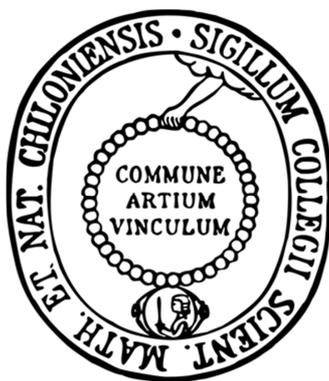


Synthese und Charakterisierung L-Arginin- abgeleiteter Modulatoren des Stickstoffmonoxid-generierenden Systems



Dissertation

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

vorgelegt von

Felix-Alexander Litty

Kiel 2016

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Bernd Clement

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Kunze

Tag der mündlichen Prüfung:

29. Februar 2016

Zum Druck genehmigt:

29. Februar 2016

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl
(Dekan)

Für Sonja

Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Bernd Clement an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Pharmazeutisches Institut, Abteilung Pharmazeutische & Medizinische Chemie, im Zeitraum von September 2012 bis Januar 2016 angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits an folgenden Stellen veröffentlicht:

Fachzeitschriften:

1. LITTY, F.-A.; GIRRESER, U.; CLEMENT, B.; SCHADE, D.
“An efficient synthesis of optically pure N^{δ} -monomethylated L-arginine and L-ornithine.”
Synthesis, **2016**, 48, 723-729.

Posterbeiträge:

1. LITTY, F.-A.; ALTMANN, K.; LUNK, I.; KOTTHAUS, J.; VETTER, I.; CLEMENT, B.; SCHADE, D.
“Discovery of a novel highly selective inhibitor (AbMEG) of hDDAH-1: rational design, characterization and cocrystallization studies.”
DPhG Jahrestagung, **2013**, Freiburg, Deutschland.
2. LITTY, F.-A.; GUDD, J.; GIRRESER, U.; CLEMENT, B.; SCHADE, D.
“Development of novel prodrugs for the nitric oxide (NO) precursor N^{ω} -hydroxy-L-arginine (NOHA): a carbohydrate-based approach.”
DPhG Jahrestagung, **2015**, Düsseldorf, Deutschland.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| INHALTSVERZEICHNIS | I |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | VI |
| TABELLENVERZEICHNIS | IX |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | X |
| STRUKTURFORMELVERZEICHNIS | XV |
| 1 EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1 Stickstoffmonoxid (NO)..... | 1 |
| 1.1.1 Geschichte, Eigenschaften und Vorkommen..... | 1 |
| 1.1.2 Physiologie..... | 2 |
| 1.1.3 Pathophysiologie | 3 |
| 1.2 Regulation des NO-Stoffwechsels..... | 4 |
| 1.2.1 Allgemeine Übersicht | 4 |
| 1.2.2 NO-Synthasen (NOSs) | 6 |
| 1.2.3 Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) | 7 |
| 1.2.4 Arginase | 8 |
| 1.2.5 L-Arginin und <i>N</i> ^ω -Hydroxy-L-arginin (NOHA)..... | 9 |
| 1.2.6 Methylierte Arginine | 10 |
| 1.3 Therapeutische Modulation des NO-Stoffwechsels..... | 12 |
| 1.3.1 Pharmakologische Optionen zur Steigerung der NO-Verfügbarkeit | 12 |
| 1.3.1.1 NO-Donoren | 13 |
| 1.3.1.2 L-Arginin und alternative NOS-Substrate..... | 14 |
| 1.3.1.3 Hemmung der Arginase..... | 14 |
| 1.3.1.4 Weitere Strategien | 15 |
| 1.3.2 Pharmakologische Optionen zur Senkung der NO-Verfügbarkeit..... | 16 |
| 1.3.2.1 Hemmung der NO-Synthasen..... | 16 |
| 1.3.2.2 Hemmung der DDAH-1 | 17 |
| 1.3.3 Prodrugs | 18 |
| 1.3.3.1 Definition..... | 18 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1.3.3.2 | Prodrugstrategien für N^{ω} -Hydroxy-L-arginin | 18 |
| 1.3.4 | Stand der Technik | 20 |
| 2 | ZIELSETZUNG | 22 |
| 2.1 | Synthese von enantiomerenreinem N^{δ}-Methyl-L-arginin und N^{δ}-Methyl-L-ornithin | 22 |
| 2.2 | Entwicklung acetalischer Prodrugs des N^{ω}-Hydroxy-L-arginins | 23 |
| 2.3 | Herstellung, Reinigung und Kristallisation der humanen DDAH-1 | 24 |
| 3 | SYNTHESEN | 26 |
| 3.1 | Synthese von enantiomerenreinem N^{δ}-Methyl-L-arginin und N^{δ}-Methyl-L-ornithin | 26 |
| 3.1.1 | Einleitung | 26 |
| 3.1.2 | Synthesestrategien | 26 |
| 3.1.3 | Optimierung des Schutzgruppenkonzepts | 28 |
| 3.1.4 | Synthese von N^{δ} -Methyl-L-ornithin | 30 |
| 3.1.5 | Synthese von N^{δ} -Methyl-L-arginin | 32 |
| 3.1.6 | Zusammenfassung und Ausblick | 34 |
| 3.2 | Synthese acetalischer Prodrugs des N^{ω}-Hydroxy-L-arginins | 35 |
| 3.2.1 | Einleitung | 35 |
| 3.2.2 | Synthesestrategien | 37 |
| 3.2.3 | Entwicklung eines orthogonalen Schutzgruppenkonzepts anhand von Modellverbindungen | 38 |
| 3.2.4 | Synthese der β -D-Galactosyl-NOHA-Prodrugs | 44 |
| 3.2.5 | Synthese der β -D-Glucosyl-NOHA-Prodrugs | 49 |
| 3.2.6 | Darstellung eines offen-acetalischen NOHA-Prodrugs | 51 |
| 3.2.7 | Versuche zur Darstellung <i>O</i> -acylierter Prodrugs | 53 |
| 3.2.8 | Zusammenfassung und Ausblick | 55 |
| 3.3 | Synthese von <i>N</i>-(4-Aminobutyl)-<i>N'</i>-(2-methoxyethyl)guanidin Dihydrochlorid (AbMEG) | 56 |
| 3.3.1 | Einleitung | 56 |
| 3.3.2 | Synthesestrategie (Umsalzen) | 56 |
| 3.4 | Zusammenfassung | 57 |
| 4 | SPEKTROSKOPIE | 60 |
| 4.1 | Quantifizierung von Chlorid mittels ^{35}Cl-NMR-Spektroskopie | 60 |
| 4.2 | Spektroskopische Aspekte verschiedener Zuckerkonjugate | 61 |
| 4.3 | Spektroskopische Untersuchungen zur <i>E/Z</i>-Isomerie an ausgewählten NOHA-Prodrugs und ihren Vorstufen | 62 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 4.4 | Zusammenfassung..... | 66 |
| 5 | BESTIMMUNG DER ENANTIOMERENREINHEIT AUSGEWÄHLTER AMINOSÄUREDERIVATE | 68 |
| 5.1 | Einleitung..... | 68 |
| 5.2 | Ergebnisse und Diskussion | 69 |
| 5.2.1 | Methodenentwicklung | 69 |
| 5.2.2 | Ligandenaustauschchromatografie mittels HPLC..... | 69 |
| 5.2.3 | Polarimetrie..... | 72 |
| 5.3 | Zusammenfassung..... | 73 |
| 6 | UNTERSUCHUNGEN ZUR (Co)KRISTALLISATION DER HUMANEN DDAH-1 | 74 |
| 6.1 | Einleitung..... | 74 |
| 6.2 | Herstellung rekombinanter hDDAH-1 in <i>Escherichia coli</i> | 76 |
| 6.3 | Chromatografische Reinigung rekombinanter hDDAH-1..... | 77 |
| 6.3.1 | Affinitätschromatografie | 77 |
| 6.3.2 | Ionenaustauschchromatografie..... | 79 |
| 6.4 | Kolorimetrische Aktivitätsassays..... | 84 |
| 6.5 | Kristallisations- und Cokristallisationsuntersuchungen..... | 85 |
| 6.5.1 | Kristallisation der hDDAH-1..... | 86 |
| 6.5.2 | Cokristallisation der hDDAH-1 mit AbMEG..... | 87 |
| 6.6 | Klonierung einer hDDAH-1 Mutante..... | 89 |
| 6.7 | Zusammenfassung und Ausblick..... | 92 |
| 7 | ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK..... | 94 |
| 8 | EXPERIMENTELLER TEIL..... | 98 |
| 8.1 | Synthesen | 98 |
| 8.1.1 | Geräte und Materialien | 98 |
| 8.1.2 | Synthesevorschriften..... | 101 |
| 8.1.2.1 | Synthese der N^{δ} -methylierten L-Argininderivate..... | 101 |
| 8.1.2.1.1 | N^{δ} -Methyl-L-arginin | 101 |
| 8.1.2.1.2 | N^{δ} -Methyl-L-ornithin | 110 |
| 8.1.2.2 | Synthese von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin Prodrugs und analogen Modellverbindungen..... | 111 |
| 8.1.2.2.1 | Isothiocyanate..... | 111 |
| 8.1.2.2.2 | Hydroxylamine | 112 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 8.1.2.2.3 | Benzylthioharnstoffe..... | 117 |
| 8.1.2.2.4 | N^α -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-thiocitrullin- <i>tert</i> -butylester..... | 119 |
| 8.1.2.2.5 | N^α -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)- N^ω -allyloxycarbonyl-L-thiocitrullin-ethylester..... | 122 |
| 8.1.2.2.6 | Vorstufen der N^ω -(β -D-Galactosyloxy)-L-arginin Prodrugs und analoge Modellverbindungen..... | 124 |
| 8.1.2.2.7 | Vorstufen der N^ω -(β -D-Glucosyloxy)-L-arginin Prodrugs..... | 135 |
| 8.1.2.2.8 | Vorstufen der N^ω -(Isopropoxycarbonyloxymethoxy)-L-arginin Prodrugs und analoge Modellverbindung..... | 140 |
| 8.1.2.2.9 | N^ω -(β -D-Galactosyloxy)-L-arginin Prodrugs und analoge Modellverbindungen..... | 145 |
| 8.1.2.2.10 | N^ω -(β -D-Glucosyloxy)-L-arginin Prodrugs..... | 151 |
| 8.1.2.2.11 | N^ω -(Isopropoxycarbonyloxymethoxy)-L-arginin Prodrug und analoge Modellverbindung..... | 155 |
| 8.1.2.3 | Synthese von <i>N</i> -(4-Aminobutyl)- <i>N'</i> -(2-methoxyethyl)guanidin Dihydrochlorid (AbMEG)..... | 157 |
| 8.2 | Bestimmung der Enantiomerenreinheit..... | 158 |
| 8.2.1 | HPLC mit chiraler mobiler Phase..... | 158 |
| 8.2.1.1 | Geräte und Materialien..... | 158 |
| 8.2.1.2 | Methoden..... | 158 |
| 8.2.2 | Polarimetrie..... | 159 |
| 8.3 | Rekombinante Herstellung, Reinigung und (Co)Kristallisation der hDDAH-1..... | 159 |
| 8.3.1 | Geräte und Materialien..... | 159 |
| 8.3.1.1 | Geräte..... | 159 |
| 8.3.1.2 | Materialien..... | 160 |
| 8.3.1.2.1 | Enzyme, Kits und Chemikalien..... | 160 |
| 8.3.1.2.2 | Oligonukleotide..... | 162 |
| 8.3.1.2.3 | Plasmide..... | 163 |
| 8.3.1.2.4 | <i>Escherichia coli</i> -Stämme..... | 164 |
| 8.3.1.2.5 | Antikörper..... | 164 |
| 8.3.1.2.6 | Puffer und Lösungen..... | 165 |
| 8.3.2 | Methoden..... | 168 |
| 8.3.2.1 | Plasmid-DNA Isolierung (Miniprep)..... | 168 |
| 8.3.2.2 | DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen..... | 168 |
| 8.3.2.3 | Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 168 |
| 8.3.2.4 | Agarosegelelektrophorese..... | 169 |
| 8.3.2.5 | DNA-Sequenzierung..... | 170 |
| 8.3.2.6 | Transformation in <i>E. coli</i> | 170 |
| 8.3.2.7 | Enzymexpression..... | 171 |

