Ausbeute: 685 mg eines weißen Feststoffs (55%)

Smp.: 80°C

DC:  $R_f = 0,52$  (Cyclohexan/Ethylacetat 1:3)

Detektion: FCNP, UV, Iod

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

$\delta/\text{ppm} = 3.39$  (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.59 (t,  $^3J = 5.0$  Hz, 2H, 2'-CH<sub>2</sub>), 3.75 (s, 3H, N-O-CH<sub>3</sub>), 3.87 (q,  $^3J = 5.2$  Hz, 2H, 1'-CH<sub>2</sub>), 7.21 (s, 1H, CH<sub>2</sub>-NH), 8.35 (s, 1H, NH-O)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

$\delta/\text{ppm} = 43.9$  (1'-CH<sub>2</sub>), 58.9 (CH<sub>3</sub>-O), 63.9 (N-O-CH<sub>3</sub>), 70.5 (2'-CH<sub>2</sub>), 182.2 (C=S)

MS (EI)

$m/z = 164$  [M]<sup>+</sup>, 119 [M - NOCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 74 [M - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NOS]<sup>+</sup>, 59 [M - C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>OS]<sup>+</sup>

Elementaranalyse C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S (164.2)

Ber. C 36.57 H 7.37 N 17.06 S 19.52

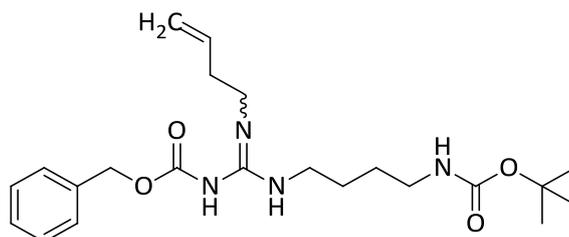
Gef. C 36.80 H 7.12 N 16.65 S 19.13

### 6.1.2.2.5 Mehrfachsubstituierte Aminobutylguanidine, geschützte Vorstufen

Allgemeine Vorschrift in Anlehnung an die Literatur:<sup>[128,168]</sup>

Es wird 1 mmol des jeweiligen Thioharnstoffs **23** oder **36a,b** in 10 ml trockenem Dichlormethan gelöst und mit 3 bzw. 6 mmol DIPEA (wenn Amin-Komponente als Salz vorliegt) versetzt. Zu diesem Gemisch werden 2 mmol des entsprechenden Amins **24** bzw. **11** gegeben. Der Ansatz wird 30 Minuten bei 0°C gerührt, mit 3 mmol EDCI versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wird mit etwa 20 ml Dichlormethan versetzt und mit jeweils 10 ml 1%iger Salzsäure, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es folgt eine säulenchromatographische Aufreinigung über Kieselgel. Als Elutionsmittel werden Dichlormethan/Methanol-Gemische (98:2) verwendet.

#### 6.1.2.2.5.1 *N*-Benzyloxycarbonyl-*N*'-(but-3-enyl)-*N*'-[4-(*t*-butoxycarbonylamino)-butyl]guanidin (**25**)



Ausbeute: 375 mg hellgelbes Öl (90%)

DC: R<sub>f</sub> = 0,69 (Dichlormethan/Methanol 8,5:1,5)

Detektion: Ninhydrin, UV

#### <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

δ/ppm = 1.43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.49-1.64 (m, 4H, 2',3'-CH<sub>2</sub>), 2.33 (tq, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, <sup>4</sup>J = 1.2 Hz, 2H, 2''-CH<sub>2</sub>) 3.13 (q, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 2H, 4'-CH<sub>2</sub>), 3.23 (br s, 2H, 1'-CH<sub>2</sub>), 3.35 (br s, 2H, 1''-CH<sub>2</sub>), 4.71 (br s, 1H, NH-Boc), 5.09-5.17 (m, 2H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.11 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Cbz), 5.78 (ddt, <sup>3</sup>J = 17.1, 10.2, 6.8 Hz, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 7.22-7.41 (m, 5H, ArH)

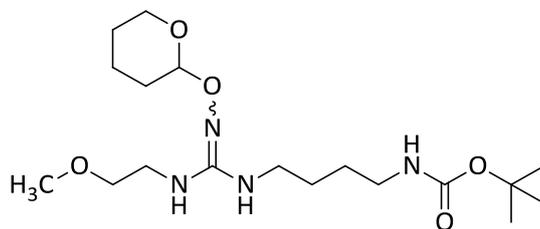
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

$\delta/\text{ppm} = 26.1$  ( $3'\text{-CH}_2$ ),  $27.7$  ( $2'\text{-CH}_2$ ),  $28.4$  ( $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ),  $33.6$  ( $2''\text{-CH}_2$ ),  $39.7$  ( $4'\text{-CH}_2$ ),  $40.2$  ( $1''\text{-CH}_2$ ),  $40.7$  ( $1'\text{-CH}_2$ ),  $66.5$  ( $\text{CH}_2\text{-Cbz}$ ),  $79.4$  ( $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ),  $117.7$  ( $\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ),  $127.6$ ,  $128.0$ ,  $128.3$  ( $5\text{C}$ ,  $\text{ArCH}$ ),  $135.0$  ( $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$ )  $137.7$  ( $\text{ArC}$ ),  $156.4$  ( $\text{C}=\text{N}$ ),  $160.1$  ( $\text{C}=\text{O-Cbz}$ ),  $164.1$  ( $\text{C}=\text{O-Boc}$ )

MS (ESI)

$m/z = 419$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$

**6.1.2.2.5.2** *N*-[4-(*t*-Butoxycarbonylamino)-butyl]-*N'*-(2-methoxyethyl)-*N''*-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yloxy)-guanidin (**31a**)



Ausbeute: 338 mg braunes Öl (87%)

DC:  $R_f = 0,47$  (Dichlormethan/Methanol 8,5:1,5)

Detektion: Ninhydrin, Cer(IV)sulfat-Oxidation

 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

$\delta/\text{ppm} = 1.44$  (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ),  $1.54\text{-}1.66$  (m, 7H,  $2,3\text{-CH}_2$ ,  $4'',5'',6''\text{-CH}_2$ ),  $1.79\text{-}1.86$  (m, 3H,  $4'',5'',6''\text{-CH}_2$ ),  $3.04\text{-}3.17$  (m, 4H,  $1,4\text{-CH}_2$ ),  $3.26$  (q,  $^3J = 5.2$  Hz, 2H,  $1'\text{-CH}_2$ ),  $3.36$  (s, 3H,  $\text{O-CH}_3$ ),  $3.47$  (t,  $^3J = 5.2$  Hz, 2H,  $2'\text{-CH}_2$ ),  $3.55\text{-}3.61$ ,  $3.91\text{-}3.97$  (m, 2 x 1H,  $3''\text{-CH}_2$ ),  $4.01$  (br s, 1H, NH),  $4.71$  (br s, 1H, NH),  $4.94$  (dd,  $^3J = 5.8$ ,  $2.1$  Hz, 1H,  $1''\text{-CH}$ ),  $5.24$  (br s, 1H,  $\underline{\text{N}}\text{H-CH}_2$ )

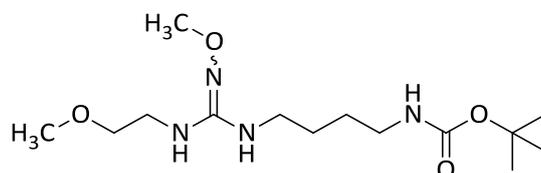
 $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

$\delta/\text{ppm} = 20.9$  ( $5''\text{-CH}_2$ ),  $25.3$ ,  $27.5$  ( $2,3\text{-CH}_2$ ),  $28.4$  ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ),  $29.8$ ,  $32.0$  ( $4'',6''\text{-CH}_2$ ),  $40.2$  ( $1\text{-CH}_2$ ),  $41.1$  ( $4\text{-CH}_2$ ),  $42.0$  ( $1'\text{-CH}_2$ ),  $58.8$  ( $\text{O-CH}_3$ ),  $63.9$  ( $2'\text{-CH}_2$ ),  $74.2$  ( $3''\text{-CH}_2$ ),  $79.2$  ( $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ),  $101.2$  ( $1''\text{-CH}$ ),  $156.2$  ( $\text{C}=\text{O}$ ),  $156.7$  ( $\text{C}=\text{N}$ )

MS (ESI)

$m/z = 389.5$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$

**6.1.2.2.5.3** *N*-[4-(*t*-Butoxycarbonylamino)-butyl]-*N*''-methoxy-*N*'-(2-methoxyethyl)-guanidin  
(31b)



Ausbeute: 250 mg hellgelbes Öl (79%)

DC:  $R_f = 0,15$  (Dichlormethan/Methanol 9:1)

Detektion: Ninhydrin, FCNP

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )

$\delta/\text{ppm} = 1.37$  (br s, 9H + 4H überlagert,  $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3 + 2,3\text{-CH}_2$ ), 2.90 (m, 4H, 1,4- $\text{CH}_2$ ), 3.11 (q,  $^3J = 5.7$  Hz, 2H, 1' $\text{CH}_2$ ), 3.25 (s, 3H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{-O-CH}_2$ ), 3.37 (t,  $^3J = 5.6$  Hz, 2H, 2'- $\text{CH}_2$ ), 3.47 (s, 3H, N-O- $\text{CH}_3$ ), 5.30 (br s, 1H, NH), 5.42 (br s, 1H, NH), 6.77 (t,  $^3J = 5.4$  Hz, 1H,  $\underline{\text{N}}\text{H-Boc}$ )

Aufnahme eines weiteren  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums zur Absicherung der Signalüberlagerung bei 1,37 ppm in  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta/\text{ppm} = 1.44$  (s, 9H,  $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 1.51-1.59 (m, 4H, 2,3- $\text{CH}_2$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )

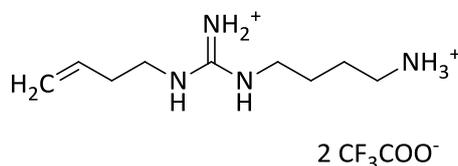
$\delta/\text{ppm} = 26.5$ , 27.0 (2,3- $\text{CH}_2$ ), 28.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 39.6 (1- $\text{CH}_2$ ), 40.4 (4- $\text{CH}_2$ ), 40.5 (1' $\text{CH}_2$ ), 58.0 ( $\text{CH}_2\text{-O-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 60.6 (N-O- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ) 71.4 (2'- $\text{CH}_2$ ), 77.3 ( $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ), 154.6 (C=O), 155.6 (C=N)

MS (ESI)

$m/z = 319$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 263  $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_8 + \text{H}]^+$

### 6.1.2.2.6 Mehrfachsubstituierte Aminobutylguanidine

#### 6.1.2.2.6.1 *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-but-3-enylguanidinium Bis(trifluoracetat) (26)



Vorschrift nach Schade [2008].<sup>[128]</sup>

375 mg (0,9 mmol) des geschützten Guanidins **25** werden in 22 ml TFA und 6,5 ml Thioanisol für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Vakuum einkonzentriert. Der Rückstand wird mit 12 ml Wasser versetzt und zweimal mit je 25 ml Diethylether gewaschen. Die Etherphase wird anschließend noch zweimal mit je 10 ml Wasser extrahiert. Die wässrige Phase wird am Rotationsverdampfer einkonzentriert und über eine RP-18-Säule mittels Flashchromatographie aufgereinigt. Als Elutionsmittel dient ein Gemisch aus 0,1% TFA in *Aqua bidest.* und Methanol (9:1).

Ausbeute: 282 mg hellgelbes Öl (76%)

DC: R<sub>f</sub> = 0,15 (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig 8:2:0.5)

Detektion: Ninhydrin

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

δ/ppm = 1.48-1.60 (m, 4H, 2,3-CH<sub>2</sub>), 2.24 (tq, 2H, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, <sup>4</sup>J = 1.2 Hz, 2'-CH<sub>2</sub>), 2.79 (m, 2H, 4-CH<sub>2</sub>), 3.13 (m, 2H, 1-CH<sub>2</sub>), 3.20 (m, 2H, 1'-CH<sub>2</sub>), 5.09 (m, 2H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.78 (ddt, 1H, <sup>3</sup>J = 17.1, 10.2, 6.8 Hz, CH=CH<sub>2</sub>), 7.44 (br s, 2H, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 7.52, 7.65 (t, 2 x 1H, <sup>3</sup>J = 5.5 Hz, NH), 7.80 (br s, 3 H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

δ/ppm = 24.7 (3-CH<sub>2</sub>), 25.9 (2-CH<sub>2</sub>), 33.2 (2'-CH<sub>2</sub>), 38.9 (4-CH<sub>2</sub>), 40.6 (1'-CH<sub>2</sub>), 40.7 (1-CH<sub>2</sub>), 117.7 (CH=CH<sub>2</sub>), 135.4 (CH=CH<sub>2</sub>) 156.1 (C=N)

#### MS (ESI)

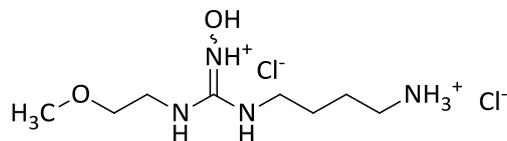
m/z = 185 [M + H]<sup>+</sup>

#### HRMS (ESI) für C<sub>9</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub><sup>+</sup>:

berechnet: 185,17607

gemessen: 185,17611

### 6.1.2.2.6.2 *N*-(4-Aminobutyl)-*N*'-hydroxy-*N*'-(2-methoxyethyl)guanidiniumdichlorid (**32a**)



Es werden 100 mg (0,26 mmol) der geschützten Verbindung **31a** in 10 ml Dioxan gelöst. Über fünf Minuten wird vorsichtig Chlorwasserstoff eingeleitet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen und der Rückstand über eine RP-18-Säule mittels Flashchromatographie aufgereinigt. Als Elutionsmittel dient *Aqua bidest*.

Ausbeute: 68 mg farbloses, viskoses Öl (90%)

DC:  $R_f = 0,46$  (i-Propanol/Wasser/Eisessig 6:3:1)

Detektion: Ninhydrin

#### $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ )

$\delta/\text{ppm} = 1.64$  (m, 4H, 2,3- $\text{CH}_2$ ), 2.77 (sx,  $^3J = 6.4$  Hz, 2H, 4- $\text{CH}_2$ ), 3.22 (q,  $^3J = 6.0$  Hz, 2H, 1- $\text{CH}_2$ ), 3.27 (s, 3H, O- $\text{CH}_3$ ), 3.42 (m, 4H, 1',2'- $\text{CH}_2$ ), 7.83 (s, 1H, N'H), 7.90 (t,  $^3J = 5.9$  Hz, 1H, NH), 8.24 (s, 3H,  $\text{NH}_3$ ), 9.96 (br s, 1H, OH), 10.70 (s, 1H, N'H)

#### $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ )

$\delta/\text{ppm} = 23.9$  (3- $\text{CH}_2$ ), 25.4 (2- $\text{CH}_2$ ), 38.1 (4- $\text{CH}_2$ ), 40.0 (1- $\text{CH}_2$ ), 40.6 (1'- $\text{CH}_2$ ), 58.1 (O- $\text{CH}_3$ ), 69.9 (2'- $\text{CH}_2$ ), 156.5 (C=N)

#### $^{15}\text{N-NMR}$ (DMSO- $d_6$ )

Nitromethan-Skala:  $\delta/\text{ppm} = -345.02$  ( $\text{NH}_3$ ), -303.66 (N'), -299.59 (N), -243.72 (N')

Ammoniak-Skala:  $\delta/\text{ppm} = 35.18$  ( $\text{NH}_3$ ), 76.54 (N'), 80.61 (N), 136.48 (N')

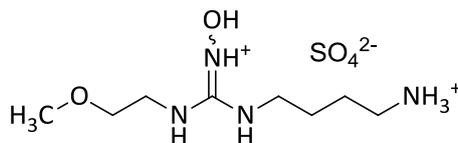
#### MS (ESI)

$m/z = 205$  [M + H]<sup>+</sup>

#### HRMS (ESI) für $\text{C}_8\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_2^+$ :

berechnet: 205,16590

gemessen: 205,16597

6.1.2.2.6.3 *N*-(4-Aminobutyl)-*N*'-hydroxy-*N*'-(2-methoxyethyl)guanidiniumsulfat (32a)

400 mg (1,03 mmol) der geschützten Verbindung **31a** werden in 15 ml eines Wasser-Dioxan-Gemisches (2:1) gelöst. Es werden 3 ml konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach drei Stunden wird der pH-Wert der Lösung mit NaHCO<sub>3</sub> auf pH 6 eingestellt. Das Lösungsmittel wird abrotiert und der Rückstand in Methanol aufgenommen. Nach Abfiltrieren der Salze wird das Methanol abrotiert und der Rückstand über Umkehrphasen-Flash-Chromatographie mit *Aqua bidest.* als Elutionsmittel gereinigt. Fraktionen, die Ninhydrin- und Sulfat-positiv sind, werden vereinigt und einkonzentriert. Durch Trocknen über Phosphorpentoxid wird ein kristalliner Schaum erhalten.

Ausbeute: 277 mg farbloser kristalliner Schaum (89%)

DC: R<sub>f</sub> = 0,46 (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig 6:3:1)

Detektion: Ninhydrin

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O)

δ/ppm = 1.74 (m, 4H, 2,3-CH<sub>2</sub>), 3.06 (t, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 2H, 4-CH<sub>2</sub>), 3.30 (t, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 2H, 1-CH<sub>2</sub>), 3.42 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.46 (t, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, 2H, 1'-CH<sub>2</sub>), 3.66 (t, <sup>3</sup>J = 5.0 Hz, 2H, 2'-CH<sub>2</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O)

δ/ppm = 24.0 (3-CH<sub>2</sub>), 25.0 (2-CH<sub>2</sub>), 39.0 (4-CH<sub>2</sub>), 40.3 (1-CH<sub>2</sub>), 40.8 (1'-CH<sub>2</sub>), 58.3 (O-CH<sub>3</sub>), 70.3 (2'-CH<sub>2</sub>), 157.6 (C=N)

MS (ESI)

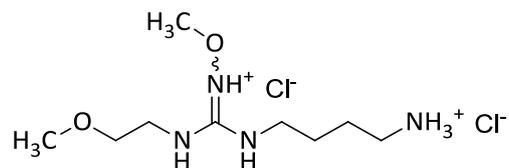
m/z = 205 [M + H]<sup>+</sup>

Elementaranalyse

C<sub>8</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S x 1 H<sub>2</sub>O (320.37)

Ber. C 29.99 H 7.55 N 17.49 S 10.01

Gef. C 29.99 H 7.89 N 17.12 S 10.64

6.1.2.2.6.4 *N*-(4-Aminobutyl)-*N*''-methoxy-*N*'-(2-methoxyethyl)-guanidiniumdichlorid (**32b**)

250 mg (0,79 mmol) des geschützten Guanidins **31b** werden in 10 ml trockenem Dioxan gelöst. Über fünf Minuten wird vorsichtig Chlorwasserstoffgas eingeleitet. Der Ansatz wird ca. 12 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt und das Lösungsmittel dekantiert. Der Rückstand wird mit etwas Diethylether nachgewaschen und durch Säulenchromatographie über RP<sub>18</sub>-Kieselgel mit *Aqua bidest.* als Elutionsmittel aufgereinigt.