| | | |
|---------------------|---|------------|
| 8.3.2.7.1 | Schüttelkulturen..... | 171 |
| 8.3.2.7.2 | Fermenter | 171 |
| 8.3.2.8 | Zell-Lyse | 171 |
| 8.3.2.9 | Reinigung der hDDAH-1..... | 172 |
| 8.3.2.9.1 | Ni ²⁺ -NTA Affinitätschromatografie..... | 172 |
| 8.3.2.9.2 | Manuelle Ionenaustauschchromatografie | 172 |
| 8.3.2.9.3 | FPLC-basierte Ionenaustauschchromatografie (IEC)..... | 173 |
| 8.3.2.10 | Umpuffern | 173 |
| 8.3.2.11 | Bestimmung des Proteingehalts..... | 173 |
| 8.3.2.12 | SDS-PAGE | 174 |
| 8.3.2.13 | Western-Blot | 175 |
| 8.3.2.14 | Kolorimetrischer <i>in vitro</i> Aktivitätsassay | 175 |
| 9 | LITERATURVERZEICHNIS | 177 |
| ANHANG | | i |
| | Erklärung zu § 8 Abs. 1 der Promotionsordnung..... | i |
| | Danksagung..... | ii |
| | Lebenslauf..... | iv |
| | Kurzfassung..... | v |
| | Abstract | vi |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der NO-Wirkung im Gefäßsystem..... | 2 |
| Abbildung 1-2: Übersicht über die Regulation des Stickstoffmonoxid-Stoffwechsels..... | 5 |
| Abbildung 1-3: Umsetzung von L-Arginin über das Intermediat <i>N</i> -Hydroxy-L-arginin (NOHA) zu L-Citrullin und Stickstoffmonoxid..... | 6 |
| Abbildung 1-4: DDAH-1-katalysierte Umsetzung von ADMA zu Dimethylamin und L-Citrullin..... | 8 |
| Abbildung 1-5: Abbau von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff durch die Arginase..... | 8 |
| Abbildung 1-6: Metabolismus des <i>N</i> ^ω -Hydroxy-L-arginins..... | 10 |
| Abbildung 1-7: Übersicht verschiedenen methylierter Arginine..... | 11 |
| Abbildung 1-8: NO-freisetzende Arzneistoffe verschiedener Stoffklassen..... | 13 |
| Abbildung 1-9: Strukturformeln der potentesten Arginase-Inhibitoren..... | 15 |
| Abbildung 1-10: Strukturen des von der Firma Bayer entwickelten sGC-Stimulators Riociguat (Adempas®) und des sGC-Aktivators Cinaciguat..... | 16 |
| Abbildung 1-11: Strukturformeln der vier potentesten DDAH-Inhibitoren..... | 17 |
| Abbildung 1-12: Übersicht über verschiedene Derivatisierungsoptionen für NOHA nach SCHADE..... | 19 |
| Abbildung 1-13: Strukturen literaturbekannter NO-freisetzender Monosaccharid-Prodrugs..... | 21 |
| Abbildung 2-1: Zielsetzung zur Darstellung von enantiomerenreinem <i>N</i> ^δ -Methyl-L-arginin und -ornithin..... | 22 |
| Abbildung 2-2: Übersicht über das neue Prodrugkonzept für <i>N</i> ^ω -Hydroxy-L-arginin (NOHA)..... | 23 |
| Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der komplexen Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen den Schlüsselenzymen der NO-Regulation und den Leitstrukturen verschiedener Modulatoren..... | 24 |
| Abbildung 3-1: Strukturen des <i>N</i> ^δ -Methyl-L-Arginin 1 und -ornithin 2 | 26 |
| Abbildung 3-2: Synthese von <i>N</i> ^δ -Methyl-L-arginin 1 und -ornithin 2 nach SCHADE..... | 27 |
| Abbildung 3-3: Darstellung des optimierten Schutzgruppenkonzeptes..... | 29 |
| Abbildung 3-4: Synthese des <i>N</i> ^α , <i>N</i> ^α -Bis-(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-L-ornithin- <i>tert</i> -butylesters 28 ausgehend von optisch reinem <i>N</i> ^α -Boc-L-ornithin 3 | 30 |
| Abbildung 3-5: Synthese des <i>N</i> ^δ -Methyl-L-ornithins 2 | 31 |
| Abbildung 3-6: Synthese des <i>N</i> ^δ -Methyl-L-arginins 1 | 32 |
| Abbildung 3-7: Alternativer Methylierungsversuch der <i>N</i> ^δ -Position in Anlehnung an LEBLEU <i>et al.</i> | 33 |
| Abbildung 3-8: Strukturformeln des Tenofovirdisoproxils 38 und Cefpodoximproxetils 37 als Beispiele für Arzneistoffe mit acetalischem Prodrugkonzept..... | 36 |
| Abbildung 3-9: Aktivierung einer <i>O</i> -glycosidischen Modellverbindung 39 durch β-Galactosidasen..... | 36 |
| Abbildung 3-10: Synthese des ersten acetalischen NOHA-Prodrugs mit Carbamatstruktur 47 nach SCHADE <i>et al.</i> | 37 |
| Abbildung 3-11: Schematische Darstellung eines orthogonalen Schutzgruppenkonzeptes mit Beispielen..... | 38 |
| Abbildung 3-12: Synthese der <i>O</i> -glycosylierten Modellverbindung 51 | 39 |
| Abbildung 3-13: Eoc-Abspaltung von 51 zur carbamatfreien Modellverbindung 52 | 39 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 3-15: Versuch zur hydrogenolytischen Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe von 53 mit 1,4-Cyclohexadien als Wasserstoff-Donator. | 41 |
| Abbildung 3-16: Mechanismus der Pd(0)-katalysierten Alloc-Abspaltung mit Dimedon als Allylgruppenakzeptor. | 42 |
| Abbildung 3-17: Synthese der Alloc-geschützten Modellverbindung 67 | 43 |
| Abbildung 3-18: Palladium-katalysierte Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe zur ersten carbamatfreien Verbindung mit peracetyliertem Monosaccharid 54 | 43 |
| Abbildung 3-19: Synthese von 1-Aminooxy-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-galactopyranose 45 | 44 |
| Abbildung 3-20: Synthese der carbamatfreien Prodrug-Vorstufe 73 | 45 |
| Abbildung 3-21: Finale Synthese der <i>O</i> -galactosylierten NOHA-Prodrugs 74 , 75 und 76 | 46 |
| Abbildung 3-22: Synthese des N^{ω} -(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-galactopyranos-1-yl)oxy-L-arginin-ethylesters 83 | 48 |
| Abbildung 3-23: Synthese von 1-Aminooxy-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucopyranose 86 | 49 |
| Abbildung 3-24: Übersicht über die Synthese der <i>O</i> -glucosylierten NOHA-Prodrugs 91-94 | 50 |
| Abbildung 3-25: Schematische Darstellung eines NOHA-Prodrugs mit einer offenen Acetalstruktur. | 51 |
| Abbildung 3-26: Synthese von Aminooxymethylisopropylcarbonat 98 | 51 |
| Abbildung 3-27: Synthese einer <i>O</i> -Methylisopropylcarbonat-Prodrugs als Modellverbindung 100 | 52 |
| Abbildung 3-28: Darstellung des ersten <i>O</i> -Methylisopropylcarbonat-NOHA-Prodrugs 103 | 53 |
| Abbildung 3-29: Versuch zur Darstellung eines Aminooxyisopropylcarbonats 105 | 54 |
| Abbildung 3-30: <i>O</i> -Methylisopropylcarbonat-substituiertes NOHA-Prodrug 103 mit offen-acetalischer Struktur. | 56 |
| Abbildung 3-31: Umsalzen des AbMEG in das Dihydrochloridsalz. | 57 |
| Abbildung 4-1: Beispiel einer ^{35}Cl -spektroskopischen Dreipunktkalibrierung mit NaCl in D_2O | 60 |
| Abbildung 4-2: Clorid-Widerfindung an ausgewählten Verbindungen durch ^{35}Cl -NMR. | 61 |
| Abbildung 4-3: ^1H -NMR-Spektren von 68 und 70 in CDCl_3 zur Verdeutlichung der α/β -Anomerisierung. | 62 |
| Abbildung 4-4: Ausschnitt aus den ^1H - ^1H -NOESY-Spektren von 101 und 72 | 63 |
| Abbildung 4-5: Dreidimensionale Darstellung von 101 und 72 in <i>Z</i> -Konfiguration. | 64 |
| Abbildung 4-6: ^{15}N -HMBC der Verbindung 101 in CDCl_3 | 65 |
| Abbildung 4-7: ^{15}N -INEPT-Experiment der Verbindung 73 in $\text{DMSO}-d_6$ | 66 |
| Abbildung 5-1: Schematische Darstellung des Chelatkomplexes von Kupferionen mit einer α -Aminosäure und L-Prolin nach GIL-Av <i>et al.</i> | 70 |
| Abbildung 5-2: Repräsentatives Chromatogramm von D-Arginin (blau) und L-Arginin (türkis) auf einer VDS Optilab Nucleosil 100 C-18 Säule. | 71 |
| Abbildung 5-3: Repräsentatives Chromatogramm von racemischem N^{δ} -Methylarginin (blau) und optisch reinem N^{δ} -Methyl-L-arginin (türkis) auf einer VDS Optilab Nucleosil 100 C-18 Säule. | 72 |
| Abbildung 6-1: SDS-PAGE-Analyse der hDDAH-1 (32 kDa) Herstellung in einer Fermenterkultur (5 L). | 77 |
| Abbildung 6-2: hDDAH-1 nach chromatografischer Reinigung an Ni^{2+} -NTA. | 78 |
| Abbildung 6-3: SDS-PAGE-Analyse der Vorversuche zur Ionenaustauschchromatografie der hDDAH-1 an einem ÄKTA™ Purifier FPLC-System. | 80 |
| Abbildung 6-4: Repräsentatives Chromatogramm einer IEC mit einem ÄKTA™ Purifier FPLC-System auf einer HiTrap® Q FF-Säule 5 mL. | 81 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 6-5: SDS-PAGE-Analyse der hDDAH-1 nach IEC-Chromatografie über ein Äkta™ Purifier FPLC-System auf HiTrap Q FF-Säulen 5 mL. | 82 |
| Abbildung 6-6: A) Western-Blot-Analyse und B) SDS-PAGE-Analyse der hDDAH-1 vor und nach der IEC. | 84 |
| Abbildung 6-7: Beispiel einer Kalibrierung des kolorimetrischen Plattenreader-Assays mit L-Citrullin..... | 85 |
| Abbildung 6-8: Ergebnisse des Kristallisationsscreenings der hDDAH-1 ohne Ligand. | 87 |
| Abbildung 6-9: A) Elektronendichtekarte der apohDDAH-1 überlagert mit der der hDDAH-1 mit AbMEG 10 B) Struktur-Cartoon der hDDAH-1 mit AbMEG | 88 |
| Abbildung 6-10: A) Elektronendichtekarte der hDDAH-1 mit AbMEG überlagert mit der Elektronendichtekarte der hDDAH-1 mit L-257 (MURRAY-RUST <i>et al.</i>); B) Elektronendichtekarte der apohDDAH-1 überlagert mit der der hDDAH-1 mit AbMEG und mit der Elektronendichtekarte der hDDAH-1 mit L-257 (MURRAY-RUST <i>et al.</i>)..... | 89 |
| Abbildung 6-11: Elektronendichtekarte der apohDDAH-1 überlagert mit der der hDDAH-1 mit AbMEG 10 | 90 |
| Abbildung 6-12: Ergebnisse der Aktivitätsuntersuchungen der hDDAH-1_G129T in verschiedenen Puffersystemen. | 91 |
| Abbildung 8-1: Vektorkarte des pREP4 (3740 bp)..... | 163 |
| Abbildung 8-2: Vektorkarte des pQE30 (346 bp). | 163 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| Tabelle 3-1: Übersicht über alle im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Monosaccharid-konjugierten NOHA-Prodrugs..... | 55 |
| Tabelle 5-1: Spezifische Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ von <i>N</i> ^δ -Methyl-L-arginin 1 , -ornithin 2 und Arginin..... | 73 |
| Tabelle 6-1: Hemmdaten ausgewählter Guanidin-basierter Inhibitoren der hDDAH-1..... | 74 |
| Tabelle 6-2: Hemmdaten ausgewählter Amidin-basierter Inhibitoren der hDDAH-1..... | 75 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------------------------|---|
| Å..... | Ångström |
| ABH | (S)-2-Amino-6-borono-hexansäure |
| AbMEG | N-(4-Aminobutyl)-N'-(2-methoxyethyl)guanidin |
| abs..... | absolutiert (Lösungsmittel) |
| Ac | Acetyl |
| ADMA..... | asymmetrisches N ^ω ,N ^ω -Dimethyl-L-arginin |
| Alloc | Allyloxycarbonyl |
| AMPA | 2-Amino-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propionsäure |
| APS..... | Ammoniumperoxodisulfat |
| aq..... | <i>aquosum</i> , wässrig |
| Ar | Aromat |
| Atm | Atmosphäre |
| BCA..... | Bicinchoninsäure |
| BEC..... | (S)-2-Boronoethyl-L-cystein |
| Bn..... | Benzyl |
| Boc | <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl |
| Boc ₂ O | Di- <i>tert</i> -butylcarbonat |
| br..... | breites Signal (NMR-Spektroskopie) |
| BTEAC..... | Benzyltriethylammoniumchlorid |
| Cbz | Benzyloxycarbonyl |
| CDCl ₃ | deutiertes Chloroform |
| cGMP..... | zyklisches Guanosinmonophosphat |
| Cl-NIO..... | N ⁵ -(1-Imino-2-chlorethyl)-L-ornithin |
| clogP..... | berechneter dekadischer Logarithmus des Oktanol-Wasser- Verteilungskoeffizienten |
| COSY..... | <i>Correlation Spectroscopy</i> |
| CYP450 | Cytochrom P450 |
| d..... | Dublett (NMR-Spektroskopie) |
| DC..... | Dünnschichtchromatografie |
| DCC..... | Dicyclohexylcarbodiimid |
| DCM | Dichlormethan |
| dd..... | Dublett eines Dubletts (NMR-Spektroskopie) |
| DDAH..... | Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase |
| ddd..... | Dublett eines Dubletts eines Dubletts (NMR-Spektroskopie) |
| ddt..... | Dublett eines Dubletts eines Triplets (NMR-Spektroskopie) |
| DIPEA..... | N,N-Diisopropylethylamin |
| DMAC | N,N-Dimethylacetamid |
| DMAP | 4-(Dimethylamino)pyridin |
| DME | 1,2-Dimethoxyethan |

| | |
|-----------------------------------|--|
| DMF..... | <i>N,N</i> -Dimethylformamid |
| DMSO- <i>d</i> ₆ | vollständig deuteriertes Dimethylsulfoxid |
| D ₂ O..... | Deuteriumoxid |
| <i>DpnI</i> | Restriktionsendonuklease aus <i>Diplococcus pneumoniae</i> |
| dt..... | Dublett eines Triplets (NMR-Spektroskopie) |
| DTT..... | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDCI..... | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid |
| EDRF..... | <i>endothelium derived relaxing factor</i> |
| EDTA..... | Ethylendiamintetraessigsäure |
| <i>ee</i> | <i>enantiomeric excess</i> (Enantiomerenüberschuss) |
| eNOS..... | endotheliale NOS |
| eq..... | Äquivalente |
| Et..... | Ethyl |
| Et ₂ O..... | Diethylether |
| EtOH..... | Ethanol |
| Fa..... | Firma |
| FAD..... | Flavin-Adenin-Dinukleotid |
| FMN..... | Flavin-Mononukleotid |
| fmol..... | Femtomol |
| FPLC..... | <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> |
| g..... | Gramm |
| (g)..... | gasförmig |
| GeV..... | Gigaelektronenvolt |
| GFR..... | glomeruläre Filtrationsrate |
| GTN..... | Glyceroltrinitrat |
| GTP..... | Guanosintriphosphat |
| h..... | Stunde |
| HMBC..... | <i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i> |
| HPLC..... | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| HRMS..... | <i>High Resolution Mass Spectrometry</i> |
| HRP..... | <i>Horseradish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase |
| HSQC..... | <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy</i> |
| <i>i</i> | <i>iso</i> |
| IEC..... | <i>Ion Exchange Chromatography</i> |
| IEP..... | Isoelektrischer Punkt |
| IEX..... | <i>Ion Exchange</i> |
| INEPT..... | <i>Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer</i> |
| iNOS..... | induzierbare NOS |
| IPTG..... | Isopropyl-β-D-thiogalactosid |
| IR..... | Infrarot |
| ISDN..... | Isosorbitdinitrat |
| ISMN..... | Isosorbitmononitrat |

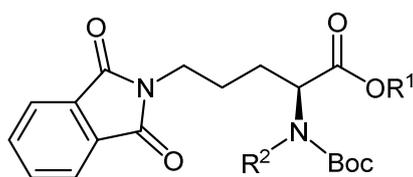
| | |
|------------------|--|
| <i>J</i> | Kopplungskonstante in Hz |
| JCSG..... | <i>Joint Center of Structural Genomics</i> |
| K..... | Kelvin |
| K_i | Inhibitionskonstante (Dissoziationskonstante eines Inhibitors) |
| K_m | Michaelis-Konstante |
| konz..... | konzentriert |
| L..... | Liter |
| L-257..... | N^{ω} -(2-Methoxyethyl)-L-arginin |
| LAC..... | Ligandenaustauschchromatografie |
| LB..... | <i>Lysogeny Broth</i> (Nährmedium) |
| LC..... | <i>Liquid Chromatography</i> |
| LC/MS..... | <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> |
| m..... | Multipllett (NMR-Spektroskopie) |
| M..... | molar (mol/L) |
| <i>M</i> | molare Masse |
| mARC..... | mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente (<i>mitochondrial amidoxime reducing component</i>) |
| mbar..... | Millibar |
| Me..... | Methyl |
| MeOH..... | Methanol |
| MHz..... | Megahertz |
| min..... | Minute |
| mL..... | Milliliter |
| mm..... | Millimeter |
| mmol..... | Millimol |
| MS..... | Massenspektrometrie |
| mtNOS..... | mitochondriale NOS |
| <i>m/z</i> | Masse/Ladungsverhältnis |
| MW..... | Mittelwert |
| MWCO..... | Molekulargewichts- <i>cutoff</i> |
| <i>N</i> | Normalität |
| NADPH..... | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat |
| NANC..... | <i>non-noradrenergic, non-cholinergic</i> |
| ng..... | Nanogramm |
| NHAM..... | N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -Methyl-L-arginin |
| nm..... | Nanometer |
| NMDA..... | <i>N</i> -Methyl-D-aspartat |
| NMMA..... | N^{ω} -Monomethyl-L-arginin |
| nmol..... | Nanomol |
| NMR..... | Kernresonanzspektroskopie |
| nNOS..... | neuronale NOS |
| NO..... | Stickstoffmonoxid |

| | |
|---|--|
| NOHA | N^{ω} -Hydroxy-L-arginin |
| NOS | NO-Synthasen |
| NOSY | <i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i> |
| NTA | Nitrilotriessigsäure |
| <i>o</i> | <i>ortho</i> |
| OD ₆₀₀ | optische Dichte bei 600 nm |
| <i>o</i> -PA | <i>ortho</i> -Phthaldialdehyd |
| <i>p</i> | <i>para</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| Pd/C | Palladium auf Aktivkohle |
| Pd(0)[Ph ₃ P] ₄ | Tetrakis(triphenylphosphin)palladium (0) |
| PEG | Polyethylenglykol |
| pH | <i>potentia hydrogenii</i> (mit -1 multiplizierter dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration) |
| PKG | Proteinkinase G |
| pmol | Pikomol |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| ppm | <i>parts per million</i> |
| PRMT | Protein-Arginin-Methyltransferase |
| q | Quartett (NMR-Spektroskopie) |
| RAS | Renin-Angiotensin-System |
| R | Auflösung (Chromatografie) |
| R_f | <i>ratio of front</i> , Retentionsfaktor (DC) |
| rpm | <i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Singulett (NMR-Spektroskopie) |
| SAR | <i>structure activity relationship</i> (Struktur-Wirkungsbeziehungen) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| S/N | Signal-Rausch-Verhältnis |
| SD | Standardabweichung |
| SDMA | symmetrisches $N^{\omega}, N^{\omega'}$ -Dimethyl-L-arginin |
| sep | Septett (NMR-Spektroskopie) |
| sGC | lösliche Guanylylcyclase |
| SMTC | S-Methyl-L-thiocitrullin |
| t | Triplett (NMR-Spektroskopie) |
| TB | <i>Terrific Broth</i> (Nährmedium) |
| TBAHS | Tetrabutylammoniumhydrogensulfat |
| TBST | <i>Tris Buffered Saline</i> (mit Tween 20) |
| td | Triplett eines Dubletts (NMR-Spektroskopie) |
| TEA | Triethylamin |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| <i>tert</i> , ^t | tertiär |

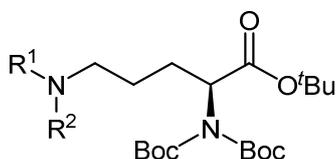
| | |
|----------------------|---|
| TFA | Trifluoressigsäure |
| THF | Tetrahydrofuran |
| T_m | Schmelztemperatur |
| TMS | Tetramethylsilan |
| TPS | Natrium-3-(trimethylsilyl)propan-1-sulfonat |
| Tris | 2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| V-NIO | N^5 -(1-Iminobut-3-enyl)-L-ornithin |
| δ | chemische Verschiebung |
| λ | Wellenlänge |
| λ_{em} | Emissionswellenlänge |
| λ_{ex} | Anregungswellenlänge |
| μL | Mikroliter |

STRUKTURFORMELVERZEICHNIS

N^{δ} -Phthalimid-geschützte L-Ornithinderivate

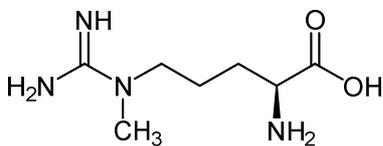
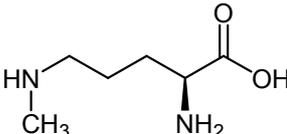


| Verbindung | Ziffer | R ¹ | R ² |
|--|--------|----------------|----------------|
| N^{α} -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)- N^{δ} -phthalimido-L-ornithin | 24 | -H | -H |
| N^{α} -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)- N^{δ} -phthalimido-L-ornithin- <i>tert</i> -butylester | 26 | - <i>t</i> Bu | -H |
| N^{α} - N^{α} -Bis-(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)- N^{δ} -phthalimido-L-ornithin- <i>tert</i> -butylester | 27 | - <i>t</i> Bu | -Boc |
| N^{α} -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)- N^{δ} -phthalimido-L-ornithin-ethylester | 77 | -Et | -H |

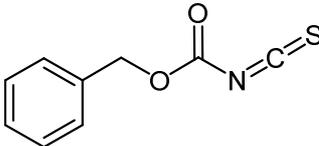
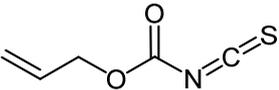
N^{α} - N^{α} -DiBoc-geschützte L-Ornithin- und L-Argininderivate

| Verbindung | Ziffer | R ¹ | R ² |
|--|--------|----------------|----------------|
| N^{α},N^{α} -Bis-(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-ornithin- <i>tert</i> -butylester | 28 | -H | -H |
| N^{α},N^{α} -Bis-(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)- N^{δ} -(2-nitrophenylsulfonyl)-L-ornithin- <i>tert</i> -butylester | 30 | | -H |
| N^{α},N^{α} -Bis-(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)- N^{δ} -methyl- N^{δ} -(2-nitrophenylsulfonyl)-L-ornithin- <i>tert</i> -butylester | 31 | | -Me |
| N^{α},N^{α} -Bis-(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)- N^{δ} -methyl-L-ornithin- <i>tert</i> -butylester | 33 | -H | -Me |
| $N^{\omega},N^{\omega'}$ -Bis-(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)- N^{α},N^{α} -bis-(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)- N^{δ} -methyl-L-arginin- <i>tert</i> -butylester | 34 | | -Me |

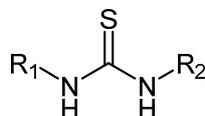
***N*^δ-Methyl-L-arginin und *N*^δ-Methyl-L-ornithin**

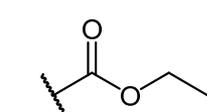
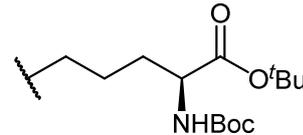
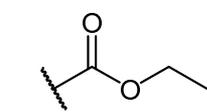
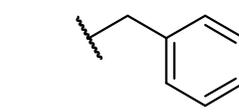
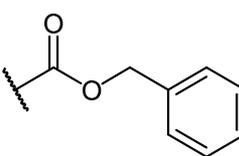
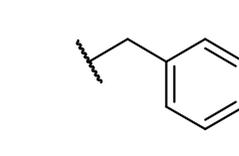
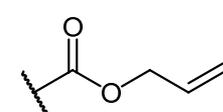
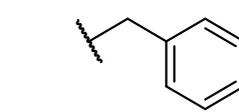
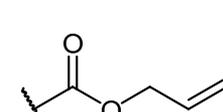
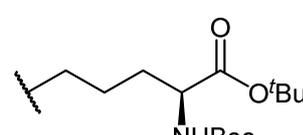
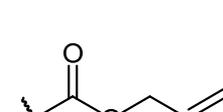
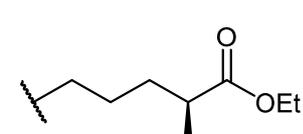
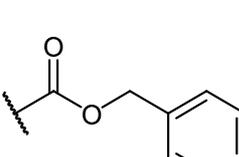
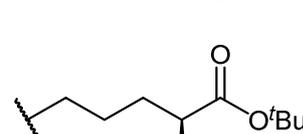
| Verbindung | Ziffer | Struktur |
|--|--------|--|
| <i>N</i> ^δ -Methyl-L-arginin | 1 |  |
| <i>N</i> ^δ -Methyl-L-ornithin | 2 |  |

Isothiocyanate

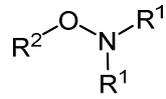
| Verbindung | Ziffer | Struktur |
|---|--------|--|
| <i>N</i> -Benzyloxycarbonyl- isothiocyanat | 56 |  |
| <i>N</i> -Allyloxycarbonylisothiocyanat | 65 |  |

Thioharnstoffe



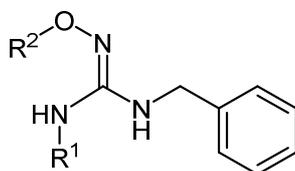
| Verbindung | Ziffer | R ¹ | R ² |
|--|--------|---|---|
| <i>N</i> ^α -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)- <i>N</i> ^ω -ethoxycarbonyl-L-thiocitrullin- <i>tert</i> -butylester | 44 |  |  |
| <i>N</i> -Ethyloxycarbonyl- <i>N</i> '-benylthioharnstoff | 50 |  |  |
| <i>N</i> -Benzylloxycarbonylcarbonyl- <i>N</i> '-benzylthioharnstoff | 55 |  |  |
| <i>N</i> -Allyloxycarbonyl- <i>N</i> '-benzylthioharnstoff | 66 |  |  |
| <i>N</i> ^α -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)- <i>N</i> ^ω -allyloxycarbonyl-L-thiocitrullin- <i>tert</i> -butylester | 71 |  |  |
| <i>N</i> ^α -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)- <i>N</i> ^ω -allyloxycarbonyl-L-thiocitrullin-ethylester | 80 |  |  |
| <i>N</i> ^α -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)- <i>N</i> ^ω -benzyloxycarbonyl-L-thiocitrullin- <i>tert</i> -butylester | 115 |  |  |

Hydroxylamine und deren Vorstufen



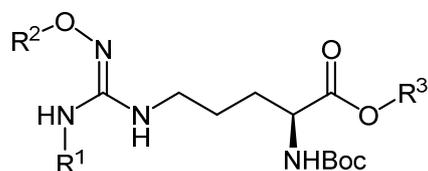
| Verbindung | Ziffer | R ¹ | R ² |
|--|--------|----------------|----------------|
| 1-Aminoxy-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-galactopyranose | 45 | -H | |
| <i>N</i> -(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)phthalimid | 70 | | |
| <i>N</i> -(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-glucopyranos-1-yloxy)phthalimid | 85 | | |
| 1-Aminoxy-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-glucopyranose | 86 | -H | |
| <i>N</i> -(Isopropoxycarbonyloxy-methoxy)phthalimid | 97 | | |
| Aminooxymethyl-isopropylcarbonat | 98 | -H | |

Modellverbindungen

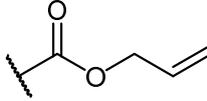
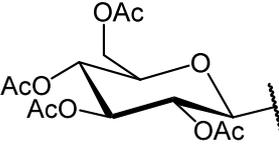
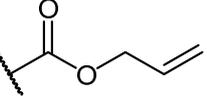
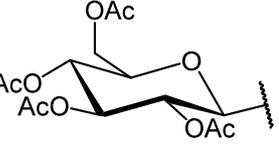
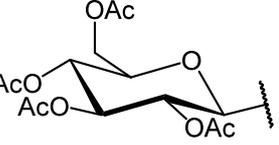
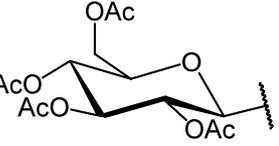
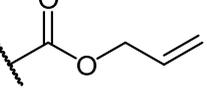
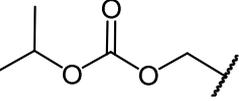
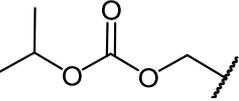
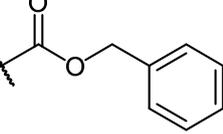
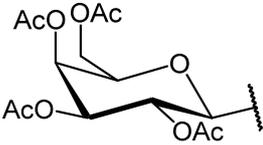
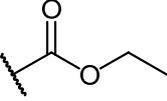
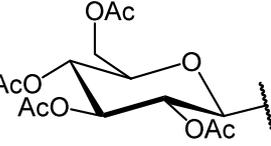


| Verbindung | Ziffer | R ¹ | R ² |
|--|--------|----------------|----------------|
| <i>N</i> -Benzyl- <i>N'</i> -ethoxycarbonyl- <i>N''</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)guanidin | 51 | | |
| <i>N</i> -Benzyl- <i>N'</i> -(β-D-galactopyranos-1-yloxy)guanidin | 52 | -H | |
| <i>N</i> -Benzyl- <i>N'</i> -benzyloxycarbonyl- <i>N''</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)guanidin | 53 | | |
| <i>N</i> -Benzyl- <i>N'</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)guanidin | 54 | -H | |
| <i>N</i> -Benzyl- <i>N'</i> -allyloxycarbonyl- <i>N''</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)guanidin | 67 | | |
| <i>N</i> -Benzyl- <i>N'</i> -allyloxycarbonyl- <i>N''</i> -(isopropoxycarbonyloxymethoxy)guanidin | 99 | | |
| <i>N</i> -Benzyl- <i>N'</i> -(isopropoxycarbonyloxymethoxy)guanidin | 100 | -H | |

Geschützte NOHA-Prodrug-Vorstufen

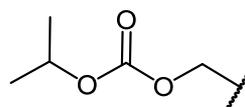
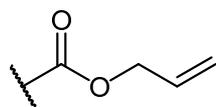


| Verbindung | Ziffer | R ¹ | R ² | R ³ |
|---|--------|----------------|----------------|----------------|
| <i>N</i> ^α -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)- <i>N</i> ^ω -ethoxycarbonyl- <i>N</i> ^{ω'} -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin- <i>tert</i> -butylester | 46 | | | - <i>t</i> Bu |
| <i>N</i> ^ω -Ethoxycarbonyl- <i>N</i> ^{ω'} -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin | 47 | | | -H |
| <i>N</i> ^α -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)- <i>N</i> ^ω -allyloxycarbonyl- <i>N</i> ^{ω'} -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin- <i>tert</i> -butylester | 72 | | | - <i>t</i> Bu |
| <i>N</i> ^α -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)- <i>N</i> ^ω -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin- <i>tert</i> -butylester | 73 | -H | | - <i>t</i> Bu |
| <i>N</i> ^α -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)- <i>N</i> ^ω -allyloxycarbonyl- <i>N</i> ^{ω'} -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin-ethylester | 81 | | | -Et |
| <i>N</i> ^α -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)- <i>N</i> ^ω -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin-ethylester | 82 | -H | | -Et |

| | | | | |
|---|-----|---|--|------|
| <p>N^α-(<i>tert</i>-Butyloxycarbonyl)- N^ω-allyloxycarbonyl-N^ω- (2,3,4,6-tetra-<i>O</i>-acetyl- β-D-glucopyranos-1-yloxy)-L- arginin-<i>tert</i>-butylester</p> | 87 |  |  | -tBu |
| <p>N^α-(<i>tert</i>-Butyloxycarbonyl)- N^ω-allyloxycarbonyl-N^ω- (2,3,4,6-tetra-<i>O</i>-acetyl- β-D-glucopyranos-1-yloxy)-L- arginin-ethylester</p> | 88 |  |  | -Et |
| <p>N^α-(<i>tert</i>-Butyloxycarbonyl)- N^ω-(2,3,4,6-tetra-<i>O</i>-acetyl- β-D-glucopyranos-1-yloxy)-L- arginin-<i>tert</i>-butylester</p> | 89 | -H |  | -tBu |
| <p>N^α-(<i>tert</i>-Butyloxycarbonyl)- N^ω-(2,3,4,6-tetra-<i>O</i>-acetyl- β-D-glucopyranos-1-yloxy)-L- arginin-ethylester</p> | 90 | -H |  | -Et |
| <p>N^α-(<i>tert</i>-Butyloxycarbonyl)- N^ω-allyloxycarbonyl-N^ω-(iso- propoxycarbonyloxymethoxy) -L-arginin-<i>tert</i>-butylester</p> | 101 |  |  | -tBu |
| <p>N^α-(<i>tert</i>-Butyloxycarbonyl)- N^ω-(isopropoxycarbonyloxy- methoxy)-L-arginin-<i>tert</i>- butylester</p> | 102 | -H |  | -tBu |
| <p>N^α-(<i>tert</i>-Butyloxycarbonyl)- N^ω-allyloxycarbonyl-N^ω- (2,3,4,6-tetra-<i>O</i>-acetyl- β-D-galactopyranos-1-yloxy)-L- arginin-<i>tert</i>-butylester</p> | 116 |  |  | -tBu |
| <p>N^α-(<i>tert</i>-Butyloxycarbonyl)- N^ω-ethoxycarbonyl-N^ω- (2,3,4,6-tetra-<i>O</i>-acetyl- β-D-glucopyranos-1-yloxy)-L- arginin-<i>tert</i>-butylester</p> | 117 |  |  | -tBu |