Ausbeute: 210 mg weißes Pulver (92%)

DC:  $R_f = 0,44$  (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig 6:3:1)

Detektion: Ninhydrin

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O)

$\delta$ /ppm = 1.76 (m, 4H, 2,3-CH<sub>2</sub>), 3.07 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.6 Hz, 2H, 4-CH<sub>2</sub>), 3.31 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.2 Hz, 2H, 1-CH<sub>2</sub>), 3.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O-CH<sub>2</sub>), 3.47 (t, <sup>3</sup>*J* = 5.0 Hz, 2H, 1'-CH<sub>2</sub>), 3.67 (t, <sup>3</sup>*J* = 5.1 Hz, 2H, 2'-CH<sub>2</sub>), 3.79 (s, 3H, N-O-CH<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 1.59 (m, 4H, 2,3-CH<sub>2</sub>), 2.78 (m, 2H, 4-CH<sub>2</sub>), 3.23 (m, 2H, 1-CH<sub>2</sub>), 3.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O-CH<sub>2</sub>), 3.37-3.48 (m 4H, 1',2'-CH<sub>2</sub>), 3.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-O-NH<sup>+</sup>), 8.19 (br s, 5H, 2 x NH, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 11.63 (br s, 1H, CH<sub>3</sub>-O-NH<sup>+</sup>)

<sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O)

$\delta$ /ppm = 25.1, 26.1 (2,3-CH<sub>2</sub>), 40.2 (1-CH<sub>2</sub>), 41.5 (4-CH<sub>2</sub>), 42.1 (1'-CH<sub>2</sub>), 59.4 (CH<sub>3</sub>-O-CH<sub>2</sub>), 65.8 (CH<sub>3</sub>-O-NH<sup>+</sup>), 71.4 (2'-CH<sub>2</sub>), 157.6 (C=N)

<sup>15</sup>N-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

Nitromethan-Skala:  $\delta$ /ppm = -345.15 (NH<sub>3</sub>), -302.77 (N'), -298.98 (N), -219.30 (N'')

Ammoniak-Skala:  $\delta$ /ppm = 35.05 (NH<sub>3</sub>), 77.43 (N'), 81.22 (N), 160.90 (N'')

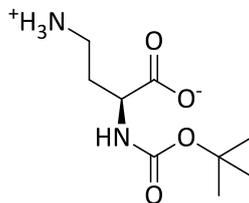
MS (ESI) $m/z = 219 [M + H]^+$ HRMS (ESI) für  $C_9H_{23}N_4O_2^+$ :

berechnet: 219,18155

gemessen: 219,18160

### 6.1.2.3 Darstellung von *N*<sup>ω</sup>-Hydroxy-*N*<sup>γ</sup>-methyl-*nor*-L-arginin Dihydrochlorid

#### 6.1.2.3.1 *N*<sup>α</sup>-(*t*-Butoxycarbonyl)-*nor*-L-ornithin (48)



Synthese nach Andruskiewicz et al. [2004].<sup>[208]</sup>

3,69 g (15 mmol) *N*<sup>α</sup>-(*t*-Butoxycarbonyl)-L-glutamin (**47**) werden in 36 ml THF und 9 ml Wasser in einem Erlenmeyerkolben gelöst und im Kühlschrank bei 4°C temperiert. 5,79 g (18 mmol) PIDA wird hinzugefügt und 18 Stunden unter Lichtausschluss im Kühlschrank kräftig gerührt. Der Ansatz wird zur Trockne eingengt, in 20 ml Wasser aufgenommen und mit 3 x 20 ml Ethylacetat gewaschen. Die organische Phase wird verworfen und die wässrige Phase bis zur Trockne evaporiert. Das entstandene Rohprodukt wird mehrfach mit kaltem Chloroform gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 2,2 g feines, weißes Pulver (72%) (Literatur: 82%)

DC:  $R_f = 0,16$  (Ethylacetat/Methanol 1:1)

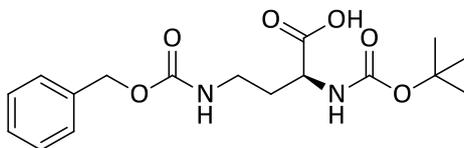
Detektion: Ninhydrin

Aufgrund schlechter DMSO-Löslichkeit wurde das NMR abweichend von der Literatur in D<sub>2</sub>O vermessen.

#### <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O)

$\delta$ /ppm = 1.52 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.99-2.28 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 3.16 (t, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 2H, γ-CH<sub>2</sub>)  
4.06 (br s, 1H, α-CH)

### 6.1.2.3.2 $N^\alpha$ -(*t*-Butoxycarbonyl)-*N* $^\gamma$ -benzyloxycarbonyl-*nor*-L-ornithin (**49**)



*Synthese modifiziert in Anlehnung an Moali et al. [2000].<sup>[91]</sup>*

4,7 g (21 mmol)  $N^\alpha$ -Boc-*nor*-L-ornithin (**48**) werden in einen Erlenmeyerkolben gegeben und in 25 ml Wasser und 5 ml 2,5 M NaOH gelöst. Es werden 25 ml Toluol und 4 g (23 mmol) Cbz-Cl hinzugefügt. Die Mischung wird mit fest verschlossenem Stopfen 18 Stunden kräftig gerührt, sodass die Phasen sich vermischen können. Im Anschluss wird die wässrige Phase mit Phosphorsäure auf pH 6-7 eingestellt und dreimal mit je 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel evaporiert.

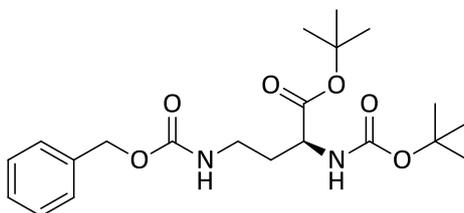
Ausbeute: 5,9 g feines, weißes Pulver (80%) (Literatur: 60% ausgehend von **47**)

DC:  $R_f = 0,54$  (Cyclohexan/Ethylacetat/Eisessig 5:5:0,5)

Detektion: Ninhydrin, UV

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.

### 6.1.2.3.3 $N^\alpha$ -(*t*-Butoxycarbonyl)-*N* $^\gamma$ -benzyloxycarbonyl-*nor*-L-ornithin-*t*-butylester (**50**)



*Synthese nach Moali et al. [2000].<sup>[91]</sup>*

1 g (2,8 mmol)  $N^\alpha$ -Boc- $N^\gamma$ -Cbz-*nor*-L-ornithin (**49**), 640 mg (2,8 mmol) Benzyltriethylammoniumchlorid (BTEAC), 9 g (26 äq) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 23 ml *N,N*-Dimethylacetamid (DMAC) (8 ml/mmol **49**) und 15 ml *tert*-Butylbromid (46 äq) werden in einem Rundkolben

zusammengefügt und 18 Stunden bei 55 °C unter Rückflusskühlung erhitzt. Der Kühler wird mit Ethylacetat nachgespült und die Mischung abkühlen gelassen. Die ausgefallenen Salze werden abfiltriert und mit Ethylacetat nachgewaschen. Das Lösungsmittel wird anschließend bis zur Trockne im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird in 20 ml Wasser aufgenommen und dreimal mit je 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel evaporiert. Das Rohprodukt wird über Kieselgel mit einem Cyclohexan/Ethylacetat-Gradienten (4:1-1:1) gereinigt.

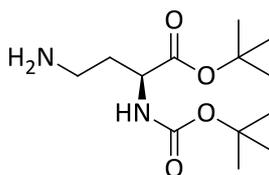
Ausbeute: 940 mg farbloses Öl (82%) (Literatur: 99%)

DC: R<sub>f</sub> = 0,31 (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1)

Detektion: Ninhydrin, UV

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.

#### 6.1.2.3.4 *N*<sup>α</sup>-(*t*-Butoxycarbonyl)-*nor*-L-ornithin-*t*-butylester (19)



1 g der vollgeschützten Verbindung **50** werden in 30 ml Methanol gelöst und mit 100 mg Pd/C versetzt. Der Ansatz wird 24 Stunden mit elementarem Wasserstoff (4 bar) hydriert und anschließend über Blauband filtriert. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer kann das NMR-reine Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung verwendet werden.

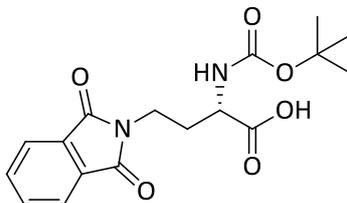
Ausbeute: 670 mg farbloses Öl (99%) (Literatur: 99%)

DC: R<sub>f</sub> = 0,48 (Ethylacetat/Methanol/Ammoniak 6:4:0,5)

Detektion: Ninhydrin

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.

### 6.1.2.3.5 $N^{\alpha}$ -(*t*-Butoxycarbonyl)- $N^{\gamma}$ -phthalimido-*nor*-L-ornithin (63)



Modifizierte Vorschrift in Anlehnung an Sasaki et al. [1978].<sup>[221]</sup>

Es werden 0,5 g (2,3 mmol)  $N^{\alpha}$ -Boc-*nor*-L-ornithin (**48**) mit 0,43 g Phthalsäureanhydrid (**62**) in 5 ml Chloroform suspendiert und anschließend mit 50 ml Chlorbenzol versetzt. Zunächst wird 2 Stunden bei 60°C gerührt und danach weitere 5 Stunden bei 100°C. (DC-Kontrolle ob vollständige Umsetzung erfolgt ist, ansonsten längere Reaktionszeit). Die Lösung wird im Vakuum bis zur Trockne einkonzentriert und der Rückstand über Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol (100:5) aufgereinigt.

Ausbeute: 0,75 g feines, weißes Pulver (91 %)  
 Smp.: 163°C  
 DC:  $R_f = 0,24$  (Dichlormethan/Methanol 20:1)  
 Detektion: Ninhydrin, UV

#### $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- $d_6$ )

$\delta/\text{ppm} = 1.37$  (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.80-2.18 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 3.66 (m, 2H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>) 3.92 (dt,  $^3J = 4.7, 8.8$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH), 7.14 (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 1H, NH-Boc), 7.84 (m, 4H, ArH)

#### $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- $d_6$ )

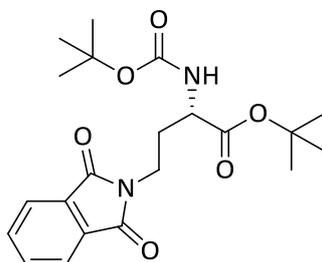
$\delta/\text{ppm} = 28.1$  (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.1 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 34.8 ( $\gamma$ -CH<sub>2</sub>), 51.2 ( $\alpha$ -CH), 78.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 122.9, 134.3 (2 x ArCH), 131.6 (ArC), 134.3, 155.4 (C=O-Boc), 167.7 (C=O-Phthalimid), 173.4 (C=O-OH)

#### MS (ESI)

$m/z = 371$  [M + Na]<sup>+</sup>, 249 [M - C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>, - CO<sub>2</sub>, + H]<sup>+</sup>

<u>Elementaranalyse</u>	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> (348.4)		
Ber.	C 58.61	H 5.79	N 8.04
Gef.	C 58.13	H 5.74	N 7.78

### 6.1.2.3.6 *N*<sup>α</sup>-(*t*-Butoxycarbonyl)-*N*<sup>γ</sup>-phthalimido-*nor*-L-ornithin-*t*-butylester (64)



Vorschrift in Anlehnung an Moali et al.[2000]:<sup>[91]</sup>

0,93 g (2,6 mmol) der *N*<sup>α</sup>-Boc-*N*<sup>γ</sup>-Phthalimid-geschützten Verbindung **63**, 0,6 g BTEAC (1 äq), 9 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (26 äq), 21 ml DMAC (8 ml/mmol CB-DAB) und 14 ml *tert*-Butylbromid (46 äq) werden in einem Rundkolben zusammengefügt und 18 Stunden bei 55°C unter Rückflusskühlung erhitzt. Der Kühler wird mit Ethylacetat nachgespült und die Mischung abkühlen gelassen. Die ausgefallenen Salze werden abfiltriert und mit Ethylacetat nachgewaschen. Das Lösungsmittel wird anschließend bis zur Trockne im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird in 20 ml Wasser aufgenommen und dreimal mit je 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel bis zur Trockne abgezogen.

Ausbeute: 0,7 g farblose bis weiße Kristalle/Nadeln (67%)

Smp.: 160°C

DC: R<sub>f</sub> = 0,36 (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1)

Detektion: Ninhydrin, UV

#### <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

δ/ppm = 1.41 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.96-2.23 (m, 2H, β-CH<sub>2</sub>), 3.67-3.84 (m, 2H, γ-CH<sub>2</sub>) 4.26 (q, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 1H, α-CH), 5.27 (d, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 1H, NH-Boc), 7.69 (m, 2H, ArH), 7.82 (m, 2H, ArH)

#### <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

δ/ppm = 27.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.0 (β-CH<sub>2</sub>), 34.4 (γ-CH<sub>2</sub>), 52.0 (α-CH), 79.8, 82.3 (2 x C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 123.3, 134.0 (2 x ArCH), 132.2 (ArC), 155.4 (C=O-Boc), 168.1 (C=O-Phthalimid), 171.0 (C=O<sup>t</sup>Bu)

MS (ESI)

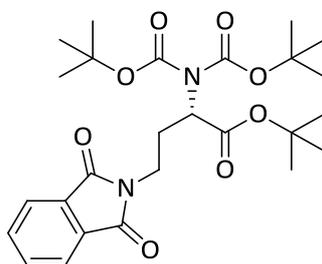
$m/z = 427 [M + Na]^+$ ,  $249 [M - 2 \times C_4H_8, - CO_2, + H]^+$

Elementaranalyse  $C_{21}H_{28}N_2O_6$  (404.5)

Ber. C 62.36 H 6.98 N 6.93

Gef. C 62.58 H 7.08 N 7.20

**6.1.2.3.7  $N^\alpha, N^\alpha$ -Bis-(*t*-Butoxycarbonyl)- $N^\gamma$ -phthalimido-*nor*-L-ornithin-*t*-butylester (65)**



Vorschrift in Anlehnung an Grehn und Ragnarsson [1985]:<sup>[218]</sup>

450 mg (1,1 mmol) des dreifach geschützten *nor*-L-Ornithins **64**, werden in 12 ml wasserfreiem Acetonitril gelöst. Zu der Lösung werden 12 mg (0,1 mmol) DMAP und 360 mg (1,5 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat hinzugefügt. Der Ansatz wird unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Sofern keine vollständige Umsetzung erfolgt ist, werden weitere 360 mg Di-*tert*-butyldicarbonat hinzugefügt und erneut 24 Stunden rühren gelassen. Nach dem Abrotieren des Lösungsmittels im Vakuum wird das Rohprodukt über Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat (6:1) aufgereinigt. Ninhydrin-positive Fraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt.

Ausbeute: 510 mg hellgelbes, viskoses Öl (kristallisiert nach einigen Tagen aus), (91 %)

Smp.: 77°C

DC:  $R_f = 0,43$  (Cyclohexan/Ethylacetat 2:1)

Detektion: Ninhydrin, Dragendorff, UV

 $^1H$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$ /ppm = 1.44 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.48 (s, 18H, 2 x C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.18 (m, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 2.54 (m, 1H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 3.78 (dt,  $^3J = 7.3$  Hz,  $^4J = 1.2$  Hz, 2H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>), 4.82 (dd,  $^3J = 8.2, 6.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -CH), 7.70 (m, 2H, ArH), 7.83 (m, 2H, ArH)

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )

$\delta/\text{ppm} = 27.9$  ( $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ),  $28.0$  ( $2 \times \text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ),  $28.7$  ( $\beta\text{-CH}_2$ ),  $35.9$  ( $\gamma\text{-CH}_2$ ),  $56.7$  ( $\alpha\text{-CH}$ ),  $81.5$  ( $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ),  $83.0$  ( $2 \times \underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ),  $123.2$ ,  $133.8$  ( $2 \times 2 \text{ ArCH}$ ),  $132.3$  ( $2 \text{ ArC}$ ),  $152.2$  ( $2 \text{ C=O-Boc}$ ),  $168.2$  ( $2 \text{ C=O-Phthalimid}$ ),  $170.7$  ( $\text{C=O}^t\text{Bu}$ )

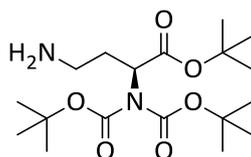
MS (ESI)

$m/z = 527$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$

Elementaranalyse     $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_8$  (505.6)

Ber.    C 61.89        H 7.19        N 5.55

Gef.    C 61.76        H 7.44        N 5.61

**6.1.2.3.8     $N^\alpha, N^\alpha$ -Bis-(*t*-Butoxycarbonyl)-*nor*-L-ornithin-*t*-butylester (66)**

Vorschrift in Anlehnung an Magnus et al.[2005].<sup>[223]</sup>

880 mg (1,75 mmol) der vollgeschützten Aminosäure **65**, werden mit 20 ml Ethanol und 12 ml einer 40%igen Lösung von Methylamin in Wasser versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand zwischen 40 ml Diethylether und 40 ml Wasser separiert. Die wässrige Phase wird zweimal mit 40 ml Diethylether extrahiert und die vereinigten Diethylether-Extrakte noch einmal mit 20 ml Wasser gewaschen. Anschließend wird zweimal mit 20 ml 1%iger HCl extrahiert. Die HCl-Phase wird mit 5%iger KOH alkalisiert und im Anschluss 3 Mal mit 40 ml Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetat-Phase wird noch einmal mit 20 ml Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum am Rotationsverdampfer abgezogen.

Ausbeute:    461 mg farbloses Öl (70%)

DC:             $R_f = 0,69$  (Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 8,5:1,5:0,5)

Detektion:    Ninhydrin, Dragendorff

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

$\delta/\text{ppm} = 1.45$  (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.51 (s, 18H, 2 x  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.77 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 2.01 (m, 1H,  $\beta\text{-CH}_2$ ), 2.20 (m, 1H,  $\beta\text{-CH}_2$ ), 2.78 (m, 2H,  $\gamma\text{-CH}_2$ ), 4.84 (dd,  $^3J = 5.0, 9.6\text{Hz}$ , 1H,  $\alpha\text{-CH}$ )

 $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

$\delta/\text{ppm} = 26.9$  ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 27.0 (2 x  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 31.9 ( $\beta\text{-CH}_2$ ), 37.8 ( $\gamma\text{-CH}_2$ ), 55.6 ( $\alpha\text{-CH}$ ), 80.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 82.0 (2 x  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 151.6 (2 x  $\text{C}=\text{O-Boc}$ ), 168.8 ( $\text{C}=\text{O}^t\text{Bu}$ )

MS (ESI)

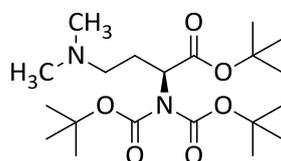
$m/z = 375$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ , 319 [ $\text{M} - \text{C}_4\text{H}_8 + \text{H}$ ] $^+$ , 275 [ $\text{M} - \text{C}_4\text{H}_8 - \text{CO}_2 + \text{H}$ ] $^+$ , 219 [ $\text{M} - 2 \times \text{C}_4\text{H}_8 - \text{CO}_2 + \text{H}$ ] $^+$ , 163 [ $\text{M} - 3 \times \text{C}_4\text{H}_8 - \text{CO}_2 + \text{H}$ ] $^+$

Elementaranalyse  $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_6$  (374.5)

Ber. C 57.73 H 9.15 N 7.48

Gef. C 57.22 H 9.56 N 7.43

### 6.1.2.3.9 $N^\alpha, N^\alpha$ -Bis-(*t*-Butoxycarbonyl)- $N^\gamma, N^\gamma$ -dimethyl-*nor*-L-ornithin-*t*-butylester (67)



Vorschrift in Anlehnung an Alinezhad et al. [2006].<sup>[213,214]</sup>

Es werden 400 mg (1,1 mmol) des doppelt Boc-geschützten Amins **66** in 5 ml Methanol gelöst. Zu dieser Lösung werden 600  $\mu\text{l}$  35%ige wässrige Formalin-Lösung (ca. 7 mmol) gegeben und mit 10%iger methanolischer HCl der pH-Wert auf 6-7 eingestellt. In 50 mg Schritten werden alle 30 Minuten insgesamt 300 mg ZBNMPP hinzugefügt. Der pH-Wert wird jedes Mal überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Nach vier Stunden werden die entstandenen Salze abfiltriert, mit Methanol gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Zur Aufreinigung der Substanz wird eine Säulenchromatographie über Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (50:1 – 9:1) durchgeführt.