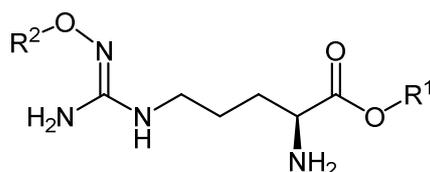
N^α -(*tert*-Butyloxycarbonyl)-
 N^ω -allyloxycarbonyl- N^ω' -(iso-
 propoxycarbonyloxymethoxy)
 -L-arginin-ethylester

118



-Et

NOHA-Prodrugs

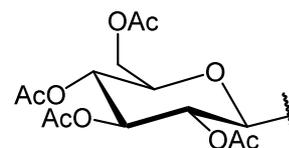


| Verbindung | Ziffer | R ¹ | R ² |
|---|--------|----------------|----------------|
| N^ω -(β -D-Galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin-ethylester | 74 | -Et | |
| N^ω -(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin | 75 | -H | |
| N^ω -(β -D-Galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin | 76 | -H | |
| N^ω -(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin-ethylester | 83 | -Et | |
| N^ω -(β -D-Glucopyranos-1-yloxy)-L-arginin-ethylester | 91 | -Et | |
| N^ω -(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-glucopyranos-1-yloxy)-L-arginin | 92 | -H | |

N^{ω} -(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranos-1-yloxy)-L-arginin-ethylester

93

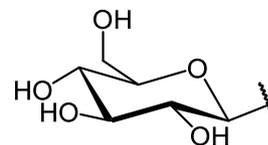
-Et



N^{ω} -(β -D-Glucopyranos-1-yloxy)-L-arginin

94

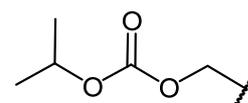
-H



N^{ω} -(Isopropoxycarbonyloxymethoxy)-L-arginin

103

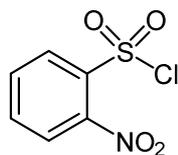
-H



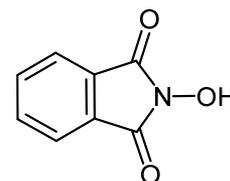
Kommerziell erworbene Edukte und Reagenzien

| Reagenz | Struktur | Reagenz | Struktur |
|---|----------|---|----------|
| N^{α} -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-L-ornithin 3 | | Benzylamin 49 | |
| N,N -Bis(<i>tert</i> -butyloxy-carbonyl)thioharnstoff 16 | | 5,5-Dimethyl-cyclohexan-1,3-dion 59 | |
| Phthalanhydrid 23 | | Chlorameisen-säureallylester 64 | |
| <i>tert</i> -Butylbromid 25 | | 1-Brom-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- β -D-galactopyranose 68 | |

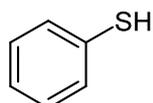
2-Nitrophenyl-
sulfonylchlorid
29



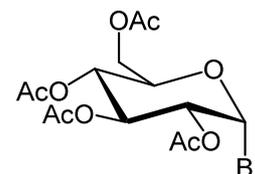
N-Hydroxy-
phthalimid
69



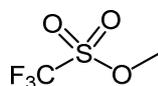
Thiophenol
32



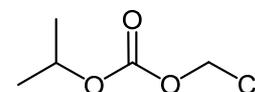
1-Brom-2,3,4,6-
tetra-*O*-acetyl- β -
D-glucopyranose
84



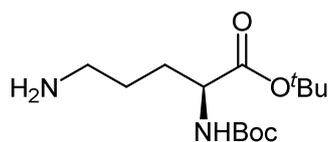
Methyltrifluor-
methansulfon-
säure
35



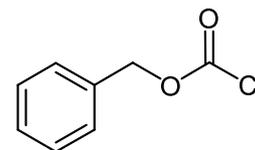
Chlormethyliso-
propylcarbonat
96



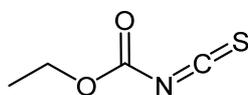
N^α-(*tert*-Butyl-
oxycarbonyl)-L-
ornithin-*tert*-
butylester
42



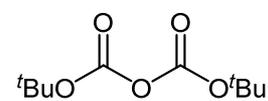
Chlorameisen-
säurebenzylester



Ethoxycarbonyl-
isothiocyanat
43



Di-*tert*-
butyldicarbonat
(Boc₂O)



1 EINLEITUNG

1.1 Stickstoffmonoxid (NO)

1.1.1 Geschichte, Eigenschaften und Vorkommen

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein gasförmiges Radikal, dessen physiologische Wirkung erst 1987 mit der Entdeckung als *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) enorm an Bedeutung gewann.¹⁻⁴ Diese Entdeckung legte den Grundstein für umfangreiche Forschungsarbeiten und machte NO im Jahre 1992 zum „Molekül des Jahres“.⁵ Sechs Jahre später ehrte man die Entdecker für ihre herausragenden Ergebnisse mit dem Nobelpreis für Medizin.⁶ Bereits lange vor der Entdeckung des EDRF war bekannt, dass Glyceroltrinitrat über eine gefäßerweiternde Wirkung verfügte, der Mechanismus dieser Wirkung war jedoch weitestgehend unbekannt. Auch Alfred Nobel, der Entdecker des Dynamits, wurde mit Glyceroltrinitrat, dem Hauptbestandteil des Dynamits, gegen *Angina pectoris* behandelt.^{7,8} In den späten 1970er Jahren entdeckte man die Ursache für den relaxierenden Effekt von Glyceroltrinitrat und Nitroprussid-Natrium auf die Gefäßmuskulatur. Untersuchungen zeigten, dass diese Wirkung auf eine spontane oder enzymatische Freisetzung von Stickstoffmonoxid zurückzuführen war.⁹ Der Erfolg des Glyceroltrinitrats bei der Behandlung der *Angina pectoris* hat sich bis zum heutigen Tage durchgesetzt. Im Jahre 1980 machten FURCHGOTT *et al.* die entscheidende Entdeckung, dass Endothelzellen auch ohne den Einsatz von Nitraten in der Lage waren eine Acetylcholin-vermittelte Vasodilatation herbeizuführen.^{10,11} Diese bemerkenswerte Beobachtung führte später zur Entdeckung des EDRF, der später dann als NO identifiziert werden konnte.

Bei NO handelt es sich unter Normalbedingungen um ein farbloses Gas, das in die Klasse der Stickoxide eingeordnet wird und somit einen Luftschadstoff darstellt.¹² Durch seine radikalischen Eigenschaften ist NO ein hochreaktives Molekül. In wässriger Lösung reagiert es schnell zu Nitrit und Nitrat, wohingegen es bei Kontakt mit Luftsauerstoff oder anderen Oxidationsmitteln toxisches Stickstoffdioxid (NO₂) bildet.¹³⁻¹⁵ Großtechnisch wird NO über das Ostwald-Verfahren durch Oxidation von Ammoniak bei Temperaturen von 800-900 °C gewonnen. Dieses Verfahren dient primär der Herstellung von Salpetersäure.¹⁶ In Säugetieren wird Stickstoffmonoxid vorwiegend aus der Aminosäure L-Arginin durch NO-Synthasen (NOS) gebildet (Kapitel 1.2.2), wohingegen in Pflanzen andere Mechanismen ablaufen. Diese können NO nicht-enzymatisch über eine Licht-abhängige Reduktion von Stickstoffdioxid durch Carotenoide oder enzymatisch aus Nitrit durch die NADPH-Nitratreduktase synthetisieren.¹⁷⁻²⁰

Freies Stickstoffmonoxid besitzt aufgrund seiner hohen Reaktivität im Organismus eine biologische Halbwertszeit im Millisekunden- bis Sekundenbereich.²¹⁻²³ Dennoch ist NO aufgrund seiner geringen Größe, seines neutralen Charakters und den daraus resultierenden hydrophoben Eigenschaften in der Lage, Biomembranen ungehindert zu überwinden.²³ NO hat eine hohe Affinität zu Übergangsmetallen wie Eisen und Kupfer im Zentrum von Proteinen wie z.B. den Hämproteinen.²⁴ Ein wichtiger Teil der unspezifischen Immunabwehr ist die Reaktion von NO mit dem Superoxidradikalanion (O₂⁻) zu Peroxynitrit (Kapitel 1.1.2).²⁵

1.1.2 Physiologie

Eine physikalische Ursache für die endogene Bildung von Stickstoffmonoxid ist die ständige mechanische Beanspruchung der luminalen Oberfläche des Gefäßendothels durch den Blutfluss und der daraus resultierende Scherstress.^{26,27} Weitere Ursachen sind die Rezeptor-vermittelten Effekte durch Acetylcholin, Adenin-Nukleotide, Bradykinin oder Serotonin, deren Wirkung auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren schließlich zur Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem Endoplasmatischen Reticulum führt.^{21,28,29} Die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration führt zur Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), die aus der natürlichen Aminosäure L-Arginin NO freisetzt (Kapitel 1.2.2). Durch die geringe Größe und elektrische Neutralität kann das NO durch die Zellmembran des Gefäßendothels in die benachbarten glatten Muskelzellen diffundieren, wo es seine vasodilatierende Wirkung zeigt (**Abbildung 1-1**).³⁰

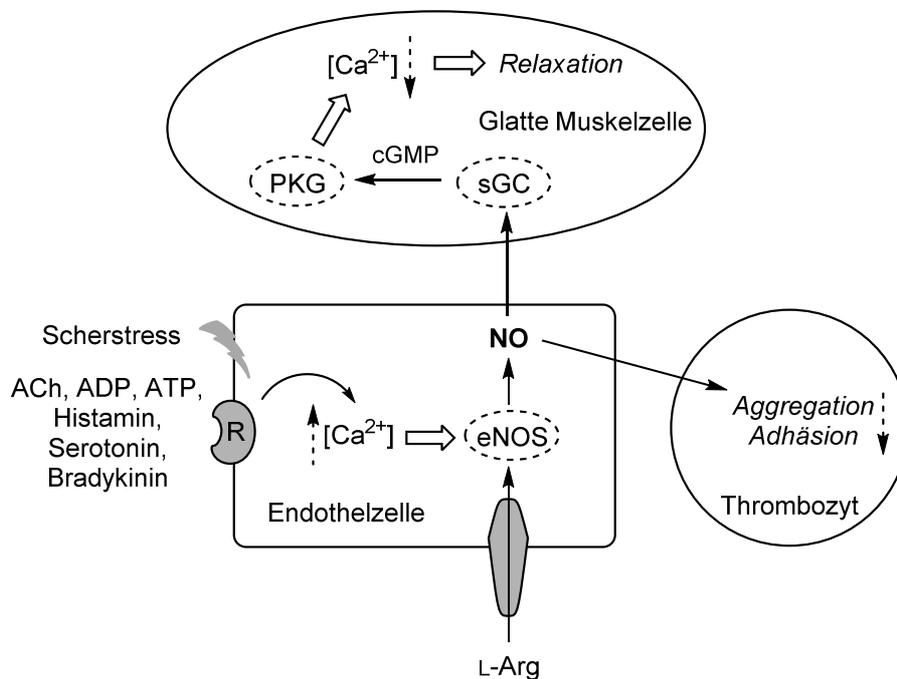


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der NO-Wirkung im Gefäßsystem. PKG = Proteinkinase G; cGMP = zyklisches Guanosinmonophosphat; sGC = lösliche Guanylylcyclase; eNOS = endotheliale NO-Synthase; ACh = Acetylcholin; ADP = Adenosindiphosphat; ATP = Adenosintriphosphat; R = Rezeptor; L-Arg= L-Arginin

Diese wohl bedeutendste physiologische Funktion des Stickstoffmonoxids ist auf die Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase (sGC) infolge der Komplexbildung mit dem zentralen Eisenatom des Hämliganden zurückzuführen.^{9,31} Dieses Enzym katalysiert durch Abspaltung eines Phosphatrestes die Umsetzung von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP), welches wiederum die Proteinkinase G (PKG) aktiviert.³² Folgt man der Signalkaskade weiter, so kommt es durch die Aktivierung der Proteinkinase G zu einer Phosphorylierung bestimmter Proteine wie z.B. der Myosin-Leichtketten-Kinase und letztendlich durch Absenkung des intrazellulären Calcium-Spiegels zu einer Vasodilatation.^{33,34}

Die Wirkung von Stickstoffmonoxid ist allerdings nicht auf die Regulation des Gefäßtonus beschränkt, sondern ist an einer Vielzahl weiterer physiologischer Prozesse beteiligt. Synergistisch zu der Blutdruckregulation ist die Wirkung von NO in Thrombozyten, wo es eine Hemmung der Aggregation und Adhäsion auslöst.^{35,36} Erklärungen dafür sind eine NO-vermittelte und Proteinkinase-katalysierte Phosphorylierung und damit Inaktivierung von Thromboxanrezeptoren und zusätzlich die Hemmung der Cyclooxygenase durch Peroxynitrit und damit der Synthese von Thromboxan A₂.^{37,38}

NO spielt zudem eine entscheidende Rolle als Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem, wo es nach verschiedenen Stimuli in Neuronen durch die neuronale NO-Synthase (nNOS) gebildet wird. Ein wichtiger Stimulus auf die postsynaptische NO-Freisetzung ist die Aktivierung der NMDA- und AMPA-Rezeptoren, die für die Weiterleitung von Aktionspotentialen verantwortlich sind.³⁹ Das freigesetzte NO erhöht durch Aktivierung der sGC wiederum die cGMP-Konzentration, welches weitere Effekte auf beispielsweise Ionenkanäle oder Proteinkinasen hat. So sind die Wirkungen von NO im ZNS sehr vielseitig und reichen von der Gedächtnisbildung über die Regulation des Appetits und Homöostase der Körpertemperatur bis zur Regulation der Hirndurchblutung.⁴⁰ Im peripheren Nervensystem reguliert NO als Transmitter an nichtadrenergen-nichtcholinergen Neuronen (NANC) hauptsächlich parasymphatisch innervierte Areale wie die Peristaltik des Magen-Darm-Trakts und Relaxation des *Corpus Caverosum*.⁴¹

Im Immunsystem spielt Stickstoffmonoxid eine wichtige Rolle als ein Teil der unspezifischen Immunabwehr. Die Entdeckung dieser wichtigen Funktion fand im Jahre 1987 statt, als in aktivierten Maus-Makrophagen beobachtet werden konnte, dass für die Replikationshemmung von Tumorzellen nur die Aminosäure L-Arginin benötigt wurde. Diese antitumorale Aktivität ging durch Substitution des L-Arginins an N^ω-Position verloren.⁴² Heute ist bekannt, dass NO in Makrophagen nach Induktion durch Zytokine oder bakterielle Toxine von einer induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in viel höheren Konzentrationen als von den anderen beiden NOS-Isoenzymen gebildet wird.^{43,44} Der zytotoxische Effekt von NO kann durch die hohe Affinität zum zentralen Eisenatom der Hämliganden in Enzymen der Atmungskette wie dem Cytochrom c oder durch die Reaktion mit Superoxidradikalanionen (O₂⁻) zu höchst reaktivem Peroxynitrit (ONOO⁻) mit stark oxidativem Potential auf beispielsweise die DNA oder Proteine erklärt werden.⁴⁵⁻⁴⁷

1.1.3 Pathophysiologie

Neben den zahlreichen physiologischen Funktionen von Stickstoffmonoxid kann es auch an einigen pathophysiologischen Prozessen eine zentrale Rolle spielen. Besonders in hohen Konzentrationen zeigt sich der zytotoxische Effekt von NO durch die verstärkte Bildung von reaktivem Peroxynitrit. Krankheiten wie Diabetes mellitus, Krebs oder inflammatorische Erkrankungen werden mit diesen Effekten in Zusammenhang gebracht.⁴⁸⁻⁵¹ Die Pathogenese des septischen Schocks ist ebenfalls auf eine stark gesteigerte NO-Synthese mit anschließender massiver Vasodilatation zurückzuführen.⁵² Viele neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und Multiple Sklerose werden mit oxidativem Stress und dem Auftreten von Peroxynitrit in Verbindung gebracht. Besonders bei Morbus Parkinson werden hohe NO-Konzentrationen für die NMDA-Rezeptor-vermittelte Erniedrigung endogener Dopamin-Spiegel verantwortlich gemacht.⁵³ Eine weitverbreitete und ebenfalls mit erhöhten NO-Spiegeln in Verbindung gebrachte Erkrankung ist die Migräne. Als Gründe dafür

werden NO-vermittelte Veränderungen der cerebralen wie auch der extra-cerebralen kranialen Durchblutung diskutiert.^{54,55} Aus gesundheitsökonomischer Sicht stellt die Migräne eine Erkrankung von besonderem Interesse dar, da sie in Europa im Jahre 2005 Gesamtkosten in Höhe von 28 Milliarden Euro verursacht hat.⁵⁶

Ein Großteil an Erkrankungen ist allerdings mit einem Mangel an Stickstoffmonoxid verbunden. Zu dieser NO-Insuffizienz können verschiedene Mechanismen beitragen, wie z.B. eine unzureichende Biosynthese durch die NO-Synthasen oder eine verstärkte Inaktivierung des gebildeten NOs durch oxidativen Stress.⁵⁷⁻⁵⁹ Die Entstehung vieler kardiovaskulärer Erkrankungen ist oftmals eng verknüpft mit einem Mangel an NO. Dabei stehen globale Volkskrankheiten wie Hypertonie, Atherosklerose und die koronare Herzkrankheit mit *Angina pectoris* im Vordergrund, deren Pathogenese sehr häufig auf eine endotheliale Dysfunktion infolge eines NO-Mangels zurückzuführen ist.^{58,60-63} Ein chronischer NO-Mangel als Ursache für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen wird von weiteren Faktoren wie Rauchen, Adipositas und Hypercholesterinämie erheblich verstärkt. Durch kardiovaskuläre Erkrankungen sind alleine in Deutschland im Jahre 2008 Gesamtkosten in Höhe von 37 Milliarden Euro entstanden, das entspricht einem Anteil von 14,5 %.⁶⁴ In der Bundesrepublik sind im Jahre 2013 39,7 % aller gemeldeten Todesfälle auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen, mehr als auf Krebserkrankungen (25 %).⁶⁵ Damit führen Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems nicht nur die Krankheitsstatistiken in Deutschland sondern auch die anderer Industrieländer wie den Vereinigten Staaten von Amerika an.⁶⁶

Eine weitere Erkrankung, die mit einem NO-Defizit einhergeht ist die erektile Dysfunktion. Diese Funktionsstörung hat neben organischen häufig auch psychosomatische Ursachen. Über NO-abhängiges cGMP als *second messenger* werden Calcium-Kanäle und kontraktile Proteine aktiviert, die zu einer Relaxation des *Corpus cavernosum* führen. Infolge eines NO-Mangels kann die anschließende Erektion beeinträchtigt sein.^{67,68}

1.2 Regulation des NO-Stoffwechsels

1.2.1 Allgemeine Übersicht

Die natürliche Quelle für Stickstoffmonoxid ist die semiessentielle Aminosäure L-Arginin (Kapitel 1.2.5), das in einer Fünf-Elektronen Oxidation über das Intermediat *N*^ω-Hydroxy-L-arginin (NOHA) zu L-Citrullin und NO metabolisiert wird. Diese Reaktion dient der physiologischen Bereitstellung von NO und wird durch die NOS (EC 1.14.13.39) katalysiert (**Abbildung 1-2**).⁶⁹ Des Weiteren kann L-Arginin durch die Arginase (EC 3.5.3.1) zu L-Ornithin und Harnstoff umgesetzt werden. Diese Reaktion stellt den finalen Schritt des Harnstoffzyklus dar und steht in Konkurrenz zu der NOS-katalysierten NO-Synthese.⁷⁰ Im Rahmen der Proteinbiosynthese dient L-Arginin als Baustein von Proteinen und kann anschließend über Protein-Arginin-Methyltransferasen posttranslational methyliert werden. Durch Proteolyse werden auf diese Weise verschieden methylierte Argininspezies freigesetzt (Kapitel 1.2.6),⁷¹ wobei ADMA und NMMA dabei Substrate der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH, EC 3.5.3.18) darstellen und zu L-Citrullin und (Di)methylamin umgesetzt werden.⁷² Die physiologische Funktion des SDMA ist noch nicht eindeutig geklärt und wird zurzeit kontrovers diskutiert.^{73,74}

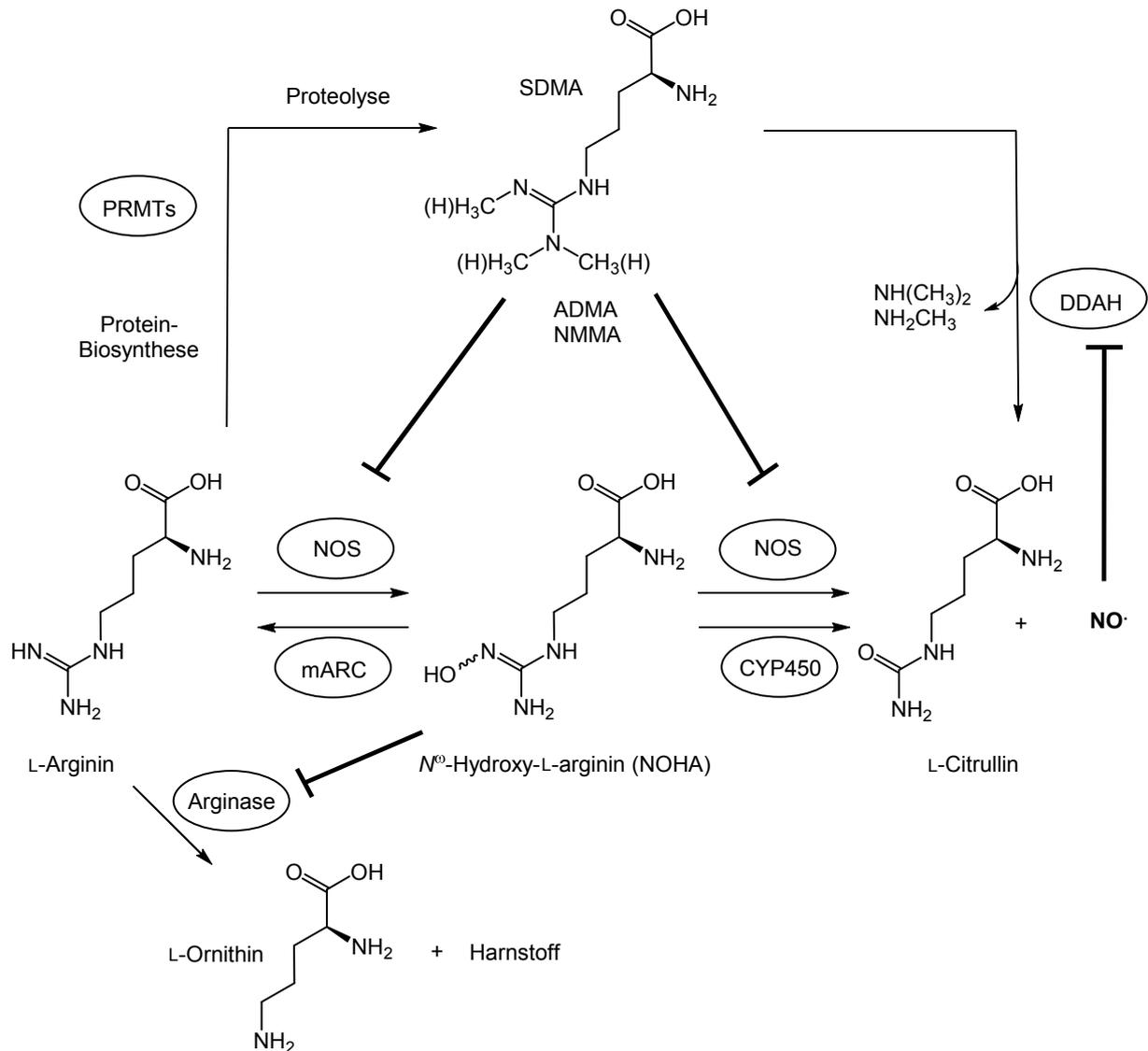


Abbildung 1-2: Übersicht über die Regulation des Stickstoffmonoxid-Stoffwechsels. NOS = NO-Synthase; CYP = Cytochrom P450; mARC = mitochondriale Amidoxim-reduzierende Komponente; DDAH = Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase; ADMA = asymmetrisches N^ω,N^ω-Dimethyl-L-arginin; NMMA = N^ω-Monomethyl-L-arginin; SDMA = symmetrisches N^ω,N^ω-Dimethyl-L-arginin; PRMT = Protein-Arginin-Methyltransferasen. Das Vorkommen von Isoenzymen bleibt in der Abbildung unberücksichtigt.

Da NO sowohl an vielen physiologischen Funktionen als auch an pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist, muss der NO-Stoffwechsel durch verschiedene endogene Mechanismen streng reguliert werden. Das Intermediat der NO-Synthese N^ω-Hydroxy-L-arginin stellt dabei selbst einen potenten Hemmstoff der Arginase dar ($K_i = 30\text{--}42\ \mu\text{M}$) und verhindert somit den Abbau von L-Arginin zugunsten der NO-Synthese.^{75,76} Weiterhin besitzen die methylierten Arginderivate ADMA ($K_i = 0,9\ \mu\text{M}$, bestimmt an humaner eNOS)⁷⁷ und NMMA ($K_i = 1,1\ \mu\text{M}$, bestimmt an humaner eNOS)⁷⁷ ebenfalls einen regulativen Einfluss, indem sie potente kompetitive Inhibitoren der NOS darstellen.^{78,79} Auch von Stickstoffmonoxid selbst geht durch reversible Nitrosylierung des Cysteins im katalytischen Zentrum eine Hemmung der DDAH aus. Dieser Mechanismus entspricht einem negativen *Feedback* und führt zur Akkumulation von

ADMA und NMMA, die wiederum die NOS hemmen und so einer überschießenden NO-Bildung entgegenwirken.⁸⁰

1.2.2 NO-Synthasen (NOSs)

NO-Synthasen gehören zu den Häm-haltigen Monooxygenasen, die in einer Fünf-Elektronen-Oxidation die natürliche Aminosäure L-Arginin über das Intermediat *N*-Hydroxy-L-arginin (NOHA) zu L-Citrullin und Stickstoffmonoxid umsetzen (**Abbildung 1-3**). Die für die Hydroxylierung eines *N*^ω-Stickstoffs der Guanidinfunktion benötigten Elektronen werden von dem essentiellen Coenzym Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) bereitgestellt.^{69,81}

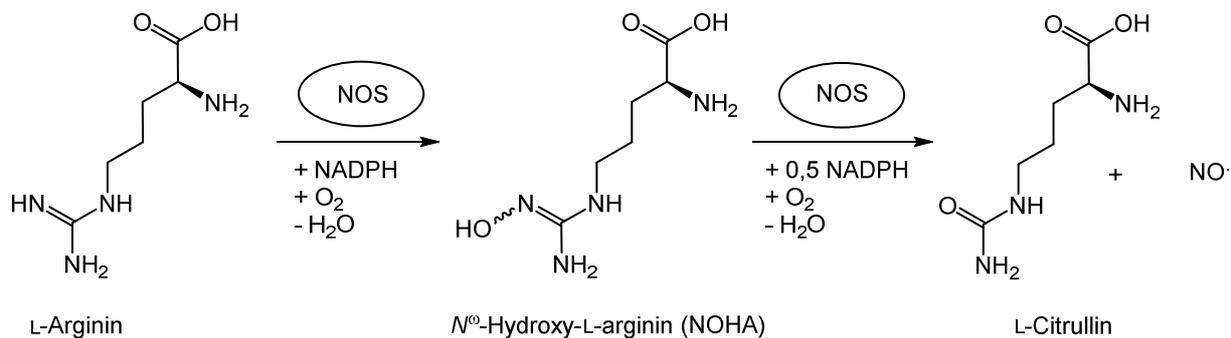


Abbildung 1-3: Umsetzung von L-Arginin über das Intermediat *N*-Hydroxy-L-arginin (NOHA) zu L-Citrullin und Stickstoffmonoxid.⁶⁹

Grundsätzlich sind alle NO-Synthasen aus zwei Domänen aufgebaut: *N*-Terminal befindet sich eine Oxydasedomäne, die Bindestellen für das Häm, den Cofaktor Tetrahydrobiopterin (BH₄) und das Substrat L-Arginin besitzt. Die *C*-terminale Reduktasedomäne hat Bindestellen für die Coenzyme Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavin-Mononukleotid (FMN) und NADPH. Verbunden sind die einzelnen Domänen über eine Einheit Calmodulin.⁸¹