Ausbeute: 371 mg farbloses Öl (84%)

DC:  $R_f = 0,80$  (Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 8,5:1,5:0,5)

Detektion: Ninhydrin, Dragendorff

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

$\delta/\text{ppm} = 1.45$  (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.51 (s, 18H, 2 x  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.03 (m, 1H,  $\beta\text{-CH}_2$ ), 2.35 (s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2\text{N}$ ), 2.37 (m, 1H,  $\beta\text{-CH}_2$ ), 2.53 (m, 2H,  $\gamma\text{-CH}_2$ ), 4.80 (dd,  $^3J = 5.3, 8.4$  Hz, 1H,  $\alpha\text{-CH}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

$\delta/\text{ppm} = 26.0$  ( $\beta\text{-CH}_2$ ), 26.9 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 27.0 (2 x  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 43.8 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 55.3 ( $\gamma\text{-CH}_2$ ), 56.0 ( $\alpha\text{-CH}$ ), 80.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 81.9 (2 x  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 151.4 (2 x  $\text{C}=\text{O-Boc}$ ), 168.6 ( $\text{C}=\text{O}^t\text{Bu}$ )

MS (ESI)

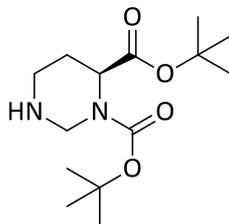
$m/z = 403$   $[\text{M} + \text{H}]^+$

Elementaranalyse  $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_6$  (402.5)

Ber. C 59.68 H 9.52 N 6.96

Gef. C 59.40 H 9.48 N 6.73

### 6.1.2.3.10 (S)-*N*<sup>3</sup>-*t*-Butoxycarbonylhexahydropyrimidin-4-carbonsäure-*t*-butylester (57)



Bei reduktiven Alkylierung des einfach Boc-geschützten Amins **19** entstandenes Produkt, anstelle der gewünschten *N,N*-dimethylierten Verbindung **51**. Vorschrift siehe 6.1.2.3.9.

Sowohl im <sup>1</sup>H- als auch im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum liegt für viele Signale ein doppelter Satz vor (Verhältnis 1:1), der vermutlich durch Isomere zustande kommt. Im Folgenden sind beide Signale angegeben.

#### <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

δ/ppm = 1.45 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.47 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.91 (m, 2H, 5-CH<sub>2</sub>), 2.55 (m, 1H, 4-CH<sub>2</sub>), 2.91 (d, <sup>2</sup>J = 12.2 Hz, 1H, 6-CH), 3.30 (s, 1 H, NH), 3.85 (m, 1 H, 2-CH<sub>2</sub>), 4.79 (br s, 0,5 H, 6-CH), 4.82, (br s, 0,5 H, 6-CH), 4.82 (br s, 1 H, 2-CH<sub>2</sub>)

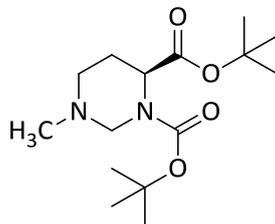
#### <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

δ/ppm = 22.9 (5-CH<sub>2</sub>), 28.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 46.2, 46.3 (4-CH<sub>2</sub>), 53.5, 54.7 (6-CH), 60.9, 61.4 (2-CH<sub>2</sub>), 80.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 81.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.1 (C=O-Boc), 171.0 (C=O<sup>t</sup>Bu)

#### MS (ESI)

m/z = 287 [M + H]<sup>+</sup>, 231 [M - C<sub>4</sub>H<sub>8</sub> + H]<sup>+</sup>, 175 [M - 2 x C<sub>4</sub>H<sub>8</sub> + H]<sup>+</sup>

### 6.1.2.3.11 (S)-*N*<sup>3</sup>-*t*-Butoxycarbonyl-*N*<sup>1</sup>-methylhexahydropyrimidin-4-carbonsäure-*t*-butylester (58)



Bei reduktiven Alkylierung des einfach Boc-geschützten Amins **19** entstandenes Produkt, anstelle der gewünschten *N,N*-dimethylierten Verbindung **51**. Vorschrift siehe 6.1.2.3.9.

Sowohl im <sup>1</sup>H- als auch im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum liegt für viele Signale ein doppelter Satz vor (Verhältnis 1:1), der vermutlich durch Isomere zustande kommt. Im Folgenden sind beide Signale angegeben.

#### <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

δ/ppm = 1.44 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.46 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.02 (m, 2H, 5-CH<sub>2</sub>), 2.14-2.24 (m, 1H, 4-CH<sub>2</sub>), 2.30 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.77 (dq, <sup>3</sup>J = 2.6, 12.4 Hz, 1H, 4-CH<sub>2</sub>), 3.37 (d, <sup>2</sup>J = 11.1 Hz, 0.5 H, 2-CH<sub>2</sub>), 3.51 (d, <sup>2</sup>J = 11.5 Hz, 0.5 H, 2-CH<sub>2</sub>), 4.57 (d, <sup>2</sup>J = 11.5 Hz, 0.5 H, 2-CH<sub>2</sub>), 4.71 (d, <sup>2</sup>J = 11.1 Hz, 0.5 H, 2-CH<sub>2</sub>), 4.57 (br s, 0.5 H, 6-CH), 4.78 (br s, 0.5 H, 6-CH)

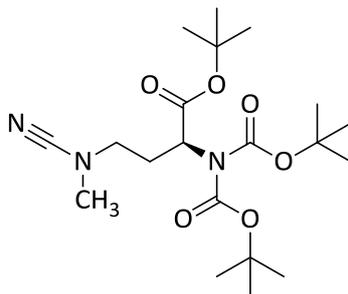
#### <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

δ/ppm = 22.4, 22.6 (5-CH<sub>2</sub>), 26.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 39.6, 39.9 (N-CH<sub>3</sub>), 48.8, 48.9 (4-CH<sub>2</sub>), 50.8, 52.0 (6-CH), 62.7, 63.4 (2-CH<sub>2</sub>), 78.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 79.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 152.9 (C=O-Boc), 168.8 (C=O<sup>t</sup>Bu)

#### MS (ESI)

m/z = 301 [M + H]<sup>+</sup>, 245 [M - C<sub>4</sub>H<sub>8</sub> + H]<sup>+</sup>, 189 [M - 2 x C<sub>4</sub>H<sub>8</sub> + H]<sup>+</sup>

### 6.1.2.3.12 *N* $\alpha$ ,*N* $\alpha$ -Bis-(*t*-Butoxycarbonyl)-*N* $\gamma$ -cyan-*N* $\gamma$ -methyl-*nor*-L-ornithin-*t*-butylester (68)



Vorschrift in Anlehnung an Töpker [1997].<sup>[212]</sup>

In einem Schlenkkolben wird einer Suspension aus 80 mg (0,75 mmol) Bromcyan und 150 mg wasserfreiem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 5 ml trockenem 1,4-Dioxan unter Stickstoff-Atmosphäre, 200 mg (0,5 mmol) des Dimethylamins **67**, gelöst in 5 ml trockenem 1,4-Dioxan, langsam zu getropft. Der Ansatz wird 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wird filtriert um vorhandene Salze zu entfernen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird einer Säulenchromatographie über Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat (3:1) als Elutionsmittel unterzogen.

Ausbeute: 196 mg hellgelbes, viskoses Öl (95%)

DC: R<sub>f</sub> = 0,36 (Petrolether/Ethylacetat 3:1)

Detektion: Ninhydrin, Dragendorff

#### <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

δ/ppm = 1.45 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.52 (s, 18H, 2 x C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.04-2.16 (m, 1H, β-CH<sub>2</sub>), 2.41-2.53 (m, 1H, β-CH<sub>2</sub>), 2.86 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.00-3.16 (m, 2H, γ-CH<sub>2</sub>), 4.79 (dd, <sup>3</sup>J = 5.8, 8.4 Hz, 1H, α-CH)

#### <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)

δ/ppm = 27.6 (β-CH<sub>2</sub>), 27.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.0 (2 x C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 38.9 (N-CH<sub>3</sub>), 50.6 (γ-CH<sub>2</sub>), 56.1 (α-CH), 81.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 83.3 (2 x C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 118.2 (CN), 152.3 (2 C=O-Boc), 169.0 (C=O<sup>t</sup>Bu)

#### MS (ESI)

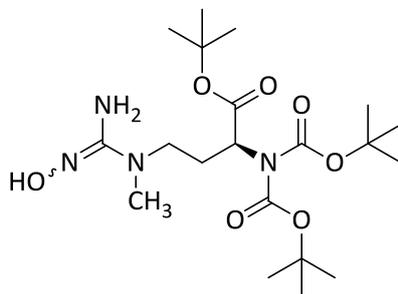
m/z = 849 [2 x M + Na]<sup>+</sup>, 436 [M + Na]<sup>+</sup>

#### Elementaranalyse C<sub>20</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (413.5)

Ber. C 58.09 H 8.53 N 10.16

Gef. C 57.63 H 9.14 N 9.80

### 6.1.2.3.13 $N^{\alpha}N^{\omega}$ -Bis-(*t*-butoxycarbonyl)- $N^{\omega}$ -hydroxy-*N* $\gamma$ -methyl-*nor*-L-arginin-*t*-butylester (69)



Vorschrift in Anlehnung an Schade [2008]:<sup>[128]</sup>

In 5 ml trockenem Methanol werden 207 mg (0,5 mmol) des Cyanamids **68** gelöst. Es werden 50 mg (1,5 mmol) Hydroxylamin, in 5 ml trockenem Methanol gelöst, zugetropft und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (20:1 - 10:1) gereinigt.

Ausbeute: 194 mg hellgelbes, viskoses Öl (87%)

DC:  $R_f = 0,51$  (Dichlormethan/Methanol 8,5:1,5)

Detektion: Ninhydrin, FCNP

#### $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ )

$\delta/\text{ppm} = 1.45$  (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.51 (s, 18H, 2 x  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.89-2.04 (m, 1H,  $\beta\text{-CH}_2$ ), 2.33-2.48 (m, 1H,  $\beta\text{-CH}_2$ ), 3.09 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.20-3.49 (m, 2H,  $\gamma\text{-CH}_2$ ), 4.64 (dd,  $^3J = 7.6, 5.5$  Hz, 1H,  $\alpha\text{-CH}$ ), 6.65, 8.40 (3 x br s, 3H,  $\text{NH}_2, \text{OH}$ )

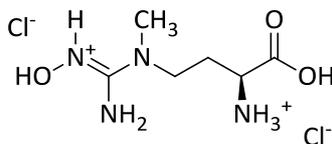
#### $^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ )

$\delta/\text{ppm} = 26.9$  ( $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 27.0 (2 x  $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 27.1 ( $\beta\text{-CH}_2$ ), 35.7 ( $\text{CH}_3$ ), 47.6 ( $\gamma\text{-CH}_2$ ), 54.7 ( $\alpha\text{-CH}$ ), 81.7 ( $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ), 82.7 (2 x  $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ), 151.5 (2 x  $\text{C}=\text{O-Boc}$ ), 157.0 ( $\text{C}=\text{N}$ ), 169.3 ( $\text{C}=\text{O}^t\text{Bu}$ )

#### MS (ESI)

$m/z = 447$  [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>, 391 [ $\text{M} - \text{C}_4\text{H}_8 + \text{H}$ ]<sup>+</sup>, 347 [ $\text{M} - \text{C}_4\text{H}_8 - \text{CO}_2 + \text{H}$ ]<sup>+</sup>, 291 [ $\text{M} - 2 \times \text{C}_4\text{H}_8 - \text{CO}_2 + \text{H}$ ]<sup>+</sup>

#### 6.1.2.3.14 *N*<sup>ω</sup>-Hydroxy-*N*<sup>γ</sup>-methyl-*nor*-L-argininiumdichlorid (*Nor*-NHAM, 54)



150 mg (0,34 mmol) der geschützten Verbindung **69** werden in 10 ml trockenem Dioxan gelöst. Über fünf Minuten wird vorsichtig Chlorwasserstoff eingeleitet. Der Ansatz wird ca. 12 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt und das Lösungsmittel dekantiert. Der Rückstand wird mit etwas Diethylether nachgewaschen und durch Säulenchromatographie über RP<sub>18</sub>-Kieselgel mit *Aqua bidest.* als Elutionsmittel aufgereinigt.

Ausbeute: 64 mg weißes Pulver (72%)

DC:  $R_f = 0,45$  (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig 6:3:1)

Detektion: Ninhydrin

#### <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 2.09 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 2.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.55 (t, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz, 2H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>), 3.92 (m, 1H,  $\alpha$ -CH), 7.97 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 8.67 (s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 10.34 (s, 1H, NH<sup>+</sup>), 10.64 (s, 1H, OH)

#### <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)

$\delta$ /ppm = 27.3 ( $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 36.0 (CH<sub>3</sub>), 46.9 ( $\gamma$ -CH<sub>2</sub>), 49.7 ( $\alpha$ -CH), 157.8 (C=N), 170.3 (C=O)

#### MS (ESI)

$m/z = 213$  [M + Na]<sup>+</sup>, 191 [M + H]<sup>+</sup>

#### HRMS (ESI) für C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>:

berechnet: 191,11387

gemessen: 191,11393

## 6.2 Hemmstudien an den Enzymen des NO-Stoffwechsels

### 6.2.1 Geräte und Materialien

#### Geräte:

Cary 50 MPR Microplate Reader (Varian GmbH, Darmstadt), Cary 50 Scan UV-Visible Spectrophotometer, IKA-Vibrax-VXR-Schüttler (IKA Labortechnik, Staufen), Mikroliter-zentrifuge 2043 (Hettich, Tuttlingen), pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) mit pH-Glaselektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz), Schüttelinkubator DTS-4 (LTF Labortechnik, Wasserburg), Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel), Trockenschrank Heraeus T6060 (Heraeus Holding GmbH, Hanau), Vortexer VF2 (IKA Labortechnik, Staufen)

#### Verbrauchsmaterialien:

96 well-Mikrotiterplatten, Sealing Tape Clear Polyolefin Non-Sterile (nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden), Reaktionsgefäße 1,5 ml (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht),

#### Enzymquellen:

Die hDDAH1 wurden im Arbeitskreis von Kotthaus und Altmann exprimiert, aufgereinigt und mir zur Verfügung gestellt. Die isolierte bovine Leber-Arginase wurde von der Firma Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz).

#### Chemikalien:

Sofern keine Angaben zu den Chemikalien gemacht werden, wurden diese über Bachem, Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen oder selbst synthetisiert.

## 6.2.2 Biochemischen Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Plattenreader-Assays wurden im Arbeitskreis von Jü. Kotthaus entwickelt und etabliert.<sup>[119]</sup>

### 6.2.2.1 Citrullin-Plattenreader-Assay (hDDAH1)

#### 6.2.2.1.1 Derivatisierung

Das Derivatisierungsreagenz (Colder) besteht aus zwei Lösungen A + B, die unmittelbar vor dem Einsatz im Verhältnis 1:3 miteinander vermischt werden. Das Gemisch ist im Dunkeln bis zu 30 Minuten stabil.

Lösung A: 80 mM Diacetylmonoxim, 2 mM Thiosemicarbazid (Lagerung bei 4°C, 1 Monat haltbar)

Lösung B: 200 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> konz., 330 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konz., 750 mg NH<sub>4</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> × 12 H<sub>2</sub>O ad 1000 ml *Aqua bidest.*

Zur Derivatisierung wurden 200 µl Colder-Reagenz zu einem 150 µl-Inkubationsansatz in einer hitzestabilen 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde mit einer hitzestabilen Klebefolie verschlossen und zur Farbentwicklung für 15 min bei 95°C in den Trockenschrank gestellt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Platte im Absorptionsmaximum bei 540,5 nm vermessen. Das Reaktionsprodukt ist ca. 20 Minuten stabil.<sup>[226]</sup>

#### 6.2.2.1.2 Hemmung bei 1 mM- und 0,1 mM-Inhibitor-Konzentration

Ein Inkubationsansatz bestand aus 150 µl Gesamtvolumen 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 mit NMMA in einer Endkonzentration von 300 µM. Die Inhibitoren wurden in Konzentrationen von 1 mM und 0,1 mM eingesetzt. Als Kontrollwert wurden vier Inkubationen ohne Inhibitorzusatz durchgeführt. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 4 µg hDDAH1 gestartet und mit geschlossenem Deckel bei 37°C 30 Minuten im Platteninkubator inkubiert. Die Reaktion wurde mit 200 µl Colder-Reagenz abgestoppt und derivatisiert.

### 6.2.2.1.3 $K_i$ -Wert-Bestimmung

Die Bestimmung erfolgte wie unter 7.2.2.1.2 beschrieben mit dem Unterschied, dass fünf verschiedene NMMA-Konzentrationen (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 700  $\mu$ M, 1250  $\mu$ M) sowie fünf verschiedene Inhibitorkonzentrationen (ermittelt aus der Hemmpotenz der Vortestung) eingesetzt wurden. Jede Inhibitorkonzentration wurde jeweils doppelt mit jeder NMMA-Konzentration inkubiert. Zusätzlich wurde zu jeder NMMA-Konzentration eine Kontrollinkubation ohne Inhibitorzusatz durchgeführt.

Mit Hilfe von Sigma-Plot 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) wurden für jede Inhibitorkonzentration die entsprechenden  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte ermittelt. Durch eine Sekundärauftragung der Inhibitorkonzentration gegen  $K_m/V_{max}$  wurde durch Extrapolation der Ausgleichsgerade auf die Abzisse der  $K_{ic}$ -Wert bestimmt.

Die  $K_i$ -Wert-Bestimmung wurde doppelt an unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

### 6.2.2.2 Harnstoff-Plattenreader-Assay (Arginase)

#### 6.2.2.2.1 Derivatisierung

Die Derivatisierung erfolgte wie unter 6.2.2.1.1 beschrieben. Die Platten wurden abweichend dazu im Absorptionsmaximum bei 526 nm bestimmt.

#### 6.2.2.2.2 Hemmung bei 1 mM- und 0,1 mM-Inhibitor-Konzentration

Ein Inkubationsansatz bestand aus 150  $\mu$ l Gesamtvolumen 50 mM Tris-Puffer pH 7,4 mit L-Arginin in einer Endkonzentration von 7 mM. Die Inhibitoren wurden in Konzentrationen von 1 mM und 0,1 mM eingesetzt. Als Kontrollwert wurden vier Inkubationen ohne Inhibitorzusatz durchgeführt. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 0,3  $\mu$ g Arginase gestartet, die zuvor zwei Stunden bei 37°C im Schüttelwasserbad, gelöst in Aktivierungspuffer (375  $\mu$ M  $MnCl_2$ , 375  $\mu$ M Maleinsäure in 50 mM Tris-Puffer pH 7,4), rekonstituiert wurde. Mit geschlossenem Deckel wurde 30 Minuten bei 37°C im Platteninkubator inkubiert. Die Reaktion wurde mit 200  $\mu$ l Colder-Reagenz abgestoppt und derivatisiert.

### 6.2.2.2.3 $K_i$ -Wert-Bestimmung

Die Bestimmung erfolgte wie unter 6.2.2.2.2 beschrieben mit dem Unterschied, dass fünf verschiedene L-Arginin-Konzentrationen (0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM und 20 mM) sowie fünf verschiedene Inhibitorkonzentrationen (ermittelt aus der Hemmpotenz der Vortestung) eingesetzt wurden. Jede Inhibitorkonzentration wurde jeweils doppelt mit jeder L-Arginin-Konzentration inkubiert. Zusätzlich wurde zu jeder L-Arginin-Konzentration eine Kontrollinkubation ohne Inhibitorzusatz durchgeführt.

Mit Hilfe von Sigma-Plot 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) wurden für jede Inhibitorkonzentration die entsprechenden  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte ermittelt. Durch eine Sekundärauftragung der Inhibitorkonzentration gegen  $K_m/V_{max}$  wurde durch Extrapolation der Ausgleichsgerade auf die Abzisse der  $K_i$ -Wert bestimmt.