NOS-Enzyme sind Monomere, die allerdings nur als Homodimere aktiv sind. Die Dimerisierung kommt dadurch zustande, dass Ca²⁺-Ionen mit Calmodulin komplexieren, das so durch Konformationsänderung einmal an jedes der beiden Monomere binden kann.^{45,82} Die Elektronenübertragung verläuft vom NADPH über die Flavine auf das zentrale Fe³⁺-Atom des Häms, welches infolgedessen zu Fe²⁺ reduziert wird. Dadurch wird die Anlagerung von Sauerstoff ermöglicht und die schrittweise Oxidation des L-Arginins beginnt.⁸³

Man unterscheidet zwischen drei Isoformen der NOS, die in unterschiedlichen Geweben vorkommen und dort verschiedene Funktionen haben. Im Folgenden soll besonders auf die Orte, an denen die Isoenzyme vornehmlich lokalisiert sind, eingegangen werden, da deren physiologische Funktionen bereits in Kapitel 1.1.2 ausführlich beschrieben wurden. Die Sequenzhomologie unter den drei Isoformen liegt bei 51-57 %, wobei das katalytische Zentrum hochkonserviert vorliegt.⁸¹ Die eNOS liegt im Gefäßendothel und in Thrombozyten konstitutiv exprimiert vor, kann aber auch durch mechanische Reize wie Scherstress induziert werden. Sie trägt entscheidend zur Regulation des Gefäßtonus bei und fungiert als Antagonist zu den Vasokonstriktoren des Sympathikus und Renin-Angiotensin-Systems (RAS).⁸⁴ Die nNOS befindet sich vorwiegend im zentralen und peripheren Nervensystem sowie in der Skelettmuskulatur,

wurde aber auch in anderen Geweben wie den Bronchien, der Niere, Hoden und Plazenta gefunden. Neben der cerebralen Durchblutung und der Gedächtnisbildung ist die nNOS durch die Relaxation des *Corpus cavernosum* auch maßgeblich an der natürlichen Fortpflanzung beteiligt.^{84,85} Im Gegensatz zu der eNOS und nNOS wird die iNOS nicht konstitutiv in bestimmten Geweben gebildet sondern vielmehr durch den Stimulus von Zytokinen und bakteriellen Toxinen induziert. Somit ist die iNOS Bestandteil des unspezifischen Immunsystems und setzt NO in wesentlich größeren Mengen frei als es die anderen beiden Isoenzyme tun.^{43,44,84} Die immunologische Wirkung ist vor allem auf das zytotoxische Peroxynitrit zurückzuführen und weniger auf das NO selbst.⁴⁶ Eine weitere in der Literatur beschriebene Isoform der NOS ist die mitochondriale NO-Synthase (mtNOS), die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und an der Atmungskette beteiligt sein soll.⁴⁵

1.2.3 Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH)

Bei der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase handelt es sich um eine Cystein-Hydrolase, die den Abbau der N^{ω} -methylierten L-Arginine ADMA und NMMA zu Di- bzw. Monomethylamin und L-Citrullin katalysiert.^{86,87} Die im Jahre 1987 in Ratten entdeckte DDAH bildet direkt kein NO, ist aber durch den regulatorischen Einfluss auf die Konzentration der beiden kompetitiven NOS-Inhibitoren ADMA und NMMA wesentlich an der Modulation der NO-Synthese beteiligt.^{87,88}

In Säugetieren konnten bisher zwei Isoformen der DDAH als DDAH-1 und DDAH-2 identifiziert werden, die eine Sequenzidentität von ca. 50 % und innerhalb einer Spezies sogar von ca. 92 % aufweisen. Im Gegensatz zur bakteriellen DDAH liegt die Säuger-DDAH als Monomer vor.^{87,89,90} Die humane DDAH-1 ist besonders im Gehirn, der Niere, Leber und im Pankreas lokalisiert, wohingegen die humane DDAH-2 verstärkt in Herz, Niere und Plazenta exprimiert wird. Die Arbeitsgruppe von LEIPER konnte zudem durch Analyse der mRNA eine Colokalisation der hDDAH-1 mit der nNOS sowie der hDDAH-2 mit der eNOS beobachten.⁹⁰ Die katalytische Aktivität der DDAH-2 wird hinsichtlich der Umsetzung methylierter Arginine zu L-Citrullin in den verschiedenen Arbeitsgruppen kontrovers diskutiert. Während die LEIPER-Gruppe bereits diese Umsetzung beobachten konnte, war es in keiner der umfangreichen Arbeiten des hiesigen Arbeitskreises möglich, von der DDAH-2 aus ADMA und NMMA gebildetes L-Citrullin nachzuweisen.^{91,90} Neuesten Erkenntnissen zufolge ist erstmals eine physiologische Funktion der DDAH-2 beobachtet worden. An DDAH-2-Knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese Tiere im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen eine beim induzierten, polybakteriellen septischen Schock nahezu doppelt so hohe Todesrate und eine anhaltende Hypotension in den letzten 12 Lebensstunden aufwiesen. So wurde postuliert, dass neben der DDAH-1 auch die DDAH-2 eine entscheidende Rolle bei der Regulation des vaskulären Tonus spielt.⁹²

Da bisher nur von der humanen DDAH-1 nicht aber von der humanen DDAH-2 Kristallstrukturen existieren, war es auch nur an diesem Enzym möglich, das katalytische Zentrum genauer zu untersuchen. Unsere und andere Arbeitsgruppen konnten anhand der jeweiligen Kristallstrukturen zeigen, dass sich im katalytischen Zentrum der hDDAH-1 eine katalytische Triade aus den Aminosäuren Cystein an Position 273, Asparaginsäure an Position 78 und einem Histidinrest an Position 172 befindet (Kapitel 6.5.2). Durch Anlagerung der Substrate ADMA oder NMMA wird die Thiolgruppe des Cysteins deprotoniert und das resultierende Thiolat kann am Guanidinkohlenstoff nukleophil angreifen. Der dabei entstehende tetrahedrale Übergangszustand kollabiert anschließend unter Freisetzung des Di- bzw.

Monomethylamins und das mit Cystein gebundene Thiuroniumion zerfällt durch Hydrolyse schließlich zu L-Citrullin (**Abbildung 1-4**).⁹³ Diese Hydrolyse wird durch das Histidin an Position 172 vermittelt.

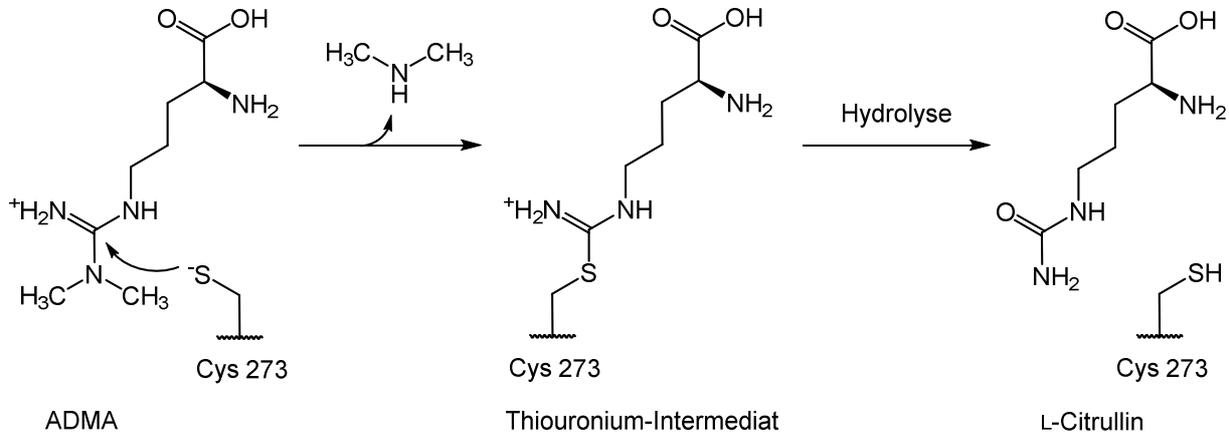


Abbildung 1-4: DDAH-1-katalysierte Umsetzung von ADMA zu Dimethylamin und L-Citrullin (modifiziert in Anlehnung an die Literatur).⁹³

Durch ein Zn^{2+} -Ion im katalytischen Zentrum wird das Enzym einerseits inhibiert und andererseits vor thermischer Belastung und Nitrosylierung durch NO geschützt.^{89,94} Letztere Reaktion entspricht dem bereits beschriebenen negativen Rückkopplungsmechanismus durch zu hohe NO-Konzentrationen. Bei keiner DDAH wurde bisher eine Abhängigkeit von Cofaktoren bei der katalytischen Umsetzung der Methylarginine beobachtet.

1.2.4 Arginase

Die Arginase gehört zur Familie der Hydrolasen und katalysiert den Abbau von L-Arginin zu der nicht-proteinogenen Aminosäure L-Ornithin und Harnstoff (**Abbildung 1-5**). Diese Reaktion bildet den letzten Schritt des Harnstoffzyklus, über den in der Leber toxisches Ammoniak abgebaut wird.⁹⁵

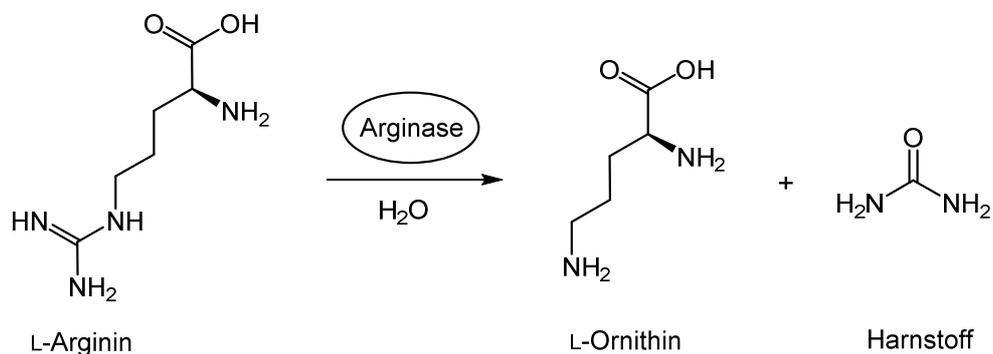


Abbildung 1-5: Abbau von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff durch die Arginase.

In der Natur kommt die Arginase in nahezu allen Lebewesen vor. So findet man sie in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und im Tierreich. Heutzutage sind zwei Isoformen der humanen Arginase bekannt: Die

cytosolische Arginase I und die mitochondriale Arginase II. Die Arginase I ist hauptsächlich in der Leber lokalisiert und dort am Harnstoffzyklus beteiligt.⁷⁰ Die Arginase II weist zur Arginase I eine Sequenzhomogenität von 58 % auf, wobei das katalytische Zentrum beider Isoformen hochkonserviert ist. Im Gegensatz zur Arginase I findet man die Isoform II vorwiegend in Niere, Prostata, Pankreas, im Gehirn und in der weiblichen Brustdrüse. In diesen Geweben dient sie unter anderem zur Biosynthese von L-Prolin und Polyaminen, die für die Kollagensynthese und Zellproliferation benötigt werden.^{70,95,96} Am besten ist die Funktion der Arginase II in den Zellen des Gefäßendothels untersucht, wo sie mit den NO-Synthasen um das Substrat L-Arginin konkurrieren. Die dadurch verminderte NO-Freisetzung wird oft in den Zusammenhang mit endothelialer Dysfunktion und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen gebracht.⁹⁷ Zudem konnte in jüngsten Untersuchungen gezeigt werden, dass NOHA bei der Wiederherstellung der Blutfluss-vermittelten Vasodilatation in fettleibigen Ratten mit endothelialer Dysfunktion eine entscheidende Rolle spielt.⁹⁸

Die humane Arginase liegt als Homotrimer vor, die in jeder der Untereinheiten zwei Mn^{2+} -Ionen im katalytischen Zentrum besitzt. Entscheidend für die katalytische Aktivität des Enzyms ist ein Hydroxidion, das die beiden Mn^{2+} -Ionen miteinander verbrückt und im Falle der L-Arginin-Anlagerung nukleophil am Guanidinkohlenstoff des Substrats angreift. Der dadurch entstehende tetrahedrale Übergangszustand kollabiert, ähnlich wie bei der DDAH, über protonenvermittelte Hydrolyse zu L-Ornithin und Harnstoff.^{70,99}

1.2.5 L-Arginin und N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA)

L-Arginin stellt eine aus metabolischer Sicht hochinteressante und vielseitige Verbindung dar. Diese Aminosäure dient aber nicht nur der NO-Synthese sondern auch als Vorstufe für die Biosynthese einer Vielzahl physiologisch relevanter Verbindungen wie Harnstoff, Prolin, Polyaminen, Glutamat, Kreatin und Agmatin. L-Arginin kann über die Nahrung aufgenommen, durch Proteinabbau bereitgestellt oder aus L-Citrullin über die am Harnstoffzyklus beteiligten Enzyme Argininosuccinat-Synthase und -Lyase gebildet werden.^{100,96} Für gesunde Erwachsene ist L-Arginin nicht-essentiell, wohingegen Kinder und Erwachsene mit stark kataboler Ernährungslage, beispielsweise infolge von Infektionen, eine Supplementierung benötigen.

Aufgenommen wird L-Arginin über verschiedene kationische Aminosäuretransporter, die die Aminosäure Na^+ -unabhängig in die Zelle transportieren. Die Konzentration an zirkulierendem L-Arginin liegt unter physiologischen Bedingungen bei etwa 0,1 mM, wohingegen in Geweben Konzentrationen von 0,1-1 mM nachgewiesen werden konnten.^{100,101} Nur ein sehr geringer Anteil von 1,2 % des Plasmaarginins wird für die Bereitstellung von NO benötigt. Der größte Teil dient hingegen der Proteinbiosynthese.¹⁰²

Die physiologische Bedeutung des N^{ω} -Hydroxy-L-arginins ist weniger vielseitig als die des L-Arginins. NOHA dient neben der Hemmung der Arginase ausschließlich der Produktion von Stickstoffmonoxid. Obwohl NOHA im Gegensatz zu L-Arginin fast ausschließlich intrazellulär und NOS-abhängig vorkommt, konnte dennoch im humanen Plasma eine Konzentration der freien Aminosäure von 9,1 μM detektiert werden.¹⁰¹ Auch die chemischen Eigenschaften von NOHA hinsichtlich der Basizität der Seitenkette unterscheiden sich stark von L-Arginin. Während in neueren Untersuchungen der pK_a der Guanidinfunktion des Arginins mit 13,8 beschrieben wird, liegt der pK_a der N -Hydroxyguanidinfunktion

von NOHA bei nur 8,1.^{103,104} Die hohe Basizität der Guanidine ist durch die Mesomerie-bedingte Verteilung der positiven Ladung auf die drei Stickstoffatome zu erklären, was in einem sehr stabilen Kation resultiert. Durch die Einführung einer elektronenziehenden Hydroxygruppe ist die Basizität der Guanidinfunktion stark herabgesetzt. Der Vergleich der chemischen und metabolischen Stabilität zeigt, dass NOHA eine deutlich instabilere Verbindung darstellt als seine Vorstufe L-Arginin. Die Möglichkeiten, wodurch NOHA degradiert werden kann, sind vielseitig (**Abbildung 1-6**). Im Allgemeinen stellen *N*-Hydroxyguanidine thermolabile Verbindungen dar, die nur als Salze starker Säuren stabile Verbindungen bilden, wohingegen sie labil gegenüber basenkatalysierter Hydrolyse sind.^{104,105} Bereits 1959 wurde gezeigt, dass *N*-Hydroxyguanidine einer enzymatischen Reduktion zu Guanidinen zugänglich sind.¹⁰⁶ Erst viele Jahre später konnte im Verlauf diverser Untersuchungen im Arbeitskreis gezeigt werden, dass diese Reduktion in Mikrosomen und Mitochondrien stattfindet und durch das mARC-Enzymsystem katalysiert wird.^{107–110}

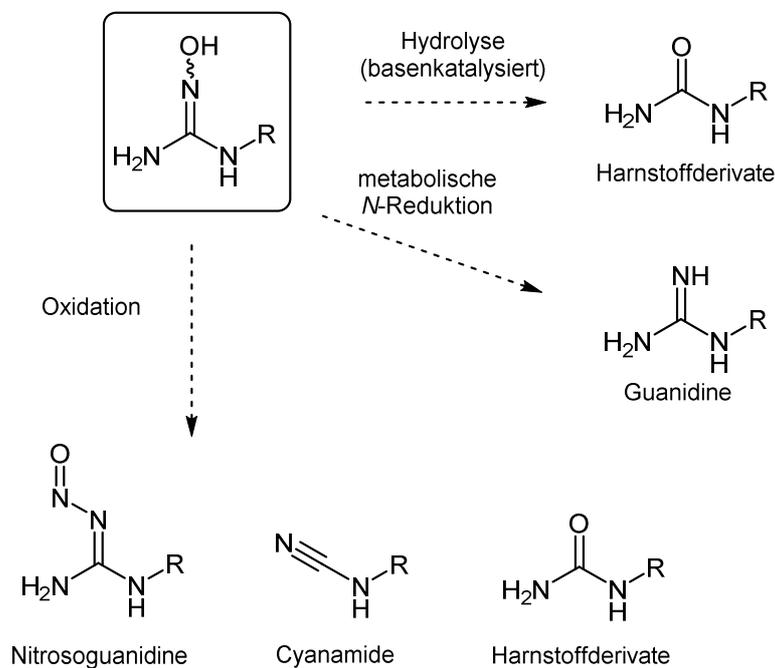


Abbildung 1-6: Metabolismus des *N*^ω-Hydroxy-L-arginins (Abb. in Anlehnung an SCHADE *et al.*).¹¹¹

Parallel zu der NOS-katalysierten Oxidation von NOHA zu L-Citrullin und NO konnte ebenfalls beobachtet werden, dass diese Reaktion auch von Cytochrom P450 Enzymen katalysiert wird.¹¹² Im Jahre 2011 konnten SCHADE *et al.* in umfangreichen Stabilitätsuntersuchungen zeigen, dass NOHA empfindlich gegenüber Oxidationsmitteln reagiert und durch Substanzen wie Peroxynitrit rasch degradiert wird. Dabei können Nitrosoguanidine, Cyanamide und Harnstoffderivate entstehen (**Abbildung 1-6**).¹⁰⁵

1.2.6 Methylierte Arginine

Neben den bereits beschriebenen Metabolismustwegen über die NOS und Arginase wird L-Arginin größtenteils im Rahmen der endogenen Proteinbiosynthese abgebaut. Über posttranslationale Modifikationen können Proteine auf verschiedenste Weise chemisch und funktionell verändert werden.

Diese Modifikationen haben starken Einfluss auf die Funktion des Proteins und finden sowohl am *N*- und *C*-Terminus als auch an Heteroatomen der Aminosäure-Seitenketten statt. Dabei können anorganische Reste wie Phosphat-, Hydroxy-, Sulfat- oder Nitrosogruppen oder organische Reste wie Acetyl-, Methyl-, Ubiquitin- oder Zuckergruppen übertragen werden.^{113,114} Hierbei handelt es sich allerdings nur um wenige prominente Beispiele, obgleich in der Natur etliche posttranslationale Modifikationen an Proteinen bekannt sind. Eine sehr wichtige Modifikation stellt die Methylierung der Guanidinstickstoffe in der Seitenkette des L-Arginins in Proteinen dar, die durch verschiedene Isoenzyme der Protein-Arginin-Methyl-Transferasen (PRMT, EC 2.1.1.23) katalysiert wird. Bei dieser Reaktion werden Methylgruppen vom endogenen Methylgruppendonor *S*-Adenosyl-L-methionin auf die Guanidinstickstoffe proteingebundener Argininreste übertragen. Dadurch werden verschiedene zellregulatorische Prozesse gesteuert, wie z.B. die Signaltransduktion, Transkription oder Protein-Protein-Interaktionen. In Histonen kann die Arginin-Methylierung das Binden verschiedener Effektormoleküle erleichtern oder verhindern, was der Transkriptionskontrolle spezifischer Gene dient (epigenetische Regulation). Die Arginin-Methylierung an Nicht-Histon-Proteinen spielt eine wichtige Rolle bei der Zellentwicklung aber auch bei der Tumorentstehung.^{71,115–117} Eine direkte Methylierung frei vorliegenden L-Arginins konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

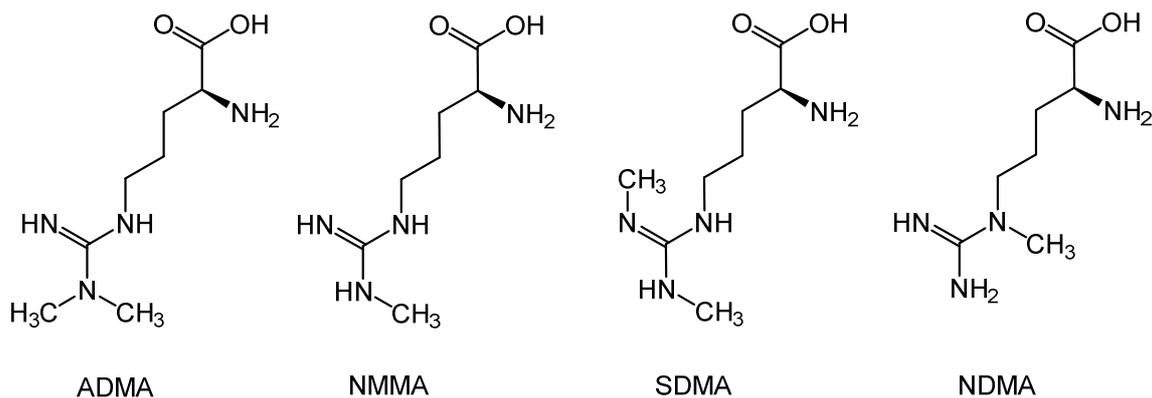


Abbildung 1-7: Übersicht verschieden methylierter Arginine. Die Abkürzungen sind in **Abbildung 1-2** erklärt.

Im Rahmen der Proteolyse werden die unterschiedlich methylierten Arginine in das Zytosol freigesetzt, wo sie an physiologischen Prozessen beteiligt sind (**Abbildung 1-7**). Die bekanntesten Vertreter dabei sind die NOS-Inhibitoren und DDAH-Substrate ADMA und NMMA, deren physiologische Bedeutung in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurde. ADMA gilt heutzutage als ein klinischer Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen.¹¹⁸ SDMA wird hingegen nicht von der DDAH als Substrate akzeptiert und übt auch keinen regulatorischen Einfluss auf die NOS aus.^{87,119} Es wird seit kürzerer Zeit als Marker für die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und somit für die renale Funktion sowie für das Ausmaß einer bestehenden koronaren Herzkrankheit diskutiert.^{120,121} Das 1998 in Hefezellen entdeckte *N*^ω-Methyl-L-arginin (NDMA) konnte in diesem Jahr auch erstmals im Menschen nachgewiesen werden.^{73,115} Die physiologische Funktion dieser Verbindung ist allerdings noch weitestgehend unbekannt, obwohl durch KOTTHAUS *et al.* bereits in *in vitro* Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass NDMA weder ein Substrat der hDDAH-1 und Arginase noch ein Hemmstoff der NOS-Isoenzyme darstellt.¹¹⁹ Dennoch konnte im humanen Plasma von gesunden Probanden eine NDMA-Konzentration von etwa 27 nM nachgewiesen

werden. Diese ist zwar deutlich geringer als die ADMA- und SDMA-Konzentration (ADMA: 493 nM, SDMA: 509 nM) im Plasma, aber im Bereich des NMMA, das in einer Konzentration von 48 nM nachgewiesen werden konnte.⁷³ In zukünftigen Arbeiten könnte die Funktion dieser Verbindung im Menschen weiter analysiert werden. Auch die Frage, ob es sich bei *N*^δ-Methyl-L-ornithin **2** um einen potentiellen Metaboliten des NDMA handelt, könnte ebenfalls Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

1.3 Therapeutische Modulation des NO-Stoffwechsels

Wie aus den vorangegangenen Kapiteln ersichtlich wird, übernimmt NO eine Vielzahl (patho)physiologischer Funktionen im Organismus. Gleichzeitig wird es über einen komplexen Mechanismus reguliert, was es zu einer großen Herausforderung macht, neue Arzneistoffe zu entwickeln, die gezielt in diese Regulation eingreifen sollen. Da sowohl eine hohe als auch eine geringe NO-Verfügbarkeit mit diversen Krankheiten assoziiert ist, stellen die Bereitstellung von Stickstoffmonoxid aber auch die Senkung der NO-Freisetzung wertvolle pharmakologische Ansätze dar. In der Praxis ist es oftmals ein schmaler Grat, eine klare Abgrenzung zwischen den nützlichen und schädlichen Effekten von NO zu unterscheiden, da diese auch vom physiologischen Zustand der Person abhängen, der u. a. stark durch oxidativen Stress, Begleiterkrankungen und Medikamenteneinnahme beeinflusst wird. Auch treten auf NO zurückzuführende kardiovaskuläre Erkrankungen oft in Kombination mit anderen Problemen wie Diabetes mellitus, Adipositas oder Tabakkonsum auf.^{44,111,122}

In den folgenden Kapiteln sollen verschiedene therapeutische Konzepte zur Behandlung der NO-Dysregulation vorgestellt werden.

1.3.1 Pharmakologische Optionen zur Steigerung der NO-Verfügbarkeit

Die wohl häufigsten NO-assoziierten Krankheitszustände gehen auf eine verminderte NO-Verfügbarkeit zurück. Die Bandbreite dieser Krankheitszustände ist groß und reicht von der Hypertonie über koronare Herzkrankheit mit Atherosklerose und der akuten *Angina pectoris* bis zur erektilen Dysfunktion (Kapitel 1.1.3). Dabei können verschiedene Mechanismen für die Senkung der NO-Verfügbarkeit verantwortlich sein. Eine unzureichende Biosynthese durch die NOS kann zu einem NO-Defizit führen. Dafür können eine verminderte Aktivität der DDAH und der damit verbundene Anstieg der ADMA und NMMA-Spiegel verantwortlich sein. Auch eine verstärkte Aktivität oder Biosynthese der Arginase erhöht die Konkurrenz um das natürliche Substrat L-Arginin und kann bei normaler NOS-Aktivität für eine erniedrigte NO-Synthese verantwortlich sein. Oxidativer Stress ist eine weitere Ursache niedriger NO-Spiegel, da vorhandenes Stickstoffmonoxid durch die Bildung von Peroxynitrit vermehrt abgebaut wird.¹¹¹

Dies sind nur wenige Beispiele dafür, dass die Ursachen für ein NO-Defizit sehr vielfältig sein können, was die Modulation der NO-Verfügbarkeit aus pharmazeutischer Sicht sehr komplex macht.

1.3.1.1 NO-Donoren

Die NO-Donoren stellen mit dem prominenten Beispiel des Glyceroltrinitrats (GTN) die wohl älteste bekannte Substanzklasse zur Behandlung von Krankheiten dar, die auf ein NO-Defizit zurückzuführen sind. Diese Stoffklasse ist sehr heterogen und reicht von anorganischen Verbindungen wie dem Nitroprussid-Natrium bis hin zu komplexeren organischen Verbindungen. Bekannt sind neben dem GTN auch die Salpetersäureester Isosorbitdinitrat (ISDN) und Isosorbitmononitrat (ISMN) sowie das heterozyklische Molsidomin (**Abbildung 1-8**). Im allgemeinen Sprachgebrauch werden diese Verbindungen oft als „Nitrate“ bezeichnet, dabei handelt es sich hier um Ester der Salpetersäure und nicht um dessen Salze. Bis auf das Nitroprussid-Natrium, dessen Vertrieb 2013 bis auf weiteres eingestellt wurde, befinden sich alle der genannten Verbindungen noch auf dem Markt. Streng genommen gehört auch NOHA zur Klasse der NO-Donoren und stellt dabei die einzige endogene Verbindung dieser Stoffklasse dar.

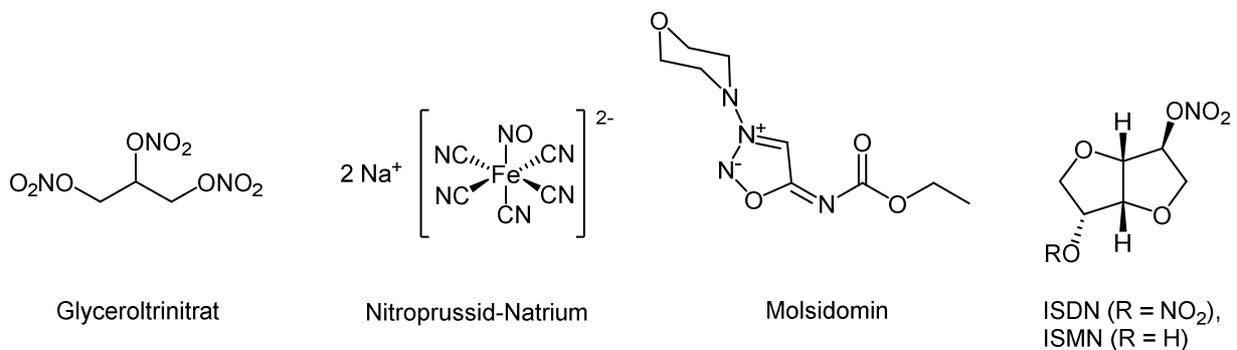


Abbildung 1-8: NO-freisetzende Arzneistoffe verschiedener Stoffklassen. ISDN = Isosorbitdinitrat; ISMN = Isosorbitmononitrat.