Die  $K_i$ -Wert-Bestimmung wurde doppelt an unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

## 6.3 Untersuchungen zur hydrolytischen Stabilität und Biotransformation

### 6.3.1 Geräte und Materialien

#### Geräte:

IKA-Vibrax-VXR-Schüttler (IKA Labortechnik, Staufen), Mikroliterzentrifuge 2043 (Hettich, Tuttlingen), pH-Messgerät InoLab pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim) mit pH-Glaselektrode LiQ Plast (Hamilton, Bonaduz, Schweiz), Schüttelwasserbad GFL-1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel), Sonorex Super RK 510 H Ultraschallbad (Bandelin, Berlin), Vortexer VF2 (IKA Labortechnik, Staufen)

#### Verbrauchsmaterialien:

Sartorius Membranfilter (0,45 µM), Reaktionsgefäße 1,5 ml (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)

#### Enzymquellen:

Die Gewinnung der verwendeten Schweineleberfraktionen erfolgte im Arbeitskreis Clement von Treuer nach einem standardisierten Protokoll.<sup>[227]</sup> Die rekombinanten Enzyme: hmARC1+2, Cytochrom b5 und Cytochrom b5-Reduktase, wurden im Arbeitskreis von Prof. Mendel (Molekular- und Zellbiologie, TU Carolo-Wilhelmina Braunschweig) exprimiert.

#### Chemikalien:

Sofern keine Angaben zu den Chemikalien gemacht werden, wurden diese über Fluka, Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen oder selbst synthetisiert. Acetonitril und Methanol stammen von J.T. Baker (Griesheim)

## 6.3.2 Methoden

Substrat und Metabolit wurden mittels HPLC-Analytik mit automatisierter Vorsäulenderivatisierung getrennt und durch Fluoreszenz-Detektion quantifiziert.

### 6.3.2.1 Derivatisierung

Die Derivatisierung ist bei allen aufgeführten HPLC-Methoden gleich und wird wie folgt durchgeführt:

Reagenz:                50 mg o-PA gelöst in 1 ml Methanol  
                               9 ml 0,2 M Kaliumborat-Puffer pH 9,4  
                               53 µl 2-Mercaptoethanol

Derivatisierung:      10 µl der Probe wurden direkt im Autosampler mit 14 µl des Derivatisierungs-Reagenzes gemischt und zwei Minuten lang vor der Injektion bei Raumtemperatur reagieren gelassen.

### 6.3.2.2 Biotransformationsuntersuchung an Schweineleberfraktionen

#### 6.3.2.2.1 HPLC-Methode

Stationäre Phase:      NovaPak RP-18-Säule 4 µm (4 x 150 mm, VDS Optilab) Vorsäule: Phenomenex C18 (4 x 3,0 mm)

Temperatur:            40°C

Mobile Phase:         Eluent A: 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,6

Eluent B: Acetonitril 50% / Methanol 50%

Flussrate:              1 ml / min

Gradienten-Profil:

Zeit in min	Eluent A in %	Eluent B in %
0	100	0
1	100	0
5	25	75
10	25	75
15	100	0
18	100	0

Detektion:	Fluoreszenz: $\lambda_{\text{ex}}$ : 338 nm; $\lambda_{\text{em}}$ : 425 nm	
Injektionsvol.:	10 $\mu\text{l}$	
Retentionszeiten:	<i>N</i> -OH-AbMEG ( <b>32a</b> )	12,6 $\pm$ 0,1 min
	AbMEG ( <b>27</b> )	14,4 $\pm$ 0,1 min

#### 6.3.2.2 Kalibrierung und Wiederfindung

Es wurde eine 7-Punkt-Kalibrierung von AbMEG im Bereich von 2,5 bis 200  $\mu\text{M}$  in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 durchgeführt.

Für die Wiederfindung wurden die gleichen Konzentrationen an AbMEG mit 50  $\mu\text{g}$  hitzedenaturiertem Protein und 1,5 mM *N*-OH-AbMEG in 150  $\mu\text{l}$  100mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 bei 37°C inkubiert. Nach 23 min wurde der Ansatz mit 150  $\mu\text{l}$  gekühltem Methanol versetzt, die Proben für fünf Minuten geschüttelt und anschließend das Protein abzentrifugiert (13.000g / 5 min). Der Überstand wurde mit der HPLC vermessen.

#### 6.3.2.3 *In vitro*-Reduktionsassay mit subzellulären Fraktionen

Die Inkubationen wurden mit *N*-OH-AbMEG in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 in einer Endkonzentration von 3 mM in einem Gesamtvolumen von 150  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Als Enzymquellen wurden 50  $\mu\text{g}$  postnuclearer Überstand (PNS), 50  $\mu\text{g}$  Mikrosomen- und Cytosol-Überstand (9000g), 50  $\mu\text{g}$  Mitochondrien, und 5  $\mu\text{g}$  Vesikel der äußeren Mitochondrienmembran (OMV), aus Schweineleber gewonnen, eingesetzt. Der Ansatz wurde in einem Schüttelwasserbad bei 37°C drei Minuten vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet. Nach 20 Minuten aerober Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  gekühltem Methanol gestoppt, die Proben für fünf Minuten geschüttelt und anschließend zentrifugiert (13.000g / 5 min). Die Überstände wurden mittels HPLC analysiert.

### 6.3.2.3 Biotransformationsuntersuchung am rekombinanten hmARC-Enzym-system

#### 6.3.2.3.1 HPLC-Methode

Stationäre Phase:	Aeris PEPTIDE XB-C18, 3,6 $\mu\text{m}$ (4,6 x 150 mm, Phenomenex)	
	Vorsäule: Phenomenex C18 (4 x 3,0 mm)	
Temperatur:	40°C	
Mobile Phase:	60% 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,5 / 40% Methanol	
Flussrate:	1 ml / min	
Detektion:	Fluoreszenz: $\lambda_{\text{ex}}$ : 338 nm; $\lambda_{\text{em}}$ : 425 nm	
Injektionsvol.:	10 $\mu\text{l}$	
Retentionszeiten:	AbMEG ( <b>27</b> )	13,6 $\pm$ 0,1 min
	<i>N</i> -OH-AbMEG ( <b>32a</b> )	17,9 $\pm$ 0,1 min

#### 6.3.2.3.2 Kalibrierung und Wiederfindung

Es wurde eine 7-Punkt-Kalibrierung von AbMEG (**27**) im Bereich von 2,5 bis 200  $\mu\text{M}$  in 20 mM MES-Puffer pH 6,0 durchgeführt.

Für die Wiederfindung wurden die gleichen Konzentrationen an AbMEG mit 50  $\mu\text{g}$  hitzedenaturiertem Protein und 1,5 mM *N*-OH-AbMEG in 150  $\mu\text{l}$  20 mM MES-Puffer pH 6,0 bei 37°C inkubiert. Nach 23 min wurde der Ansatz mit 150  $\mu\text{l}$  gekühltem Methanol versetzt die Proben für fünf Minuten geschüttelt und anschließend das Protein abzentrifugiert (13.000g / 5 min). Der Überstand wurde mit der HPLC vermessen.

#### 6.3.2.3.3 *In vitro*-Reduktionsassay mit dem rekombinanten Enzymsystem

Die Inkubationen wurden mit *N*-OH-AbMEG (**32a**) in 20 mM MES-Puffer pH 6,0 in einer Endkonzentration von 3 mM in einem Gesamtvolumen von 150  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Als Enzymquellen wurden 2,3-7  $\mu\text{g}$  hmARC (berechnet nach Molybdän-Gehalt), 10,8  $\mu\text{g}$  Cytochrom b5 (berechnet nach Häm-Gehalt) 0,25  $\mu\text{g}$  Cytochrom b5 Reduktase (berechnet nach FAD-Gehalt) eingesetzt. Der Ansatz wurde in einem Schüttelwasserbad bei 37°C drei Minuten vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet. Nach 20 Minuten aerober Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  gekühltem Acetonitril gestoppt, die Proben für fünf Minuten geschüttelt und anschließend zentrifugiert (13.000g / 5 min). Die Überstände wurden der HPLC zugeführt.

### 6.3.2.4 pH-abhängige, hydrolytische Stabilität

#### 6.3.2.4.1 HPLC-Methode

Stationäre Phase: Aeris PEPTIDE XB-C18, 3,6  $\mu\text{m}$  (4,6 x 150 mm, Phenomenex)  
Vorsäule: Phenomenex C18 (4 x 3,0 mm)

Temperatur: 40°C

Flussrate: 1 ml / min

Detektion: Fluoreszenz:  $\lambda_{\text{ex}}$ : 338 nm;  $\lambda_{\text{em}}$ : 425 nm

Injektionsvol.: 10  $\mu\text{l}$

Mobile Phase: für **32a**: 60% 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,5 / 40% Methanol  
für **32b**: 42% 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,5 / 58% Methanol

Retentionszeiten: *N*-OH-AbMEG (**32a**) 17,9  $\pm$  0,1 min

Retentionszeiten: *O*-Methyl-HAM (**32b**) 10,6  $\pm$  0,1 min

#### 6.3.2.4.2 *In vitro*-Stabilitäts-Assay

Die pH-abhängige, hydrolytische Stabilität wurde durch Inkubation von *N*-OH-AbMEG (**32a**) und *O*-Methyl-HAM (**32b**) in 10 mM Kaliumphosphatpuffer bei pH 2, pH 7,4 und pH 9 über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt. Dazu wurden die Verbindungen in einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  in 150  $\mu\text{l}$  Puffer gelöst und bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 9 und 24 Stunden wurden Proben gezogen und mit 150  $\mu\text{l}$  100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 versetzt und mit der HPLC vermessen.

## 7 Literaturverzeichnis

---

- [1] IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G.  
Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84*, 9265–9269.
- [2] PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S.  
Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature* **1987**, *327*, 524–526.
- [3] FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V.  
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* **1980**, *288*, 373–376.
- [4] SORELLE, R.  
Nobel prize awarded to scientists for nitric oxide discoveries, *Circulation* **1998**, *98*, 2365–2366.
- [5] BREDT, D. S.; SNYDER, S. H.  
Nitric oxide: a physiologic messenger molecule, *Annu Rev Biochem* **1994**, *63*, 175–195.
- [6] PACHER, P.; BECKMAN, J.; LIAUDET, L.  
Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease, *Physiol Rev* **2007**, *87*, 315–424.
- [7] HEVEL, J. M.; MARLETTA, M. A.  
Nitric-oxide synthase assays in *Methods in Enzymology* **1994**, *233*, 250–258.
- [8] IGNARRO, L. J.  
Physiology and pathophysiology of nitric oxide, *Kidney Int Suppl. (1974-2011)* **1996**, *55*, 2-5.
- [9] LINDE GAS THERAPEUTICS GMBH, *Fachinformation INOmax 400 ppm*, **2011**.
- [10] CASTILLO, L.; BEAUMIER, L.; AJAMI, A. M.; YOUNG, V. R.  
Whole body nitric oxide synthesis in healthy men determined from arginine-to-citrulline labeling, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 11460–11465.
- [11] MORRIS, S.  
Arginine metabolism: boundaries of our knowledge, *J Nutr* **2007**, *137*, 1602S-1609S.
- [12] RACKÉ, K.; WARNKEN, M.  
L-Arginine metabolic pathways, *The Open Nitric Oxide Journal* **2010**, 9–19.
- [13] TRAN, C.; LEIPER, J.; VALLANCE, P.  
The DDAH/ADMA/NOS pathway, *Atheroscler Suppl* **2003**, *4*, 33–40.

- [14] BOUCHER, J. L.; CUSTOT, J.; VADON, S.; DELAFORGE, M.; LEPOIVRE, M.; TENU, J. P.; YAPO, A.; MANSUY, D.  
*N*<sup>0</sup>-hydroxyl-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase, *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, *203*, 1614–1621.
- [15] DAGHIGH, F.; FUKUTO, J. M.; ASH, D. E.  
Inhibition of rat liver arginase by an intermediate in NO biosynthesis, *N*<sup>0</sup>-hydroxy-L-arginine: implications for the regulation of nitric oxide biosynthesis by arginase, *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, *202*, 174–180.
- [16] OGAWA, T.; KIMOTO, M.; SASAOKA, K.  
Purification and properties of a new enzyme, *N*<sup>0</sup>,*N*<sup>0</sup>-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney, *J Biol Chem* **1989**, *264*, 10205–10209.
- [17] LEIPER, J.; MURRAY-RUST, J.; McDONALD, N.; VALLANCE, P.  
*S*-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 13527–13532.
- [18] MARLETTA, M. A.  
Nitric oxide synthase structure and mechanism, *J Biol Chem* **1993**, *268*, 12231–12234.
- [19] GHAFOURIFAR, P.; RICHTER, C.  
Nitric oxide synthase activity in mitochondria, *FEBS Lett* **1997**, *418*, 291–296.
- [20] DELICONSTANTINOS, G.; VILLIOTOU, V.; STAVRIDES, J. C.; SALEMES, N.; GOGAS, J.  
Nitric oxide and peroxynitrite production by human erythrocytes: a causative factor of toxic anemia in breast cancer patients, *Anticancer Res* **1995**, *15*, 1435–1446.
- [21] HORN, P.  
Aktivität und Bedeutung der erythrozytären NOS bei kardiovaskulären Risikofaktoren, *Dissertation*, Düsseldorf, **2008**.
- [22] ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G.  
Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *Biochem J* **2001**, *357*, 593–615.
- [23] BREDT, D. S.; SNYDER, S. H.  
Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, *87*, 682–685.
- [24] WHITE, K. A.; MARLETTA, M. A.  
Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein, *Biochemistry* **1992**, *31*, 6627–6631.
- [25] ANDREW, P. J.; MAYER, B.  
Enzymatic function of nitric oxide synthases, *Cardiovasc Res* **1999**, *43*, 521–531.

- [26] MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R.  
International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research, *Pharmacol Rev* **1997**, *49*, 137–142.
- [27] WEINER, C. P.; LIZASOAIN, I.; BAYLIS, S. A.; KNOWLES, R. G.; CHARLES, I. G.; MONCADA, S.  
Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91*, 5212–5216.
- [28] OESS, S.; ICKING, A.; FULTON, D.; GOVERS, R.; MULLER-ESTERL, W.  
Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases, *Biochem J* **2006**, *396*, 401–409.
- [29] McDONALD, K. K.; ZHARIKOV, S.; BLOCK, E. R.; KILBERG, M. S.  
A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the “arginine paradox”, *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 31213–31216.
- [30] ERDMANN, E, *Klinische Kardiologie*. Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2011**.
- [31] FESTA, A.; STANGER, O.; WASCHER, T. C.  
Adipositas und Herz: Neue Risikofaktoren und Surrogatendpunkte, *Journal für Kardiologie* **2003**, 409–417.
- [32] NASEEM, K.  
The role of nitric oxide in cardiovascular diseases, *Mol Aspects Med* **2005**, *26*, 33–65.
- [33] FORSTERMANN, U.; MUGGE, A.; ALHEID, U.; HAVERICH, A.; FROLICH, J. C.  
Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries, *Circ Res* **1988**, *62*, 185–190.
- [34] SACHAIS, B. S.  
Platelet-endothelial interactions in atherosclerosis, *Curr Atheroscler Rep* **2001**, *3*, 412–416.
- [35] CALVER, A.; COLLIER, J.; VALLANCE, P.  
Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes, *J Clin Invest* **1992**, *90*, 2548–2554.
- [36] KELM, M.  
The L-arginine-nitric oxide pathway in hypertension, *Curr Hypertens Rep* **2003**, *5*, 80–86.
- [37] TADDEI, S.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; SUDANO, I.; SALVETTI, A.  
Endothelial dysfunction in hypertension, *J Cardiovasc Pharmacol* **2001**, *38 Suppl 2*, 11–14.
- [38] RAIJ, L.  
Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease, *J Clin Hypertens (Greenwich)* **2006**, *8*, 30–39.

- [39] DREXLER, H.; ZEIHNER, A. M.  
Endothelial function in human coronary arteries in vivo. Focus on hypercholesterolemia, *Hypertension* **1991**, *18*, II 90-99.
- [40] VINCENT, S. R.  
Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system, *Prog Neurobiol* **1994**, *42*, 129–160.
- [41] KOBZIK, L.; REID, M. B.; BREDT, D. S.; STAMLER, J. S.  
Nitric oxide in skeletal muscle, *Nature* **1994**, *372*, 546–548.
- [42] MAYER, B.; ANDREW, P.  
Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1998**, *358*, 127–133.
- [43] OKAMURA, T.; AYAJIKI, K.; FUJIOKA, H.; SHINOZAKI, K.; TODA, N.  
Neurogenic cerebral vasodilation mediated by nitric oxide, *Jpn J Pharmacol* **2002**, *88*, 32–38.
- [44] EISEL, U. L.  
Cytokines in degenerative brain diseases: lessons from transgenic animals, *Curr Top Microbiol Immunol* **2002**, *265*, 49–62.
- [45] ZHOU, L.; ZHU, D.-Y.  
Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications, *Nitric Oxide* **2009**, *20*, 223–230.
- [46] TODA, N.; AYAJIKI, K.; OKAMURA, T.  
Nitric oxide and penile erectile function, *Pharmacol Ther* **2005**, *106*, 233–266.
- [47] MUSICKI, B.; ROSS, A.; CHAMPION, H.; BURNETT, A.; BIVALACQUA, T.  
Posttranslational modification of constitutive nitric oxide synthase in the penis, *J Androl* **2009**, *30*, 352–362.
- [48] SIMS, N.; ANDERSON, M.  
Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke, *Neurochem Int* **2002**, *40*, 511–526.
- [49] NEEB, L.; REUTER, U.  
Nitric oxide in migraine, *CNS Neurol Disord Drug Targets* **2007**, *6*, 258–264.
- [50] LÜTH, H. J.; HOLZER, M.; GERTZ, H. J.; ARENDT, T.  
Aberrant expression of nNOS in pyramidal neurons in Alzheimer's disease is highly co-localized with p21ras and p16INK4a, *Brain Res* **2000**, *852*, 45–55.
- [51] THORNS, V.; HANSEN, L.; MASLIAH, E.  
nNOS expressing neurons in the entorhinal cortex and hippocampus are affected in patients with Alzheimer's disease, *Exp Neurol* **1998**, *150*, 14–20.

- [52] LÜTH, H.-J.; MÜ NCH, G.; ARENDT, T.  
Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation, *Brain Res* **2002**, *953*, 135–143.
- [53] CHABRIER, P. E.; DEMERLE-PALLARDY, C.; AUGUET, M.  
Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases, *Cell Mol Life Sci* **1999**, *55*, 1029–1035.
- [54] GATTO, E. M.; RIOBO, N. A.; CARRERAS, M. C.; CHERNAVSKY, A.; RUBIO, A.; SATZ, M. L.; PODEROSO, J. J.  
Overexpression of neutrophil neuronal nitric oxide synthase in Parkinson's disease, *Nitric Oxide* **2000**, *4*, 534–539.
- [55] ISHIKAWA, M.; QUOCK, R.  
Role of nitric-oxide synthase isoforms in nitrous oxide antinociception in mice, *J Pharmacol Exp Ther* **2003**, *306*, 484–489.
- [56] ROMERO, T. R. L.; RESENDE, L. C.; DUARTE, I. D. G.  
The neuronal NO synthase participation in the peripheral antinociception mechanism induced by several analgesic drugs, *Nitric Oxide* **2011**, *25*, 431–435.
- [57] LECHNER, M.; LIRK, P.; RIEDER, J.  
Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin, *Semin Cancer Biol* **2005**, *15*, 277–289.
- [58] BRUCKDORFER, R.  
The basics about nitric oxide, *Mol Aspects Med* **2005**, *26*, 3–31.
- [59] JENKINSON, C. P.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D.  
Comparative properties of arginases, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **1996**, *114*, 107–132.
- [60] ASH, D.  
Structure and function of arginases, *J Nutr* **2004**, *134*, 2760S-2764S; discussion 2765S-2767S.
- [61] STONE, E.; GLAZER, E.; CHANTRANUPONG, L.; CHERUKURI, P.; BREECE, R.; TIERNEY, D.; CURLEY, S.; IVERSON, B.; GEORGIU, G.  
Replacing Mn(2+) with Co(2+) in human arginase I enhances cytotoxicity toward L-arginine auxotrophic cancer cell lines, *ACS Chem Biol* **2010**, *5*, 333–342.
- [62] COX, J. D.; CAMA, E.; COLLELUORI, D. M.; PETHE, S.; BOUCHER, J. L.; MANSUY, D.; ASH, D. E.; CHRISTIANSON, D. W.  
Mechanistic and metabolic inferences from the binding of substrate analogues and products to arginase, *Biochemistry* **2001**, *40*, 2689–2701.
- [63] KANYO, Z. F.; SCOLNICK, L. R.; ASH, D. E.; CHRISTIANSON, D. W.  
Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase, *Nature* **1996**, *383*, 554–557.

- [64] YIP, M. C.; KNOX, W. E.  
Function of arginase in lactating mammary gland, *Biochem J* **1972**, *127*, 893–899.
- [65] CUSTOT, J.; BOUCHER, J.-L.; VADON, S.; GUEDES, C.; DIJOLS, S.; DEALFORGE, M.; MANSUY, D.  
*N*<sup>0</sup>-hydroxyamino- $\alpha$ -amino acids as a new class of very strong inhibitors of arginases, *J Biol Inorg Chem* **1996**, *1*, 73–82.
- [66] CUSTOT, J.; MOALI, C.; BROLLO, M.; BOUCHER, J. L.; DELAFORGE, M.; MANSUY, D.; TENU, J. P.; ZIMMERMANN, J. L.  
The new  $\alpha$ -amino acid *N*<sup>0</sup>-hydroxy-*nor*-L-arginine: a high-affinity inhibitor of arginase well adapted to bind to its manganese cluster, *J Am Chem Soc* **1997**, *119*, 4086–4087.
- [67] HECKER, M.; SCHOTT, C.; BUCHER, B.; BUSSE, R.; STOCLET, J. C.  
Increase in serum *N*<sup>0</sup>-hydroxy-L-arginine in rats treated with bacterial lipopolysaccharide, *Eur J Pharmacol* **1995**, *275*, R1-3.
- [68] WIGAND, R.; MEYER, J.; BUSSE, R.; HECKER, M.  
Increased serum *N*<sup>0</sup>-hydroxy-L-arginine in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus as an index of an increased nitric oxide synthase activity, *Ann Rheum Dis* **1997**, *56*, 330–332.
- [69] MEYER, J.; RICHTER, N.; HECKER, M.  
High-performance liquid chromatographic determination of nitric oxide synthase-related arginine derivatives in vitro and in vivo, *Anal Biochem* **1997**, *247*, 11–16.
- [70] KIM, J.; BUGAJ, L.; OH, Y.; BIVALACQUA, T.; RYOO, S.; SOUCY, K.; SANTHANAM, L.; WEBB, A.; CAMARA, A.; SIKKA, G.; NYHAN, D.; SHOUKAS, A.; ILIES, M.; CHRISTIANSON, D.; CHAMPION, H.; BERKOWITZ, D.  
Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats, *J Appl Physiol* **2009**, *107*, 1249–1257.
- [71] D'ANTONIO, E. L.; CHRISTIANSON, D. W.  
Crystal structures of complexes with cobalt-reconstituted human arginase I, *Biochemistry* **2011**, *50*, 8018–8027.
- [72] MAARSINGH, H.; ZAAGSMA, J.; MEURS, H.  
Arginase: a key enzyme in the pathophysiology of allergic asthma opening novel therapeutic perspectives, *Br J Pharmacol* **2009**, *158*, 652–664.
- [73] NORTH, M. L.; MEURS, H.; ZAAGSMA, J.; SCOTT, J. A.; MAARSINGH, H.  
Arginase in asthma - recent developments in animal and human studies, *The Open Nitric Oxide Journal* **2010**, *2010*, 20–36.
- [74] MCBRIDE, A. E.; SILVER, P. A.  
State of the arg: protein methylation at arginine comes of age, *Cell* **2001**, *106*, 5–8.
- [75] BEDFORD, M.; CLARKE, S.  
Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why, *Mol Cell* **2009**, *33*, 1–13.

- [76] LEIPER, J.; NANDI, M.  
The therapeutic potential of targeting endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis, *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10*, 277–291.
- [77] LEIPER, J. M.; SANTA, M.; CHUBB, A.; MACALLISTER, R. J.; CHARLES, I. G.; WHITLEY, G. S.; VALLANCE, P.  
Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases, *Biochem J* **1999**, *343 Pt 1*, 209–214.
- [78] FREY, D.; BRAUN, O.; BRIAND, C.; VASAK, M.; GRUTTER, M.  
Structure of the mammalian NOS regulator dimethylarginine dimethylaminohydrolase: A basis for the design of specific inhibitors, *Structure* **2006**, *14*, 901–911.
- [79] STONE, E.; COSTELLO, A.; TIERNEY, D.; FAST, W.  
Substrate-assisted cysteine deprotonation in the mechanism of dimethylargininase (DDAH) from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochemistry* **2006**, *45*, 5618–5630.
- [80] KNIPP, M.; CHARNOCK, J. M.; GARNER, C. D.; VASAK, M.  
Structural and functional characterization of the Zn(II) site in dimethylargininase-1 (DDAH-1) from bovine brain. Zn(II) release activates DDAH-1, *J Biol Chem* **2001**, *276*, 40449–40456.
- [81] KNIPP, M.; BRAUN, O.; GEHRIG, P.; SACK, R.; VASAK, M.  
Zn(II)-free dimethylargininase-1 (DDAH-1) is inhibited upon specific Cys-S-nitrosylation, *J Biol Chem* **2003**, *278*, 3410–3416.
- [82] GRAY, G.; PATRIZIO, M.; SHERRY, L.; MILLER, A.; MALAKI, M.; WALLACE, A.; LEIPER, J.; VALLANCE, P.  
Immunolocalisation and activity of DDAH I and II in the heart and modification post-myocardial infarction, *Acta Histochem* **2010**, *112*, 413–423.
- [83] WANG, D.; GILL, P.; CHABRASHVILI, T.; ONOZATO, M.; RAGGIO, J.; MENDONCA, M.; DENNEHY, K.; LI, M.; MODLINGER, P.; LEIPER, J.; VALLANCE, P.; ADLER, O.; LEONE, A.; TOJO, A.; WELCH, W.; WILCOX, C.  
Isoform-specific regulation by  $N^0, N^0$ -dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/NO, *Circ Res* **2007**, *101*, 627–635.
- [84] HU, X.; ATZLER, D.; XU, X.; ZHANG, P.; GUO, H.; LU, Z.; FASSETT, J.; SCHWEDHELM, E.; BOGER, R.; BACHE, R.; CHEN, Y.  
Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 is the critical enzyme for degrading the cardiovascular risk factor asymmetrical dimethylarginine, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2011**, *31*, 1540–1546.
- [85] ALTMANN, K.  
Dissertation in Vorbereitung, Kiel.
- [86] ZHANG, P.; HU, X.; XU, X.; CHEN, Y.; BACHE, R.  
Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 modulates endothelial cell growth through nitric oxide and Akt, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2011**, *31*, 890–897.

- [87] POPE, A.; KARRUPIAH, K.; KEARNS, P.; XIA, Y.; CARDOUNEL, A.  
Role of dimethylarginine dimethylaminohydrolases in the regulation of endothelial nitric oxide production, *J Biol Chem* **2009**, *284*, 35338–35347.
- [88] VALLANCE, P.; LEIPER, J.  
Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2004**, *24*, 1023–1030.
- [89] ANTHONY, S.; LEIPER, J.; VALLANCE, P.  
Endogenous production of nitric oxide synthase inhibitors, *Vasc Med* **2005**, *10 Suppl 1*, S3-9.
- [90] MUTSCHLER, E.; GEISSLINGER, G.; KROEMER, H. K.; RUTH, P.; SCHÄFER-KORTING, M,  
*Mutschler Arzneimittelwirkungen*. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **2008**.
- [91] MOALI, C.; BROLLO, M.; CUSTOT, J.; SARI, M. A.; BOUCHER, J. L.; STUEHR, D. J.; MANSUY, D.  
Recognition of alpha-amino acids bearing various C=NOH functions by nitric oxide synthase and arginase involves very different structural determinants, *Biochemistry* **2000**, *39*, 8208–8218.
- [92] MANSUY, D.; BOUCHER, J.-L.  
Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases, *Free Radic Biol Med* **2004**, *37*, 1105–1121.
- [93] SALERNO, L.; SORRENTI, V.; DI, G.; ROMEO, G.; SIRACUSA, M. A.  
Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors, *Curr Pharm Des* **2002**, *8*, 177–200.
- [94] LOW, S.  
Application of pharmaceuticals to nitric oxide, *Mol Aspects Med* **2005**, *26*, 97–138.
- [95] MADDAFORD, S.; ANNEDI, S. C.; RAMNAUTH, J.; RAKHIT, S.  
Advancements in the development of nitric oxide synthase inhibitors, *Annu Rep Med Chem* **2009**, *44*, 27-50.
- [96] BAGGIO, R.; ELBAUM, D.; KANYO, Z. F.; CARROLL, P. J.; CAVALLI, R. C.; ASH, D. E.; CHRISTIANSON, D. W.  
Inhibition of Mn<sup>2+</sup> 2-arginase by borate leads to the design of a transition state analogue inhibitor, 2(S)-amino-6-borono-hexanoic acid, *J Am Chem Soc* **1997**, *119*, 8107–8108.
- [97] KIM, N. N.; COX, J. D.; BAGGIO, R. F.; EMIG, F. A.; MISTRY, S. K.; HARPER, S. L.; SPEICHER, D. W.; MORRIS, S.; ASH, D. E.; TRAISH, A.; CHRISTIANSON, D. W.  
Probing erectile function: S-(2-boronoethyl)-L-cysteine binds to arginase as a transition state analogue and enhances smooth muscle relaxation in human penile corpus cavernosum, *Biochemistry* **2001**, *40*, 2678–2688.

- [98] TENU, J. P.; LEPOIVRE, M.; MOALI, C.; BROLLO, M.; MANSUY, D.; BOUCHER, J. L. Effects of the new arginase inhibitor *N*<sup>0</sup>-hydroxy-*nor*-L-arginine on NO synthase activity in murine macrophages, *Nitric Oxide* **1999**, *3*, 427–438.
- [99] ILIES, M.; DI, C.; NORTH, M.; SCOTT, J.; CHRISTIANSON, D. 2-aminoimidazole amino acids as inhibitors of the binuclear manganese metalloenzyme human arginase I, *J Med Chem* **2010**, *53*, 4266–4276.
- [100] COLLELUORI, D. M.; ASH, D. E. Classical and slow-binding inhibitors of human type II arginase, *Biochemistry* **2001**, *40*, 9356–9362.
- [101] RILEY, E.; ROBERTS, S.; ULLMAN, B. Inhibition profile of *Leishmania mexicana* arginase reveals differences with human arginase I, *Int J Parasitol* **2011**, *41*, 545–552.
- [102] BAGNOST, T.; BERTHELOT, A.; BOUHADDI, M.; LAURANT, P.; ANDRE, C.; GUILLAUME, Y.; DEMOUGEOT, C. Treatment with the arginase inhibitor *N*<sup>0</sup>-hydroxy-*nor*-L-arginine improves vascular function and lowers blood pressure in adult spontaneously hypertensive rat, *J Hypertens* **2008**, *26*, 1110–1118.
- [103] KROTOVA, K.; PATEL, J.; BLOCK, E.; ZHARIKOV, S. Endothelial arginase II responds to pharmacological inhibition by elevation in protein level, *Mol Cell Biochem* **2010**, *343*, 211–216.
- [104] ACHAN, V.; TRAN, C.; ARRIGONI, F.; WHITLEY, G.; LEIPER, J.; VALLANCE, P. all-trans-Retinoic acid increases nitric oxide synthesis by endothelial cells: a role for the induction of dimethylarginine dimethylaminohydrolase, *Circ Res* **2002**, *90*, 764–769.
- [105] LEE, W.; KIM, S.-W.; KIM, G.; HAN, S.; WON, J.; JUNG, C.; PARK, H.-S.; CHOI, D.; LEE, K.-U.; PARK, J.-Y.  $\alpha$ -lipoic acid activates dimethylarginine dimethylaminohydrolase in cultured endothelial cells, *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *398*, 653–658.
- [106] UEDA, S.; KATO, S.; MATSUOKA, H.; KIMOTO, M.; OKUDA, S.; MORIMATSU, M.; IMAIZUMI, T. Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase, *Circ Res* **2003**, *92*, 226–233.
- [107] LI, J.; WILSON, A.; GAO, X.; KURUBA, R.; LIU, Y.; POLOYAC, S.; PITT, B.; XIE, W.; LI, S. Coordinated regulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 and cationic amino acid transporter-1 by farnesoid X receptor in mouse liver and kidney and its implication in the control of blood levels of asymmetric dimethylarginine, *J Pharmacol Exp Ther* **2009**, *331*, 234–243.
- [108] PALM, F.; ONOZATO, M.; LUO, Z.; WILCOX, C. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2007**, *293*, H3227-45.

- [109] COOKE, J.; GHEBREMARIAM, Y.  
DDAH says NO to ADMA, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2011**, *31*, 1462–1464.
- [110] Intercept Pharmaceuticals - Pipeline OCA (FXR Agonist), zu finden unter  
[http://www.interceptpharma.com/ct\\_pipeline.php](http://www.interceptpharma.com/ct_pipeline.php).
- [111] GHEBREMARIAM, Y. T.; YAMADA, K.; COOKE, J. P.  
Discovery of allosteric activators of DDAH: a potential therapeutic avenue for vascular disorders, *Vascular Medicine* **2011**, *16*, 219–220.
- [112] MACALLISTER, R. J.; PARRY, H.; KIMOTO, M.; OGAWA, T.; RUSSELL, R. J.; HODSON, H.; WHITLEY, G. S.; VALLANCE, P.  
Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase, *Br J Pharmacol* **1996**, *119*, 1533–1540.
- [113] VALLANCE, P.; LEIPER, J.  
Blocking NO synthesis: how, where and why?, *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1*, 939–950.
- [114] KNIPP, M.; BRAUN, O.; VASAK, M.  
Searching for DDAH inhibitors: S-nitroso-L-homocysteine is a chemical lead, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 2372–2373.
- [115] STUHLINGER, M. C.; TSAO, P. S.; HER, J. H.; KIMOTO, M.; BALINT, R. F.; COOKE, J. P.  
Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine, *Circulation* **2001**, *104*, 2569–2575.
- [116] ROSSITER, S.; SMITH, C.; MALAKI, M.; NANDI, M.; GILL, H.; LEIPER, J.; VALLANCE, P.; SELWOOD, D.  
Selective substrate-based inhibitors of mammalian dimethylarginine dimethylaminohydrolase, *J Med Chem* **2005**, *48*, 4670–4678.
- [117] VALLANCE, P.; BUSH, H.; MOK, B.; HURTADO-GUERRERO, R.; GILL, H.; ROSSITER, S.; WILDEN, J.; CADDICK, S.  
Inhibition of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) and arginine deiminase (ADI) by pentafluorophenyl (PFP) sulfonates, *Chem Commun (Camb)* **2005**, 5563–5565.
- [118] HARTZOULAKIS, B.; ROSSITER, S.; GILL, H.; O'HARA, B.; STEINKE, E.; GANE, P.; HURTADO-GUERRERO, R.; LEIPER, J.; VALLANCE, P.; RUST, J.; SELWOOD, D.  
Discovery of inhibitors of the pentain superfamily protein dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH), by virtual screening and hit analysis, *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17*, 3953–3956.
- [119] KOTTHAUS, J.  
Substituierte L-Arginin-Derivate als Modulatoren des Stickstoffmonoxid-generierenden Systems, *Dissertation*, Kiel, **2008**.
- [120] BABU, B. R.; GRIFFITH, O. W.  
 $N^5$ -(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine. A neuronal isoform selective mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase, *J Biol Chem* **1998**, *273*, 8882–8889.

- [121] WANG, Y.; MONZINGO, A.; HU, S.; SCHALLER, T.; ROBERTUS, J.; FAST, W.  
Developing dual and specific inhibitors of dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 and nitric oxide synthase: toward a targeted polypharmacology to control nitric oxide, *Biochemistry* **2009**, *48*, 8624–8635.
- [122] LLUIS, M.; WANG, Y.; MONZINGO, A.; FAST, W.; ROBERTUS, J.  
Characterization of C-alkyl amidines as bioavailable covalent reversible inhibitors of human DDAH-1, *Chem Med Chem* **2011**, *6*, 81–88.
- [123] JOHNSON, C.; LINSKY, T.; YOON, D.-W.; PERSON, M.; FAST, W.  
Discovery of halopyridines as quiescent affinity labels: inactivation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase, *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 1553–1562.
- [124] JOHNSON, C.; MONZINGO, A.; KE, Z.; YOON, D.-W.; LINSKY, T.; GUO, H.; ROBERTUS, J.; FAST, W.  
On the mechanism of dimethylarginine dimethylaminohydrolase inactivation by 4-halopyridines, *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 10951–10959.
- [125] LINSKY, T.; WANG, Y.; FAST, W.  
Screening for dimethylarginine dimethylaminohydrolase inhibitors reveals Ebselen as a bioavailable inactivator, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *2*, 592–596.
- [126] GHEBREMARIAM, Y. T.; ERLANSON, D. A.; YAMADA, K.; COOKE, J. P.  
Development of a dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) assay for high-throughput chemical screening, *J Biomol Screen* **2012**, *17* (5), 651–661.
- [127] KOTTHAUS, J.; SCHADE, D.; CLEMENT, B.  
Designing modulators of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): a focus on selectivity over arginase, *J Enzyme Inhib Med Chem* **2011**, *27* (1), 24–28.
- [128] SCHADE, D.  
Synthese von Stickstoffmonoxid-modulierenden L-Arginin-Derivaten und Prodrugs für Hydroxyguanidine, *Dissertation*, Kiel, **2008**.
- [129] LEIPER, J.; NANDI, M.; TORONDEL, B.; MURRAY-RUST, J.; MALAKI, M.; O'HARA, B.; ROSSITER, S.; ANTHONY, S.; MADHANI, M.; SELWOOD, D.; SMITH, C.; WOJCIAK-STOTHARD, B.; RUDIGER, A.; STIDWILL, R.; McDONALD, N.; VALLANCE, P.  
Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis, *Nat Med* **2007**, *13*, 198–203.
- [130] KOTTHAUS, J.; SCHADE, D.; MUSCHICK, N.; BEITZ, E.; CLEMENT, B.  
Structure-activity relationship of novel and known inhibitors of human dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1: alkenyl-amidines as new leads, *Bioorg Med Chem* **2008**, *16*, 10205–10209.
- [131] WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A.  
Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC recommendations 1998), *Pure Appl Chem* **1998**, *70*, 1129–1143.

- [132] ETTMAYER, P.; AMIDON, G.; CLEMENT, B.; TESTA, B.  
Lessons learned from marketed and investigational prodrugs, *J Med Chem* **2004**, *47*, 2393–2404.
- [133] HÖLTJE, H.-D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS G, *Molecular modeling*. Basic principles and applications, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [134] BÖHM, M.  
Vergleichende Feldanalysen zur Abschätzung der Bindungsaffinität von Serinprotease-Inhibitoren, *Diplomarbeit*, Regensburg, **1998**.
- [135] GOHLKE, H.; KLEBE, G.  
DrugScore meets CoMFA: adaptation of fields for molecular comparison (AFMoC) or how to tailor knowledge-based pair-potentials to a particular protein, *J Med Chem* **2002**, *45*, 4153–4170.
- [136] GOHLKE, H.; HENDLICH, M.; KLEBE, G.  
Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions, *J Mo. Biol* **2000**, *295*, 337–356.
- [137] GERBER, P. R.; MÜLLER, K.  
MAB, a generally applicable molecular force field for structure modelling in medicinal chemistry, *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **1995**, *9*, 251–268.
- [138] GERBER MOLECULAR DESIGN, zu finden unter <http://www.moloc.ch/>.
- [139] AGARWAL, A.; PEARSON, P. P.; TAYLOR, E. W.; LI, H. B.; DAHLGREN, T.; HERSLÖF, M.; YANG, Y.; LAMBERT, G.; NELSON, D. L.; REGAN, J. W.  
Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of 5-HT receptor binding data for tetrahydropyridinylindole derivatives: a comparison of the Hansch and CoMFA methods, *J Med Chem* **1993**, *36*, 4006–4014.
- [140] CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P, *Organic chemistry*, Oxford University Press, New York, **2001**.
- [141] CLEMENT, B.  
Reduction of *N*-hydroxylated compounds: amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as prodrugs of amidines, *Drug Metab Rev* **2002**, *34*, 565–579.
- [142] SCHRÖDINGER, Glide, Schrödinger, LLC, New York, **2011**.
- [143] FRIESNER, R. A.; BANKS, J. L.; MURPHY, R. B.; HALGREN, T. A.; KLICIC, J. J.; MAINZ, D. T.; REPASKY, M. P.; KNOLL, E. H.; SHELLEY, M.; PERRY, J. K.; SHAW, D. E.; FRANCIS, P.; SHENKIN, P. S.  
Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy, *J Med Chem* **2004**, *47*, 1739–1749.
- [144] FRIESNER, R. A.; MURPHY, R. B.; REPASKY, M. P.; FRYE, L. L.; GREENWOOD, J. R.; HALGREN, T. A.; SANSCHAGRIN, P. C.; MAINZ, D. T.  
Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes, *J Med Chem* **2006**, *49*, 6177–6196.

- [145] GRIVAS, J. C.; TAURINS, A.  
Reaction between halogen-substituted nitriles and amines, *Can J Chem* **1961**, *39*, 761–764.
- [146] OXLEY, P.; PARTRIDGE, M. W.; SHORT, W. F.  
Amidines. VII. Preparation of amidines from cyanides, aluminum chloride, and ammonia or amines, *J Chem Soc* **1947**, 1110–1116.
- [147] ROUSSELET, G.; CAPDEVIELLE, P.; MAUMY, M.  
Copper(II)-induced addition of amines to unactivated nitriles: the first general one-step synthesis of alkyl amidines, *Tetrahedron Lett* **1993**, *34*, 6395–6398.
- [148] PINNER, A.  
Imidoäther, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1892**, *23*, 2942–2956.
- [149] PINNER, A.  
Imidoäther und ihre Derivate, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1892**, *23*, 3820–3826.
- [150] REYNAUD, P.; MOREAU, R. C.; GOUSSON, T.  
Properties of salts of thio imino esters: their reactions with various NH<sub>2</sub> groups other than amines, *Compt Rend* **1964**, *259*, 4067–4070.
- [151] SHEARER, B. G.; OPLINGER, J. A.; LEE, S.  
S-2-Naphthylmethyl thioacetimidate hydrobromide: a new odorless reagent for the mild synthesis of substituted acetamidines, *Tetrahedron Lett* **1997**, *38*, 179–182.
- [152] BAATI, R.; GOUVERNEUR, V.; MIOSKOWSKI, C.  
An improved method for the preparation of amidines via thiophenylimidic esters, *Synthesis* **1999**, 927–929.
- [153] CARON, S.; WEI, L.; DOUVILLE, J.; GHOSH, A.  
Preparation and utility of trihaloethyl imidates: useful reagents for the synthesis of amidines, *J Org Chem* **2010**, *75*, 945–947.
- [154] CHARETTE, A. B.; GRENON, M.  
Mild method for the synthesis of amidines by the electrophilic activation of amides, *Tetrahedron Lett* **2000**, *41*, 1677–1680.
- [155] DUNN, P. J. Amidines and *N*-substituted amidines in *Compr Org Funct Group Transform II*, Elsevier Ltd, **2005**, *5*, 655–699.
- [156] BRETSCHER, L.; LI, H.; POULOS, T.; GRIFFITH, O.  
Structural characterization and kinetics of nitric-oxide synthase inhibition by novel *N*<sup>5</sup>-(iminoalkyl)- and *N*<sup>5</sup>-(iminoalkenyl)-ornithines, *J Biol Chem* **2003**, *278*, 46789–46797.
- [157] ZHI, C.; LONG, Z.-Y.; GAMBINO, J.; XU, W.-C.; BROWN, N.; BARNES, M.; BUTLER, M.; LAMARR, W.; WRIGHT, G.  
Synthesis of substituted 6-anilinouracils and their inhibition of DNA polymerase III C and Gram-positive bacterial growth, *J Med Chem* **2003**, *46*, 2731–2739.

- [158] KABOUDIN, B.; ELHAMIFAR, D.; FARJADIAN, F.  
A new, efficient and simple method for the synthesis of thioamides from nitriles, *Org Prep Proced Int* **2006**, *38*, 412–417.
- [159] KABOUDIN, B.; NOROUZI, H.  
A convenient synthesis of phosphorodithioates and novel conversion of epoxides to thiiranes, *Synthesis* **2004**, 2035–2039.
- [160] GOSWAMI, S.; MAITY, A. C.; DAS, N. K.  
Advanced reagent for thionation. Rapid synthesis of primary thioamides from nitriles at room temperature, *J Sulfur Chem* **2007**, *28*, 233–237.
- [161] BOYS, M.; DOWNS, V.  
Preparation of primary thioamides from nitriles using sodium hydrogen sulfide and diethylamine hydrochloride, *Synth Commun* **2006**, *36*, 295–298.
- [162] BECKER, H. G. O., *Organikum*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [163] SCHNÖRWANGEN, E.  
*N*-hydroxylierte Derivate physiologischer Guanidine: Synthesen und ihr Vermögen zur NO-Freisetzung durch NO-Synthasen oder Cytochrom P450, *Dissertation*, Kiel, **1994**.
- [164] PLATZEK, J.  
*In vitro*-Testung neuer potentieller Inhibitoren der humanen Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase, *Diplomarbeit*, Kiel, **2011**.
- [165] MURPHY, M. E.; NOACK, E.  
Nitric oxide assay using hemoglobin method in *Methods in Enzymology* **1994**, *233*, 240–250.
- [166] RUBBO H.; RADI R.; TRUJILLO M.; TELLERI R.; KALYANARAMAN B.; BARNES S.; KIRK M.; FREEMAN B. A.  
Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives, *J Biol Chem* **1994**, *269*, 26066–26075.
- [167] KLEIN, N.  
Neue Modulatoren des NO-generierenden Systems, *Dissertation*, Kiel, **2010**.
- [168] LINTON, B. R.; CARR, A. J.; ORNER, B. P.; HAMILTON, A. D.  
A versatile one-pot synthesis of 1,3-substituted guanidines from carbamoyl isothiocyanates, *J Org Chem* **2000**, *65*, 1566–1568.
- [169] MARTIN, N.; WOODWARD, J.; MARLETTA, M.  
*N*<sup>G</sup>-hydroxyguanidines from primary amines, *Org Lett* **2006**, *8*, 4035–4038.
- [170] KISO, Y.; UKAWA, K.; AKITA, T.  
Efficient removal of *N*-benzyloxycarbonyl group by a 'push-pull' mechanism using thioanisole-trifluoroacetic acid, exemplified by a synthesis of Met-enkephalin, *J Chem Soc, Chem Commun* **1980**, 101–102.

- [171] SCHADE, D.; KOTTHAUS, J.; KLEIN, N.; KOTTHAUS, J.; CLEMENT, B.  
Prodrug design for the potent cardiovascular agent *N*<sup>0</sup>-hydroxy-L-arginine (NOHA):  
Synthetic approaches and physicochemical characterization, *Org Biomol Chem* **2011**, *9*,  
5249–5259.
- [172] KOTTHAUS, J.; WAHL, B.; HAVEMEYER, A.; KOTTHAUS, J.; SCHADE, D.; GARBE-  
SCHONBERG, D.; MENDEL, R.; BITTNER, F.; CLEMENT, B.  
Reduction of *N*<sup>0</sup>-hydroxy-L-arginine by the mitochondrial amidoxime reducing  
component (mARC), *Biochem J* **2010**, *433*, 383–391.
- [173] CLEMENT, B.; DEMESMAEKER, M.; LINNE, S.  
Microsomal catalyzed N-hydroxylation of guanabenz and reduction of the N-  
hydroxylated metabolite: characterization of the two reactions and genotoxic potential  
of guanoxabenz, *Chem Res Toxicol* **1996**, *9*, 682–688.
- [174] CLEMENT, B.; SCHULTZE-MOSGAU, M. H.; WOHLERS, H.  
Cytochrome P450 dependent N-hydroxylation of a guanidine (debrisoquine),  
microsomal catalysed reduction and further oxidation of the N-hydroxy-guanidine  
metabolite to the urea derivative. Similarity with the oxidation of arginine to citrulline  
and nitric oxide, *Biochem Pharmacol* **1993**, *46*, 2249–2267.
- [175] CLEMENT, B.; KUNZE, T.; HEBERLING, S.  
Reduction of *N*<sup>0</sup>-hydroxy-L-arginine to L-arginine by pig liver microsomes,  
mitochondria, and human liver microsomes, *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, *349*,  
869–873.
- [176] FROELICH, A. K.; GIRRESER, U.; CLEMENT, B.  
Metabolism of *N*-hydroxyguanidines (*N*-hydroxydebrisoquine) in human and porcine  
hepatocytes: reduction and formation of glucuronides, *Drug Metab Dispos* **2005**, *33*,  
1532–1537.
- [177] WALKER, J. B.; WALKER, M. S.  
The enzymatic reduction of hydroxyguanidine, *J Biol Chem* **1959**, *234*, 1481–1484.
- [178] FUKUTO, J. M.  
Chemistry of *N*-hydroxy-L-arginine, *Methods Enzymol* **1996**, *268*, 365–375.
- [179] WANG, M. Z.; WU, J. Q.; BRIDGES, A. S.; ZELDIN, D. C.; KORNBLUTH, S.; TIDWELL, R.  
R.; HALL, J. E.; PAINE, M. F.  
Human enteric microsomal CYP4F enzymes O-demethylate the antiparasitic prodrug  
pafuramidine, *Drug Metab Dispos* **2007**, *35*, 2067–2075.
- [180] MELISI, D.; SECONDO, A.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; RIMOLI, M. G.; MINALE, M.;  
CAPRARIIS, P. de; ANNUNZIATO, L.  
Galactosyl derivatives of L-arginine and D-arginine: synthesis, stability, cell  
permeation, and nitric oxide production in pituitary GH3 cells, *J Med Chem* **2006**, *49*,  
4826–4833.
- [181] MAYER, R.; GEYER, S.  
Die Qual der Wahl: Methoden und Reagenzien zur Entschwefelung, *Mitteilungsblatt  
der Chemischen Gesellschaft der DDR* **1990**, *37*, 1002–1007.

- [182] KATRITZKY, A. R.; ROGOVOY, B. V.  
Recent developments in guanylation agents, *ARKIVOC (Gainesville, FL, U. S.)* **2005**, 49–87.
- [183] BLOCK, R. J.; BOLLING, D.  
*A manual of paper chromatography and paper electrophoresis*. Academic Press Inc.: New York, **1955**.
- [184] THOMAS, M.; RIVAULT, F.; TRANOY-OPALINSKI, I.; ROCHE, J.; GESSON, J.-P.; PAPOT, S.  
Synthesis and biological evaluation of the suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)  $\beta$ -glucuronide and  $\beta$ -galactoside for application in selective prodrug chemotherapy, *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17*, 983–986.
- [185] RENAUDET, O.; DUMY, P.  
Expedient synthesis of amino-oxylated carbohydrates for chemo-selective access of glycoconjugates, *Tetrahedron Lett* **2001**, *42*, 7575–7578.
- [186] HALL, H. K, JR  
Correlation of the base strengths of amines, *J Am Chem Soc* **1957**, *79*, 5441–5444.
- [187] HINMAN, R. L.  
Base strengths of some alkylhydrazines, *J Org Chem* **1958**, *23*, 1587–1588.
- [188] TESTA, B.; MAYER, J. M, *Hydrolysis in drug and prodrug metabolism*, Helvetica Chimica Acta, Zürich, **2003**, 495-501.
- [189] ZHU, X.; DU, Z.; XU, F.; SHEN, Q.  
Ytterbium triflate: A highly active catalyst for addition of amines to carbodiimides to *N,N,N'*-trisubstituted guanidines, *J Org Chem* **2009**, *74*, 6347–6349.
- [190] CHAUDHARI, P. S.; DANGATE, P. S.; AKAMANCHI, K. G.  
*o*-Iodoxybenzoic acid mediated oxidative desulfurization of 1,3-disubstituted thioureas to carbodiimides, *Synlett* **2010**, 3065–3067.
- [191] DUSCHEK, A.; KIRSCH, S. F.  
2-Iodoxybenzoesäure - ein einfaches Oxidationsmittel mit einer Vielfalt an Anwendungsmöglichkeiten, *Angew Chem* **2011**, *123*, 1562–1590.
- [192] CLEMENT, B.  
Biotransformation stark basischer funktioneller Gruppen durch Stickstoffoxidation, *Habilitationsschrift*, **1985**.
- [193] CHEMAXON, MarvinSketch, **2012**.
- [194] SCHRÖDINGER, Jaguar, Schrödinger, LLC, New York, **2011**.
- [195] ANGYAL, S. J.; WARBURTON, W. K.  
549. The basic strengths of methylated guanidines, *J Chem Soc* **1951**, 2492.

- [196] BRUICE, P. Y.  
Relative reactivity of amines and oxyanions toward proton abstraction from nitroethane. Electrostatic effects and the reactivity-selectivity principle, *J Am Chem Soc* **1984**, *106*, 5959–5964.
- [197] TAYLOR, P. J.; WAIT, A. R.  
 $\sigma_1$  Values for heterocycles, *J Chem Soc, Perkin Trans 2* **1986**, 1765.
- [198] LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J.  
Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*, 3–26.
- [199] HAVEMEYER, A.; LANG, J.; CLEMENT, B.  
The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: current state of research, *Drug Metab Rev* **2011**, *43*, 524–539.
- [200] HAVEMEYER, A.  
Mitochondriale Benzamidoximreduktion: Identifizierung des Molybdäncofaktorabhängigen Enzymsystems, *Dissertation*, Kiel, **2006**.
- [201] CRIBB, A. E.; SPIELBERG, S. P.; GRIFFIN, G. P.  
 $N^4$ -hydroxylation of sulfamethoxazole by cytochrome P450 of the cytochrome P4502C subfamily and reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine in human and rat hepatic microsomes, *Drug Metab Dispos* **1995**, *23*, 406–414.
- [202] CLEMENT, B.; MAU, S.; DETERS, S.; HAVEMEYER, A.  
Hepatic, extrahepatic, microsomal, and mitochondrial activation of the *N*-hydroxylated prodrugs benzamidoxime, guanoxabenz, and Ro 48-3656 (benzoyl]amino]-1-oxopropyl]-4-piperid inyl]oxy]-acetic acid), *Drug Metab Dispos* **2005**, *33*, 1740–1747.
- [203] WAHL, B.; REICHMANN, D.; NIKS, D.; KROMPHOLZ, N.; HAVEMEYER, A.; CLEMENT, B.; MESSERSCHMIDT, T.; ROTHKEGEL, M.; BIESTER, H.; HILLE, R.; MENDEL, R. R.; BITTNER, F.  
Biochemical and spectroscopic characterization of the human mitochondrial amidoxime reducing components hmARC-1 and hmARC-2 suggests the existence of a new molybdenum enzyme family in eukaryotes, *J Biol Chem* **2010**, *285*, 37847–37859.
- [204] KROMPHOLZ, N.; KRISCHKOWSKI CARMEN; REICHMANN, D.; GARBE-SCHÖNBERG, D.; MENDEL, R. R.; BITTNER, F.; CLEMENT, B.; HAVEMEYER, A.  
The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC) is involved in detoxification of *N*-hydroxylated base analogues, *Publikation in Vorbereitung*.
- [205] SCHADE, D.; TOPKER-LEHMANN, K.; KOTTHAUS, J.; CLEMENT, B.  
Synthetic approaches to  $N^\delta$ -methylated L-arginine,  $N^{\omega}$ -hydroxy-L-arginine, L-citrulline, and  $N^\delta$ -cyano-L-ornithine, *J Org Chem* **2008**, *73*, 1025–1030.
- [206] LUZZI, S.; MARLETTA, M.  
L-arginine analogs as alternate substrates for nitric oxide synthase, *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 3934–3941.

- [207] KOCIENSKI, P. J., *Protecting groups*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.
- [208] ANDRUSZKIEWICZ, R.; ROZKIEWICZ, D.  
An improved preparation of  $N^2$ -*tert*-butoxycarbonyl- and  $N^2$ -benzyloxy-carbonyl-(S)-2,4-diaminobutanoic acids, *Synth Commun* **2004**, *34*, 1049–1056.
- [209] MÖLLER, F.  
Amine durch Spaltung in *Houben-Weyl* **1965**, *11*, 982–983.
- [210] WAGENAAR, F. L.; KERWIN, J. F., JR  
Methodology for the preparation of  $N$ -guanidino-modified arginines and related derivatives, *J Org Chem* **1993**, *58*, 4331–4338.
- [211] FAST, W.; LEVSKY, M. E.; MARLETTA, M. A.; SILVERMAN, R. B.  
 $N^0$ -propargyl-L-arginine and  $N^0$ -hydroxy- $N^0$ -propargyl-L-arginine are inhibitors, but not inactivators, of neuronal and macrophage nitric oxide synthases, *Bioorg Med Chem* **1997**, *5*, 1601–1608.
- [212] TÖPKER, K.  
 $N^{\delta}$ -substituierte Argininderivate: Synthesen und ihre Umsetzungen mit NO-Synthasen und Cytochrom P450, *Dissertation*, Kiel, **1997**.
- [213] ALINEZHAD, H.; TAJBAKSH, M.; ZAMANI, R.  
One-pot reductive amination of aldehydes and ketones using  $N$ -methylpiperidine zinc borohydride (ZBNMPP) as a new reducing agent, *Synlett* **2006**, 431–434.
- [214] ALINEZHAD, H.; TAJBAKSH, M.; ZAMANI, R.  
Efficient and mild procedure for reductive methylation of amines using  $N$ -methylpiperidine zinc borohydride, *Synth Commun* **2006**, *36*, 3609–3615.
- [215] NARASIMHAN, S.; BALAKUMAR, R.  
Synthetic applications of zinc borohydride, *Aldrichimica Acta* **1998**, *31*, 19–26.
- [216] UNDERWOOD, R. P.; CARR, R. V. C.  
Reaction pathways in the catalytic reductive  $N$ -methylation of polyamines, *Chem Ind (Dekker)* **2001**, *82*, 267–278.
- [217] GENSLER, W. J.; JOHNSON, F.; SLOAN, A. D. B.  
Compounds related to podophyllotoxin. XII. Podophyllotoxone, picropodophyllotoxone, and dehydropodophyllotoxin, *J Am Chem Soc* **1960**, *82*, 6074–6081.
- [218] GREHN, L.; RAGNARSSON, U.  
Erschöpfende *tert*-Butoxycarbonylierung von Peptid-Stickstoffatomen, *Angewandte Chemie* **1985**, *97*, 519–520.
- [219] GUNNARSSON, K.; GREHN, L.; RAGNARSSON, U.  
Synthese und Eigenschaften von  $N^{\alpha}$ -Di-*tert*-butoxycarbonyl- und  $N^{\alpha}$ -Benzyloxycarbonyl-*tert*-butoxycarbonylaminosäuren, *Angewandte Chemie* **1988**, *100*, 411–412.

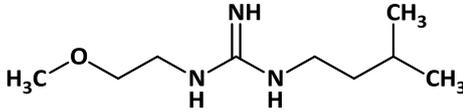
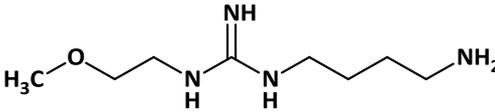
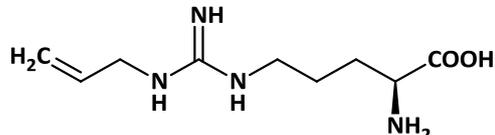
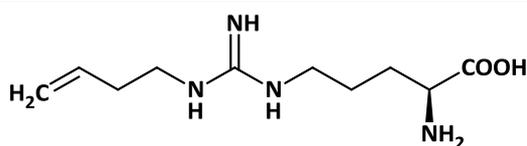
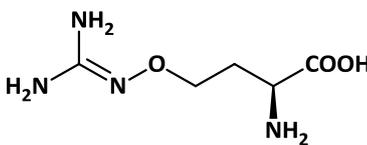
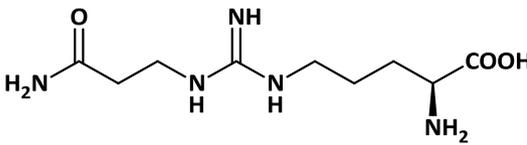
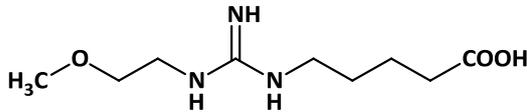
- [220] RAGNARSSON, U.; GREHN, L.  
Novel amine chemistry based on DMAP-catalyzed acylation, *Acc Chem Res* **1998**, *31*, 494–501.
- [221] SASAKI, T.; MINAMOTO, K.; ITOH, H.  
Convenient synthesis of some purine 8,5'-imino cyclonucleosides, *J Org Chem* **1978**, *43*, 2320–2325.
- [222] OSBY, J. O.; MARTIN, M. G.; GANEM, B.  
An exceptionally mild deprotection of phthalimides, *Tetrahedron Lett* **1984**, *25*, 2093–2096.
- [223] MAGNUS, N. A.; AIKINS, J. A.; CRONIN, J. S.; DISEROAD, W. D.; HARGIS, A. D.; LETOURNEAU, M. E.; PARKER, B. E.; REUTZEL-EDENS, S. M.; SCHAFER, J. P.; STASZAK, M. A.; STEPHENSON, G. A.; TAMEZE, S. L.; ZOLLARS, L. M. H.  
Diastereomeric Salt Resolution Based Synthesis of LY503430, an AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid) Potentiator, *Org Process Res Dev* **2005**, *9*, 621–628.
- [224] KOTTHAUS, J.; SCHADE, D.; TOPKER-LEHMANN, K.; BEITZ, E.; CLEMENT, B.  
 $N^{\delta}$ -Methylated L-arginine derivatives and their effects on the nitric oxide generating system, *Bioorg Med Chem* **2008**, *16*, 2305–2312.
- [225] KRAATZ, U.  
Thiokohlensäure-di-N-Derivate in *Houben-Weyl* **1983**, *E 4*, 489.
- [226] KNIPP, M.; VASAK, M.  
A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of enzymatically formed citrulline, *Anal Biochem* **2000**, *286*, 257–264.
- [227] TREUER, E.  
Dissertation in Vorbereitung, Kiel.

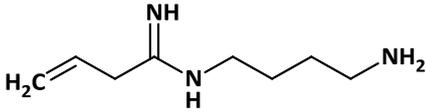
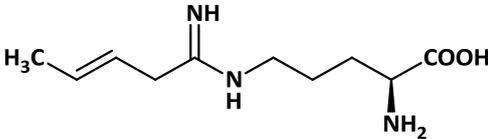
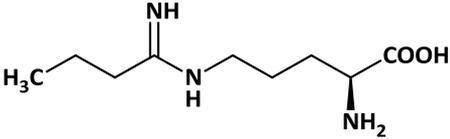
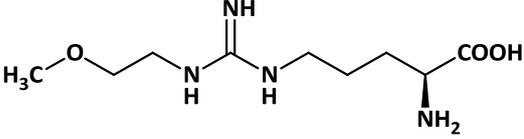
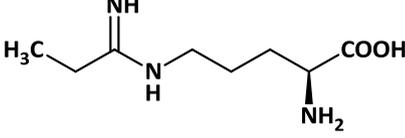
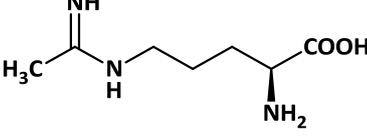
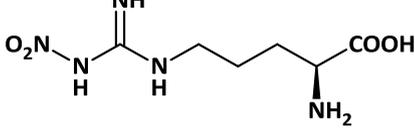
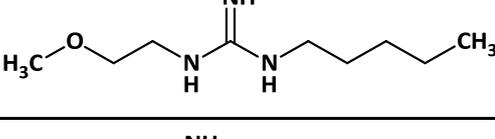
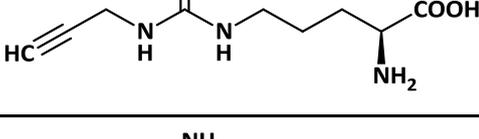
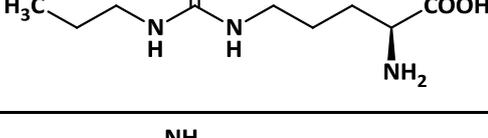
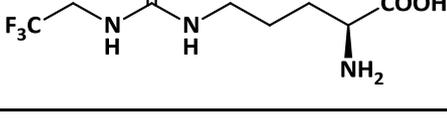
## Anhang

## Strukturformelverzeichnis

## Strukturen zu Kapitel 2:

I. Verbindungen für den Trainingsdatensatz (Kapitel 2.3.3.1):<sup>[119,128,130]</sup>

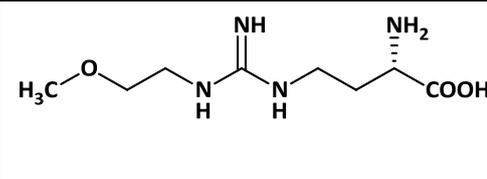
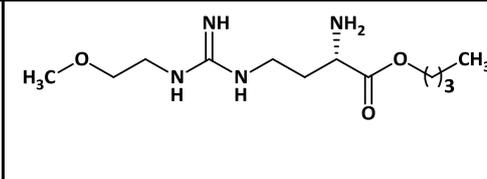
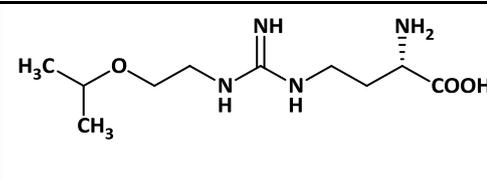
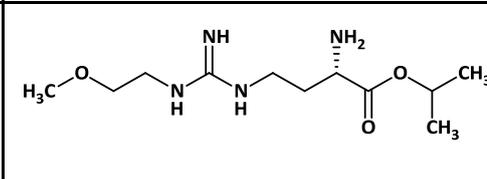
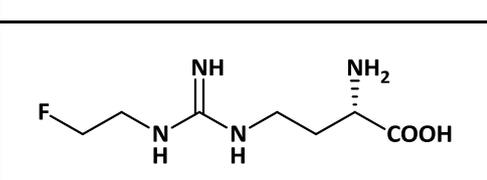
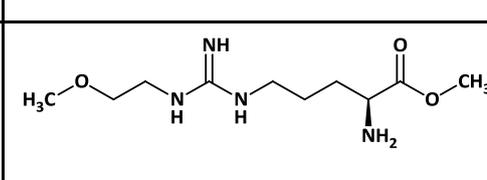
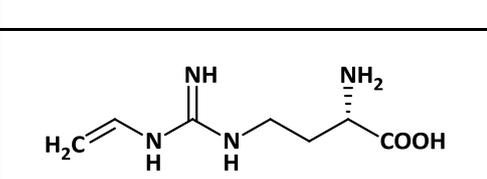
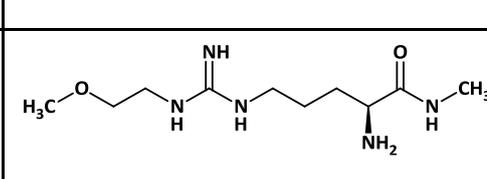
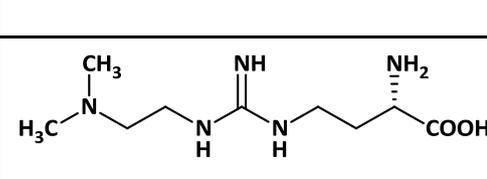
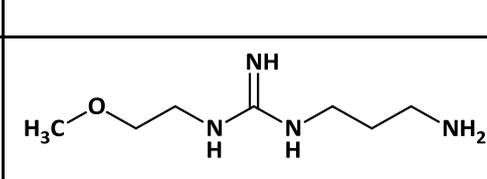
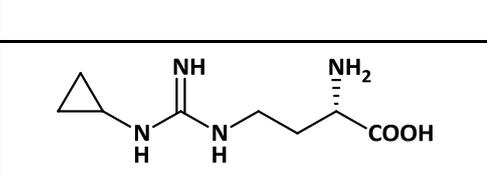
Substanz	IUPAC	Struktur
3-MeBuMEG	<i>N</i> -(2-Methoxyethyl)- <i>N'</i> -(3-methylbutyl)guanidin	
AbMEG	<i>N</i> -(4-Aminobutyl)- <i>N'</i> -(2-methoxyethyl)guanidin	
Allyl-Arg	<i>N</i> <sup>0</sup> -Allyl-L-arginin	
Butenyl-Arg	<i>N</i> <sup>0</sup> -(But-3-enyl)-L-arginin	
Canavanin	( <i>S</i> )-2-Amino-4-(guanidinooxy)-buttersäure	
Carb-Arg	<i>N</i> <sup>0</sup> -(2-Carbamoylethyl)-L-arginin	
CbMEG	<i>N</i> -(4-Carboxybutyl)- <i>N'</i> -(2-methoxyethyl)guanidin	

decVNIO	<i>N</i> -(4-Aminobutyl)but-3-enamidin	
ENIPO	<i>N</i> <sup>δ</sup> -(1-Iminopent-3-enyl)-L-ornithin	
Ethyl-NIO	<i>N</i> <sup>δ</sup> -(1-Iminobutyl)-L-ornithin	
L-257	<i>N</i> <sup>ω</sup> -(2-Methoxyethyl)-L-arginin	
Methyl-NIO	<i>N</i> <sup>δ</sup> -(1-Iminopropyl)-L-ornithin	
NIO	<i>N</i> <sup>δ</sup> -(1-Iminoethyl)-L-ornithin	
Nitro-Arg	<i>N</i> <sup>ω</sup> -Nitro-L-arginin	
PenMEG	<i>N</i> -(2-Methoxyethyl)- <i>N</i> '-(n-pentyl)guanidin	
Propargyl-Arg	<i>N</i> <sup>ω</sup> -Propargyl-L-arginin	
Propyl-Arg	<i>N</i> <sup>ω</sup> -Propyl-L-arginin	
Tfe-Arg	<i>N</i> <sup>ω</sup> -(2,2,2-Trifluorethyl)-L-arginin	

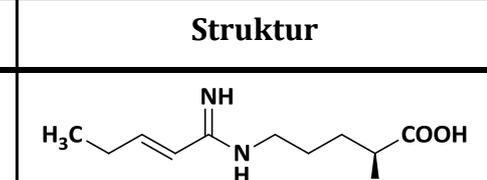
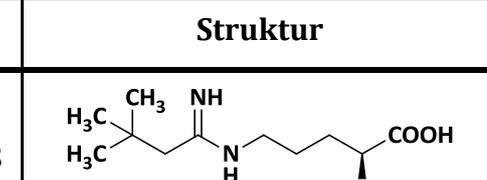
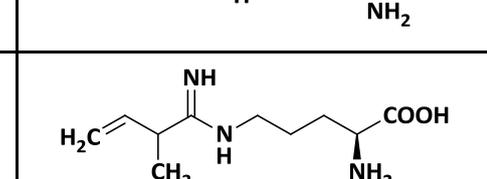
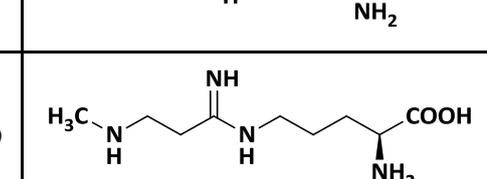
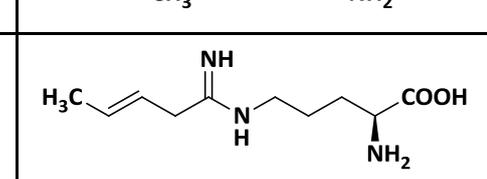
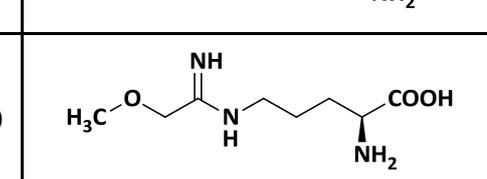
Vinyl-NIO	$N^{\delta}$ -(1-Iminobut-3-enyl)-L-ornithin	
-----------	--	--

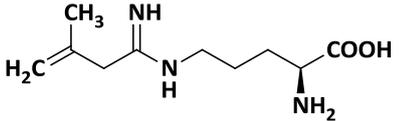
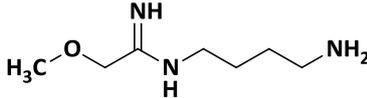
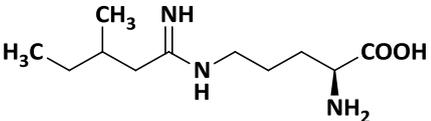
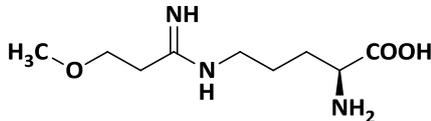
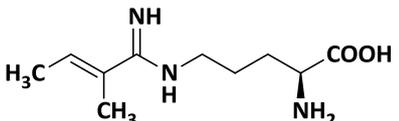
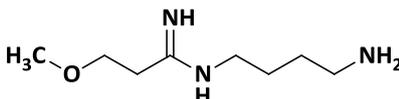
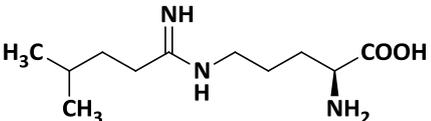
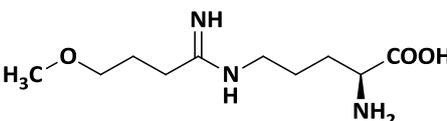
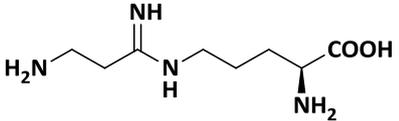
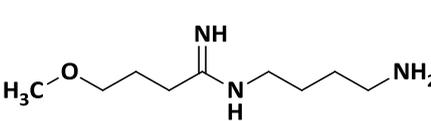
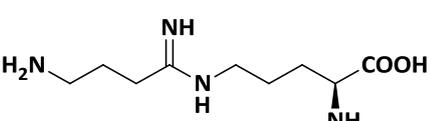
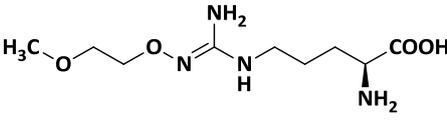
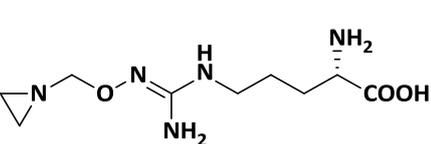
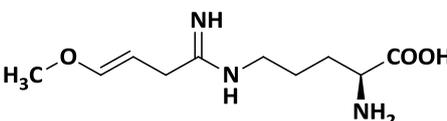
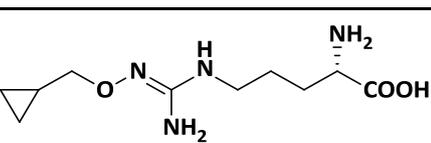
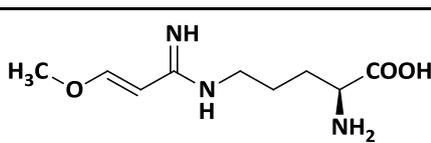
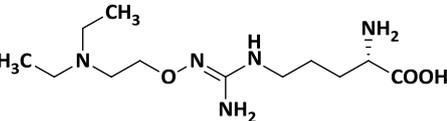
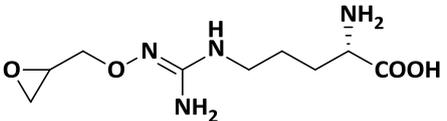
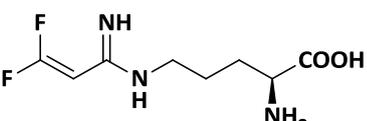
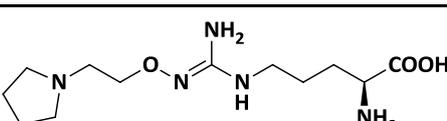
II. Verbindungen für den Trainingsdatensatz (Kapitel 2.3.3.2) – R-Reihe.<sup>[116]</sup>

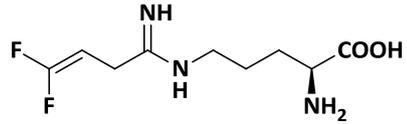
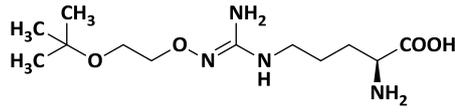
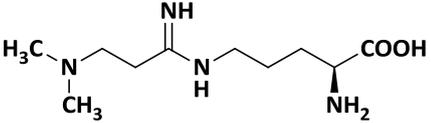
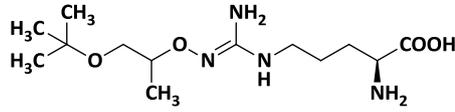
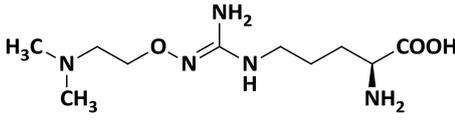
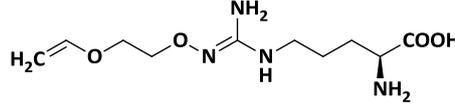
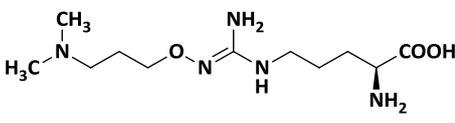
Nr.	Struktur	Nr.	Struktur
R04		R25	
R08		R26	
R09		R27	
R10		R28	
R11		R29	
R12		R30	
R13		R31	
R14		R32	

R15		R33	
R17		R35	
R19		R37	
R22		R38	
R23		R42	
R24			

## III. Verbindungen für den Trainingsdatensatz (Kapitel 2.3.3.2) – TV-Reihe:

Nr.	Struktur	Nr.	Struktur
TV01		TV18	
TV02		TV19	
TV03		TV20	

TV04		TV21	
TV05		TV22	
TV06		TV23	
TV07		TV24	
TV08		TV25	
TV09		TV26	
TV10		TV27	
TV11		TV28	
TV12		TV29	
TV13		TV30	

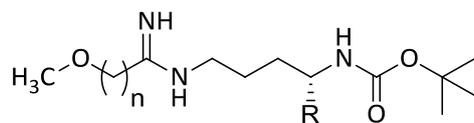
TV14		TV31	
TV15		TV32	
TV16		TV33	
TV17			

## Synthetisierte und charakterisierte Verbindungen:

### Methoxyalkylimidate

Verbindung	Ziffer	Struktur
2-Methoxyethanimidsäuremethylester Hydrochlorid	<b>9a</b>	
3-Methoxypropananimidsäuremethylester Hydrochlorid	<b>9b</b>	
4-Methoxybutanimidsäuremethylester Hydrochlorid	<b>9c</b>	

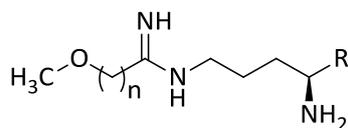
## Methoxyalkylamidine, geschützte Vorstufen



Verbindung	Ziffer	n	R
$N^2$ -( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- $N^5$ -(1-imino-3-methoxypropyl)-L-ornithin- <i>t</i> -butylester	<b>12a</b>	1	
$N^2$ -( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- $N^5$ -(1-imino-3-methoxypropyl)-L-ornithin- <i>t</i> -butylester	<b>12b</b>	2	
$N^2$ -( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- $N^5$ -(1-imino-4-methoxybutyl)-L-ornithin- <i>t</i> -butylester	<b>12c</b>	3	
$N$ -[4-( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)-aminobutyl]methoxymethanamidin	<b>13a</b>	1	
$N$ -[4-( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)-aminobutyl]-2-methoxyethanamidin	<b>13b</b>	2	
$N$ -[4-( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)-aminobutyl]-3-methoxypropanamidin	<b>13c</b>	3	

$N^2$ -( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- $N^4$ -(1-imino-4-methoxybutyl)- <i>nor</i> -L-ornithin- <i>t</i> -butylester	<b>20</b>	
---	-----------	--

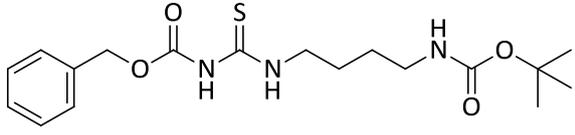
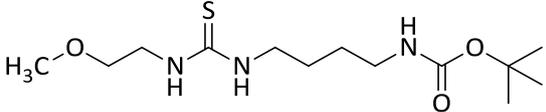
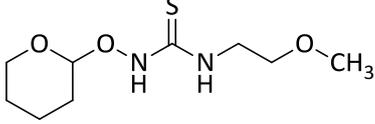
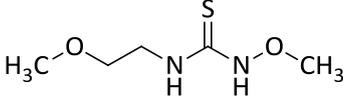
## Methoxyalkylamidine



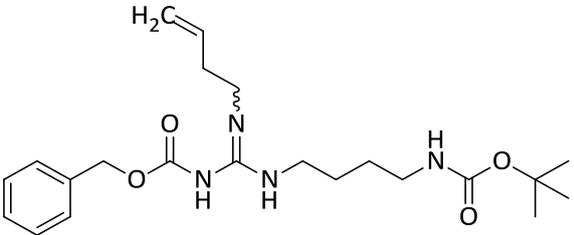
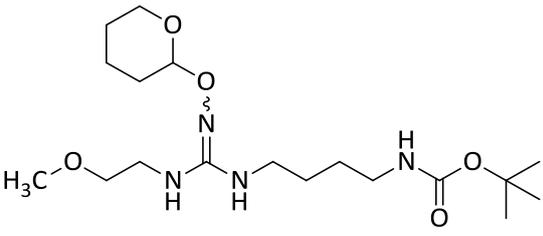
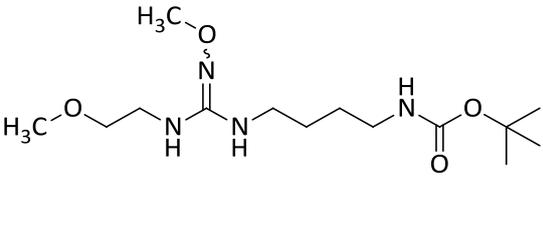
Verbindung	Ziffer	n	R
<i>N</i> <sup>5</sup> -(1-Imino-2-methoxyethyl)-L-ornithin	<b>1a</b>	1	
<i>N</i> <sup>5</sup> -(1-Imino-3-methoxypropyl)-L-ornithin	<b>1b</b>	2	
<i>N</i> <sup>5</sup> -(1-Imino-4-methoxybutyl)-L-ornithin	<b>1c</b>	3	
<i>N</i> -(4-Aminobutyl)methoxymethanamidin	<b>2a</b>	1	
<i>N</i> -(4-Aminobutyl)-2-methoxyethanamidin	<b>2b</b>	2	
<i>N</i> -(4-Aminobutyl)-3-methoxypropanamidin	<b>2c</b>	3	

<i>N</i> <sup>4</sup> -(1-Imino-4-methoxybutyl)- <i>nor</i> -L-ornithin	<b>21</b>	
---	-----------	--

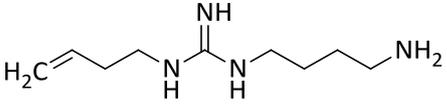
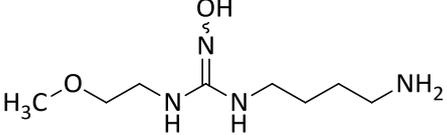
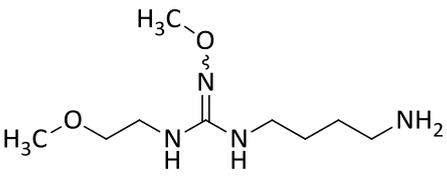
## Thioharnstoffe

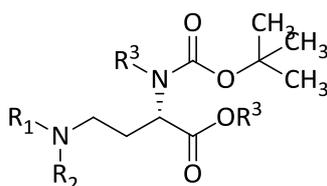
Verbindung	Ziffer
 <p data-bbox="204 656 1161 701"><i>N</i>-Benzyloxycarbonyl-<i>N'</i>-[4-(<i>t</i>-butoxycarbonylamino)-butyl]thioharnstoff</p>	<b>23</b>
 <p data-bbox="204 958 1161 1003"><i>N</i>-[4-(<i>t</i>-Butoxycarbonylamino)-butyl]-<i>N'</i>-(2-methoxyethyl)-thioharnstoff</p>	<b>29</b>
 <p data-bbox="236 1272 1129 1317"><i>N</i>-(2-Methoxyethyl)-<i>N'</i>-(tetrahydro-2<i>H</i>-pyran-2-yloxy)thioharnstoff</p>	<b>36a</b>
 <p data-bbox="383 1563 986 1608"><i>N</i>-Methoxy-<i>N'</i>-(2-methoxyethyl)thioharnstoff</p>	<b>36b</b>

## Aminobutylguanidine, geschützte Vorstufen

Verbindung	Ziffer
 <p data-bbox="207 757 1141 869"><i>N</i>-Benzyloxycarbonyl-<i>N</i>''-(but-3-enyl)-<i>N</i>'-[4-(<i>t</i>-butoxycarbonylamino)-butyl]guanidin</p>	<b>25</b>
 <p data-bbox="255 1243 1093 1355"><i>N</i>-[4-(<i>t</i>-Butoxycarbonylamino)-butyl]-<i>N</i>''-(2-methoxyethyl)-<i>N</i>'''-(tetrahydro-2<i>H</i>-pyran-2-yloxy)-guanidin</p>	<b>31a</b>
 <p data-bbox="199 1668 1157 1780"><i>N</i>-[4-(<i>t</i>-Butoxycarbonylamino)-butyl]-<i>N</i>''-methoxy-<i>N</i>'-(2-methoxyethyl)-guanidin</p>	<b>31b</b>

## Aminobutylguanidine

Verbindung	Ziffer
 <p style="text-align: center;"><i>N</i>-(4-Aminobutyl)-<i>N'</i>-but-3-enylguanidin</p>	<b>26</b>
 <p style="text-align: center;"><i>N</i>-(4-Aminobutyl)-<i>N''</i>-hydroxy-<i>N'</i>-(2-methoxyethyl)guanidin</p>	<b>32a</b>
 <p style="text-align: center;"><i>N</i>-(4-Aminobutyl)-<i>N''</i>-methoxy-<i>N'</i>-(2-methoxyethyl)guanidin</p>	<b>32b</b>

**nor-L-Ornithine**

Verbindung	Ziffer	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
<i>N</i> <sup>α</sup> -( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- <i>N</i> <sup>γ</sup> -phthalimido- <i>nor</i> -L-ornithin	<b>63</b>			-H	-H
<i>N</i> <sup>α</sup> -( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- <i>N</i> <sup>γ</sup> -phthalimido- <i>nor</i> -L-ornithin- <i>t</i> -butylester	<b>64</b>				-H
<i>N</i> <sup>α</sup> , <i>N</i> <sup>α</sup> -Bis-( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- <i>N</i> <sup>γ</sup> -phthalimido- <i>nor</i> -L-ornithin- <i>t</i> -butylester	<b>65</b>				
<i>N</i> <sup>α</sup> , <i>N</i> <sup>α</sup> -Bis-( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- <i>nor</i> -L-ornithin- <i>t</i> -butylester	<b>66</b>	-H	-H		
<i>N</i> <sup>α</sup> , <i>N</i> <sup>α</sup> -Bis-( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- <i>N</i> <sup>γ</sup> , <i>N</i> <sup>γ</sup> -dimethyl- <i>nor</i> -L-ornithin- <i>t</i> -butylester	<b>67</b>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>		
<i>N</i> <sup>α</sup> , <i>N</i> <sup>α</sup> -Bis-( <i>t</i> -Butoxycarbonyl)- <i>N</i> <sup>γ</sup> -cyan- <i>N</i> <sup>γ</sup> -methyl- <i>nor</i> -L-ornithin- <i>t</i> -butylester	<b>68</b>	-CN	-CH <sub>3</sub>		

## Zyklisierte Nebenprodukte

Verbindung	Ziffer	Struktur
(S)- $N^3$ - <i>t</i> -Butoxycarbonylhexahydropyrimidin-4-carbonsäure- <i>t</i> -butylester	57	
(S)- $N^3$ - <i>t</i> -Butoxycarbonyl- $N^1$ -methylhexahydropyrimidin-4-carbonsäure- <i>t</i> -butylester	58	

*nor*-L-Arginine

Verbindung	Ziffer	Struktur
$N^{\alpha}N^{\alpha}$ -Bis-( <i>t</i> -butoxycarbonyl)- $N^{\omega}$ -hydroxy- $N^{\gamma}$ -methyl- <i>nor</i> -L-arginin- <i>t</i> -butylester	69	
$N^{\omega}$ -Hydroxy- $N^{\gamma}$ -methyl- <i>nor</i> -L-arginin ( <i>Nor</i> -NHAM)	54	

## Erklärung zu §10 Abs. 2 Nr. 2 der Promotionsordnung

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbstständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Kotthaus, J., Lunk, I., Gohlke, H., Clement, B.

**Alkenyl-amidines and -guanidines as inhibitors of human DDAH-1 and their selectivity over arginase**

Poster, PharmSciFair 2009, Nizza, Frankreich

Kotthaus, J., Lunk, I., Clement, B.

**Substituted L-arginine analogs as selective inhibitors of human DDAH-1**

Poster, 9th International ISSX Meeting 2010, Istanbul, Türkei

Lunk, I., Kotthaus, J., Clement, B.

**Synthesis of amidines as potent DDAH-1 inhibitors and their selectivity over Arginase and NOS**

Poster, DPhG Jahrestagung 2010, Braunschweig, Deutschland

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden.

Kiel im Juni 2012

Ina Lunk

## Danksagung

An vorderster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Bernd Clement für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung sowie die stete Diskussionsbereitschaft und Förderung bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Holger Gohlke und Herrn Prof. Dr. Christian Peifer bedanke ich mich sehr für die Zusammenarbeit bei den *Molecular Modelling*-Arbeiten sowie Herrn Prof. Dr. Dieter Heber für seine Hilfsbereitschaft bei Fragenstellungen rund um die Themen Nomenklatur und Synthese.

Herrn Dr. Ulrich Girreser danke ich insbesondere für seine allzeit gegebene Hilfestellung zur Lösung von NMR-Problematiken, seiner Diskussionsbereitschaft bei analytischen und synthetischen Problemen und seiner immer wieder sehr erheiternden Kommentare.

Bei Dennis möchte ich mich sehr herzlich für die über kontinentale Grenzen hinausgehende Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung bei synthetischen Problemen bedanken. Merci!

Sven möchte ich für die Einarbeitung bei der HPLC-Analytik sowie seiner steten Hilfsbereitschaft und Unterstützung danken. Für die Unterstützung bei den synthetischen Arbeiten danke ich Lena S., Melissa sowie meinen Hiwis Thomas, Felix und Alex und der Bachelorstudentin Joana. Karin und Eva danke ich für die Bereitstellung von Enzymen und für die Testung synthetisierter Verbindungen danke ich Jürke und Julia.

Bedanken möchte ich mich auch sehr bei Antje, Finn, Julia, Katrin, Karin, Chris, und Lukas die verschiedene Abschnitte meiner Arbeit sorgfältig und zügig korrekturgelesen haben. Besonderer Dank gilt Dennis, der alle Abschnitte besonders kritisch und genau geprüft hat.

Bei Danilo, Annika, Jie, Judith und Björn möchte ich mich für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Betreuung des 5. Semesters bedanken.

Für viele heitere und lustige Stunden nach Feierabend bedanke ich mich bei Birte, Björn, Carmen, Chris, Julia, Laura, Lena K. und Swetlana. Ich will zurück nach Sehendorf!

Julia, Martin und Judith möchte ich für eine nette Büronachbarschaft mit stets freundlicher, lustiger und angenehmer Atmosphäre danken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen nicht namentlich erwähnten Kollegen und Ex-Kollegen für das tolle Arbeitsklima und die freundliche Zusammenarbeit, durch die mir meine Zeit am Institut sehr schön in Erinnerung bleiben wird.

Finn danke ich ganz besonders für die mentale Unterstützung und vielseitige Hilfe außerhalb der Institutsmauern, besonders während der Anfertigung dieser Arbeit. Ohne ihn hätte ich meine volle Konzentration nicht auf diese Arbeit lenken können.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich immer in allem unterstützt, keine meiner Entscheidungen in Frage gestellt und mir dadurch diesen Weg ermöglicht haben. Vielen, vielen Dank dafür!

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

Name	Ina Lunk
Geburtsdatum	01. April 1981
Geburtsort	Rotenburg Wümme
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Schulbildung

---

1987 bis 1991	Grundschule Fintel
1991 bis 2000	Gymnasium Eichenschule, Scheeßel
Juni 2000	allgemeine Hochschulreife

## Ausbildung

---

Aug. 2000 bis Jan. 2003	Ausbildung zur Chemielaborantin bei der Asche AG/ AWAG AG, Hamburg
-------------------------	--

## Berufstätigkeit

---

Jan. 2003 bis Mär. 2003	AWAG AG, Hamburg
-------------------------	------------------

## Studium

---

Apr. 2003 bis Mai 2007	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Jun. 2007 bis Dez. 2007	Pharmaziepraktikum bei der Shanghai Roche Pharmaceuticals Limited, Shanghai (China)
Jan. 2008 bis Jun. 2008	Pharmaziepraktikum in der Meyerhofapotheke, Scheeßel
Jul. 2008	Erteilung der Approbation als Apothekerin

## Promotion und Weiterbildung

---

seit September 2008	wissenschaftliche Mitarbeiterin am pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung einer Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. B. Clement
November 2011	Apothekerin für pharmazeutische Analytik

## Kurzfassung

Aufgrund der vielen physiologischen Funktionen, die Stickstoffmonoxid (NO) im menschlichen Körper erfüllt, ist es nicht verwunderlich, dass eine Dysregulation mit verschiedenen Erkrankungen in Zusammenhang steht. Bereitgestellt wird NO aus L-Arginin durch die NO-Synthasen (NOSs), aber die NO-Bioverfügbarkeit wird u. a. auch indirekt durch andere Enzyme beeinflusst. Für zwei dieser Enzyme, die Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) und die Arginase, wurden im Rahmen dieser Arbeit Hemmstoffe entwickelt.

Die DDAH baut die physiologischen Hemmstoffe ( $N^{\omega}$ -methylierte Arginine) der NOSs ab. Ihre Inhibition kann pathologisch erhöhte NO-Spiegel, wie sie bei entzündlichen und neurodegenerativen Erkrankungen vorkommen, senken. Auf Basis bekannter Röntgenkristallstrukturen der hDDAH-1 wurde ein 3D-QSAR-Modell zur Entwicklung und Vorhersage der biologischen Aktivität neuer DDAH-Inhibitoren erstellt. In dem Zusammenhang wurde u. a. eine Reihe von Methoxyalkyl-Amidinen synthetisiert. Dabei konnte  $N^5$ -(1-Imino-3-methoxypropyl)-L-ornithin als sehr potenter DDAH-Inhibitor identifiziert werden. Durch die neuen Verbindungen wurden wichtige Erkenntnisse zur Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen gewonnen: Ein Carboxylgruppen-Verlust führt bei Amidinen im Gegensatz zu Guanidinen zu einer starken Minderung der Hemmpotenz. Selektivitätsuntersuchungen der neuen Inhibitoren ergaben, dass der bekannte Inhibitor *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin der beste Kandidat hinsichtlich Hemmpotenz, Selektivität und Arzneistoffqualität ist, weshalb Prodrug-Konzepte darauf angewendet wurden. Das korrespondierende Hydroxyguanidin und das *O*-Methyl-Hydroxyguanidin wurden synthetisiert. Beide verfügen über eine sehr gute hydrolytische Stabilität. Die Bioaktivierung konnte für das Hydroxyguanidin-Prodrug bereits nachgewiesen werden.

Die Arginase konkurriert mit den NOSs um das gemeinsame Substrat L-Arginin. Eine Enzymhemmung steigert die Substratverfügbarkeit für die NOSs, was in einer Erhöhung der NO-Verfügbarkeit resultiert. Ein neuer Inhibitor,  $N^{\omega}$ -Hydroxy-*N'*-methyl-*nor*-L-arginin (*nor*-NHAM), konnte über neun Stufen aus  $N^{\alpha},N^{\alpha}$ -Di-Boc-geschütztem *nor*-L-Ornithin gewonnen werden. Die Einführung einer Methylgruppe am  $N^{\delta}$ -Atom bei NOHA führte in vorangegangenen Arbeiten zu einer Steigerung der Hemmpotenz, weshalb in analoger Weise mit *nor*-NOHA verfahren wurde. Die Hemmdaten belegen, dass mit *nor*-NHAM ein sehr potenter Hemmstoff gefunden wurde, der in seiner Hemmpotenz *nor*-NOHA jedoch leicht unterlegen ist. Bezüglich Metabolisierung und Selektivität gegenüber DDAH und NOSs sollte *nor*-NHAM gegenüber *nor*-NOHA verbessert sein, was aber noch gezeigt werden muss.

## Abstract

Nitric oxide (NO) fulfils a plethora of physiological functions in the human body. Therefore, its dysregulation is related to different diseases. NO is released from L-arginine via nitric oxide synthases (NOSs), but its bioavailability is also indirectly influenced by different enzymes. In this work new inhibitors for two of these enzymes, dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) and arginase, were developed.

Endogenous inhibitors of NOSs ( $N^{\omega}$ -methylated arginines) are degraded physiologically by DDAH. Increased NO-levels, as they occur in inflammatory and neurodegenerative diseases can be lowered through inhibition of DDAH. Based on the crystallographic structure of hDDAH-1, a 3D-QSAR model was built and used to predict biological affinities of new DDAH inhibitors. In this context, a series of methoxyalkyl-substituted amidines was synthesized and  $N^5$ -(1-Imino-3-methoxypropyl)-L-ornithine was identified as a very potent inhibitor of DDAH. With these new compounds important structure-activity relationships could be deduced. Omitting the carboxylic group results in strong reduced potency for amidines, but not observed for guanidines. *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidine exhibits the best lead profile among all developed DDAH inhibitors based on potency, selectivity and drug-like properties and was therefore selected for the application of prodrug concepts. The corresponding *N*-hydroxyguanidine and *O*-methoxyguanidine were synthesized. Both compounds were stable towards hydrolysis. Bioactivation of the *N*-hydroxyguanidine-prodrug could already be demonstrated.

Arginase competes with NOSs for their common substrate L-arginine. An inhibition increases the substrate availability for NOSs which results in improved NO availability. A new inhibitor,  $N^{\omega}$ -Hydroxy- $N^{\gamma}$ -methyl-*nor*-L-arginine (*nor*-NHAM), was prepared in a nine step synthetic sequence from  $N^{\alpha},N^{\alpha}$ -Di-boc-protected *nor*-L-ornithine. Since the introduction of a methyl group to NOHAs  $N^{\delta}$ -atom in previous work led to an increase in inhibition potency and selectivity, a similar approach was realized for the more potent compound *nor*-NOHA. *In vitro* data confirmed a good inhibitory effect for *nor*-NHAM, which is, however, slightly less potent compared to *nor*-NOHA. It is anticipated that *nor*-NHAM is superior to *nor*-NOHA regarding metabolic stability and selectivity over DDAH and NOSs, but this has to be validated in future studies.