Die Mechanismen, durch die das NO schließlich aus den Verbindungen freigesetzt wird, sind sehr unterschiedlich. Zu den unter physiologischen Bedingungen spontan freisetzenden NO-Donoren zählen Nitroprussid-Natrium, die Klasse der Diazeniumdiolate (NONOate), Furoxane und S-Nitrosothiole.^{111,123,124} Im Gegensatz dazu setzen die Salpetersäureester und Molsidomin Stickstoffmonoxid erst nach enzymatischer Bioaktivierung frei. Das Prodrug Molsidomin wird durch Esterasen zunächst zu der freien Carbaminsäure umgesetzt, die allerdings sofort unter CO₂-Abspaltung zerfällt und so den Metaboliten Linsidomin (SIN-1) freisetzt. Die NO-Freisetzung aus Linsidomin erfolgt nicht-enzymatisch in einer zweistufigen Reaktion, indem zunächst eine hydrolytische Öffnung des 1,2,3-Oxadiazolrings zu dem instabilen Metaboliten SIN-1A stattfindet, aus dem anschließend unter Beteiligung von Sauerstoff NO freigesetzt wird.¹²⁵ Für die Bioaktivierung der organischen Nitrate werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die substanz- und dosisabhängig von der mitochondrialen Aldehyd-Dehydrogenase 2 und mitochondrialen Reduktasen oder Cytochrom P450 Enzymen im glatten Endoplasmatischen Reticulum katalysiert werden.^{111,126–128} Problematisch ist allerdings, dass sowohl bei der Bioaktivierung von Molsidomin als auch bei den Salpetersäureestern neben NO auch Superoxidradikalanionen (O₂^{•-}) entstehen, welche mit dem gebildeten NO das hochreaktive Peroxynitrit (ONOO⁻) bilden. Das alleine führt bereits zur Senkung des NO-Spiegels. Zusätzlich werden durch das Peroxynitrit die an der

Bioaktivierung beteiligten Enzyme oder deren Cofaktoren inaktiviert. So kommt es bei der Behandlung mit organischen Nitraten sehr schnell zu einer Nitrattoleranz, was diese Verbindungen für die Dauertherapie limitiert.^{126,127} Auch andere ernstzunehmende Nebenwirkungen wie der Nitratkopfschmerz, der besonders zu Therapiebeginn auftritt, oder der *Flush* sind auf die organischen Nitrate zurückzuführen.

1.3.1.2 L-Arginin und alternative NOS-Substrate

In den letzten Jahren ist die Supplementierung von L-Arginin zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen ein kontrovers diskutiertes Thema. In den vorherigen Kapiteln wurde bereits beschrieben, dass die Aminosäure L-Arginin nur zu einem sehr geringen Anteil der Bereitstellung von NO dient und hauptsächlich über andere Stoffwechselwege umgesetzt wird. Das allgemeine Interesse an L-Arginin zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen ist mittlerweile so groß, dass im Jahr 2014 für deutsche Apotheken und Arztpraxen ein Patientenratgeber zu diesem Thema herausgegeben wurde.¹²⁹ Die Studienlage zu dieser Thematik bleibt allerdings umstritten. Paradoxe Weise führte in einigen NO-defizienten Krankheitsbildern eine L-Arginin-Supplementierung zu einer Besserung, obwohl bereits die physiologischen L-Arginin-Spiegel von ca. 100 μM deutlich über den K_m -Werten (2-20 μM) der NOS liegen. Es wird vermutet, dass dieses „L-Arginin-Paradoxon“ eng mit einer erhöhten ADMA-Konzentration zusammenhängt, die zu einer Desensibilisierung der NOS für L-Arginin führt. So könnte eine Erhöhung der L-Arginin-Spiegel durch L-Arginin-Supplementierung in einer gesteigerten NO-Freisetzung resultieren.¹³⁰ In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine tägliche L-Arginin-Gabe von 4-24 g zu einer moderaten aber messbaren Senkung des systolischen (5,4 mm Hg) und diastolischen (2,7 mm Hg) Blutdrucks geführt hat. Interessant erscheint die L-Arginin-Supplementierung bei schwangeren Frauen mit leichter Gestationshypertonie, da bei diesen Patientinnen der Einsatz klassischer Antihypertensiva problematisch ist. Die Effekte waren aber auch hier moderat und lassen den Schluss zu, dass L-Arginin aus pharmakologischer Sicht kein genügend effizientes Mittel zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt.¹³¹

Da die NO-Synthasen eine Enzymklasse mit hoher Substratspezifität darstellen, sind bis heute auch nur wenige alternative NOS-Substrate bekannt. Keine der chemischen Modifikationen an L-Arginin oder NOHA führten allerdings zu höheren Umsetzungsraten als durch die beiden natürlichen Substrate.¹³²

1.3.1.3 Hemmung der Arginase

Da der von der Arginase katalysierte Abbau von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff eine Konkurrenzreaktion zur NOS-katalysierten NO-Synthese darstellt, wäre die Hemmung der Arginase eine weitere pharmakologisch wertvolle Option zur Steigerung der NO-Verfügbarkeit. Im Arbeitskreis CLEMENT konnten bereits einige Inhibitoren der Arginase erfolgreich synthetisiert und *in vitro* getestet werden. Diese Verbindungen wurden in Anlehnung an den natürlichen Hemmstoff der Arginase N^ω -Hydroxy-L-arginin strukturell modifiziert um eine möglichst hohe Affinität und Selektivität gegenüber den anderen Schlüsselenzymen der NO-Regulation zu erzielen.

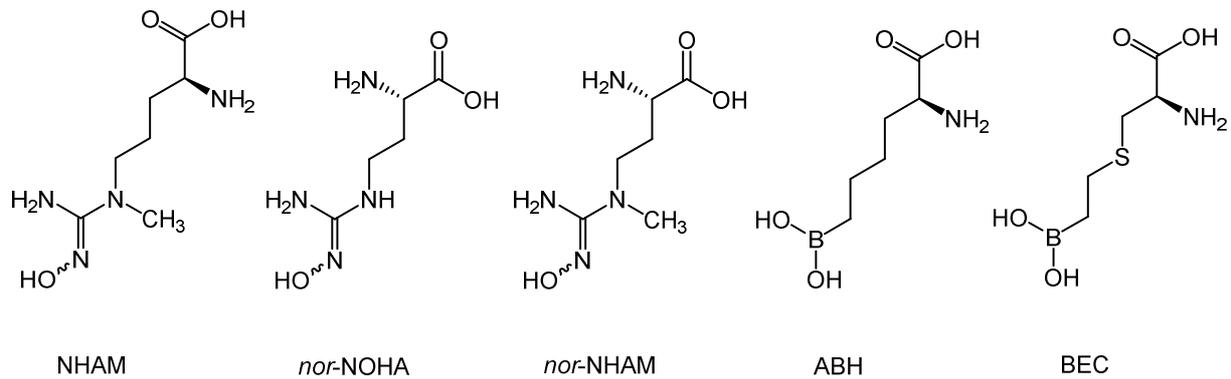


Abbildung 1-9: Strukturformeln der potentesten Arginase-Inhibitoren. NHAM = N^{ω} -Hydroxy- N^{δ} -Methyl-L-arginin;¹³³ ABH = (S)-2-Amino-6-boronoheptansäure;¹³⁴ BEC = (S)-2-Boronoethyl-L-cystein.¹³⁵

In **Abbildung 1-9** sind die bis heute potentesten literaturbekanntesten Arginase-Inhibitoren dargestellt. Während beim NHAM durch Einführung einer N^{δ} -Methylgruppe der K_i -Wert im Vergleich zu NOHA um mehr als die Hälfte gesenkt werden konnte, war diese Strategie nicht auf die um eine Methylengruppe kürzere Verbindungen *nor*-NHAM übertragbar.^{111,119,136} ABH, BEC und *nor*-NOHA stellen mit K_i -Werten von $< 1 \mu\text{M}$ zur Zeit nach wie vor die potentesten Arginase-Inhibitoren dar und wurden z.T. bereits erfolgreich an hypertensiven Ratten und *ex vivo* an Gewebe des *Corpus cavernosum* zur Behandlung der erektilen Dysfunktion angewendet werden.^{135,137} Generell ist eine Hemmung der Arginase allerdings mit ernsthaften Nebenwirkungen verbunden, da dieses Enzym eine zentrale Rolle bei der Detoxifizierung von Ammoniak im Harnstoffzyklus einnimmt. Dennoch wurde erstaunlicherweise in keiner der Untersuchungen von schädlichen Nebenwirkungen berichtet, was darauf zurückzuführen ist, dass die Arginase in der Leber 100-1000 mal stärker exprimiert wird als im Gefäßendothel und eine vollständige Hemmung durch klinisch relevante Dosen eines Hemmstoffs unwahrscheinlich ist.^{111,138}

1.3.1.4 Weitere Strategien

Eine alternative Strategie, bei der indirekt in den NO-Stoffwechsel eingegriffen wird, stellt die Modulation der löslichen Guanylylcyclase (sGC) dar. Das von Bayer entwickelte und im Jahre 2014 von der EMA gegen pulmonale Hypertonie zugelassene Riociguat ist ein Stimulator der sGC (**Abbildung 1-10**). Riociguat soll die insuffiziente NO-sGC-cGMP-Kaskade wiederherstellen, indem es zum einen das Enzym für körpereigenes NO sensibilisiert und zum anderen NO-unabhängig stimuliert.¹³⁹ Im Falle weit fortgeschrittener Krankheitsverläufe ist die sGC durch u.a. reaktive Sauerstoffspezies infolge von oxidativem Stress unempfindlich gegenüber endogenem NO, sodass das Enzym in diesem Zustand direkt aktiviert werden muss.¹⁴⁰ Das ebenfalls von Bayer entwickelte Cinaciguat stellt einen solchen direkten Aktivator der sGC dar und befindet sich momentan in der klinischen Testung.

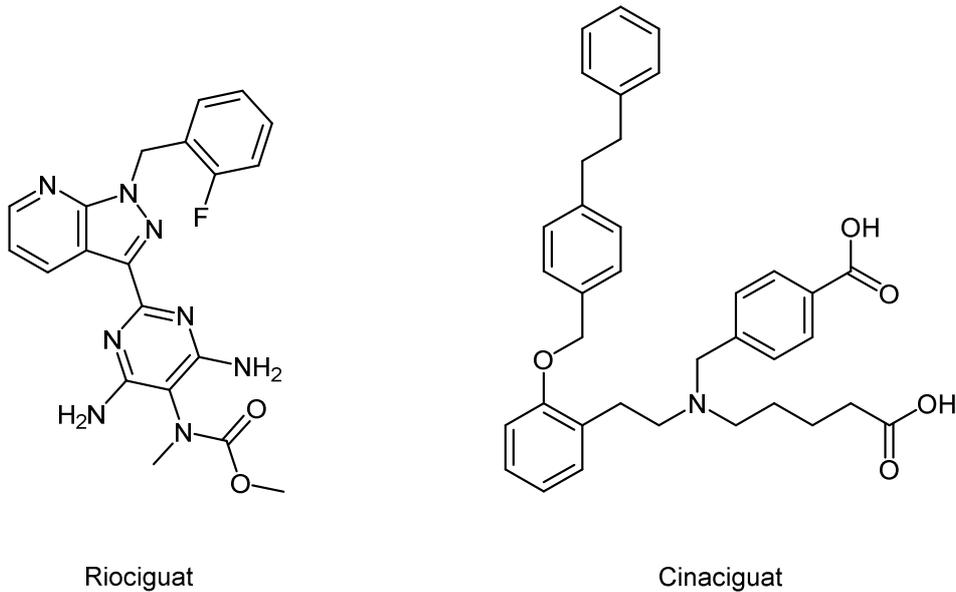


Abbildung 1-10: Strukturen des von der Firma Bayer entwickelten sGC-Stimulators Riociguat (Adempas®) und des sGC-Aktivators Cinaciguat.

Es existieren auch Ansätze, NO-Defizite durch BH_4 -Supplementierung oder Induktoren der NOS zu therapieren. Derartige Transkriptions-*Enhancer* konnten für die eNOS bereits beschrieben werden und stellen in der Zukunft erfolgsversprechende Verbindungen mit einem interessanten pharmakologischen Profil dar.¹¹¹

1.3.2 Pharmakologische Optionen zur Senkung der NO-Verfügbarkeit

Eine häufige Erkrankung, die auf die schädigende Wirkung von NO infolge zu hoher Konzentrationen zurückzuführen ist, stellt die Migräne dar (Kapitel 1.1.3). Auch der septische Schock geht auf ein spontanes Überangebot an NO zurück. Man vermutet ebenfalls, dass der kardiogene Schock auf eine massive NO-vermittelte Vasodilatation durch übermäßige iNOS-Aktivität zurückzuführen ist.¹¹¹ Bei derartigen pathophysiologischen Zuständen ist eine Senkung der zu hohen NO-Spiegel eine therapeutisch sinnvolle Option. Dafür existieren pharmakologische Ansätze, die auf eine direkte Hemmung der NOS abzielen oder die eine indirekte NOS-Hemmung durch die Inhibition der DDAH zum Ziel haben.

Beide Konzepte sollen in den folgenden Kapiteln vorgestellt werden.

1.3.2.1 Hemmung der NO-Synthasen

Da die verschiedenen Isoenzyme der NOS sehr unterschiedliche und wichtige physiologische Funktionen wahrnehmen, sollte eine Inhibition dieses Enzyms auf alle Fälle Isoformen-selektiv sein. Die Entwicklung solcher Hemmstoffe ist aufgrund der hohen Konservierung des katalytischen Zentrums der Isoenzyme eine große Herausforderung. Bekannte Klassen an NOS-Hemmstoffen reichen auf struktureller Ebene von Aminosäureanaloge auf Guanidin- und Amidinbasis über Isothioharnstoffe bis hin zu verschiedenen Heterozyklen. Die Wirkspektren der verschiedenen Inhibitoren sind ebenfalls sehr vielfältig: Neben den

Substratanaloga im aktiven Zentrum des Enzyms existieren auch Dimerisierungs-Hemmstoffe und Hemmstoffe der Cofaktoren.^{141–143}

Obwohl mittlerweile eine Vielzahl verschiedenster Verbindungen entwickelt wurde, hat es keine bis zur Marktreife geschafft. Dafür sind neben der mangelnden Isoformenspezifität auch das schlechte Selektivitätsprofil gegenüber anderen NO-relevanten Enzymen, wie der Arginase oder DDAH verantwortlich. Derweil ist die Entwicklung von NOS-Inhibitoren stark rückläufig und beschränkt sich auf wenige Versuche, iNOS-selektive Verbindungen hervorzubringen.

1.3.2.2 Hemmung der DDAH-1

Eine Hemmung der DDAH stellt eine vielversprechende pharmazeutische Strategie zur indirekten Beeinflussung der NO-Bildung dar, die auf der Steigerung der ADMA- und NMMA-Konzentrationen beruht. Die Problematik der direkten NOS-Hemmung besteht in einer potentiellen NO-Blockade mit verheerenden Nebenwirkungen. Untersuchungen zur DDAH-Hemmung haben gezeigt, dass durch die endogenen NOS-Inhibitoren ADMA und NMMA eine maximale NOS-Hemmung von etwa 30 % ausgeht.¹⁴³

Durch intensive Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen sind in den letzten Jahren vier potente DDAH-Inhibitoren entwickelt worden, davon zwei mit Amidinstruktur (V-NIO und Cl-NIO) und zwei L-Argininderivate (L-257 und AbMEG). Der 2014 von WANG *et al.* entwickelte irreversible Inhibitor Cl-NIO stellt den derzeit potentesten Hemmstoff der DDAH dar ($K_i = 1,3 \pm 0,6$), der allerdings ähnlich wie das V-NIO im Vergleich zu L-257 und AbMEG ein schlechteres Selektivitätsprofil gegenüber NOS und Arginase aufweist (**Abbildung 1-11**).^{144,145} Der im Arbeitskreis entwickelte Inhibitor AbMEG stellt den bisher selektivsten Hemmstoff dar, dessen gleichzeitig sehr gute Wirksamkeit *in vitro* belegt werden konnte (Kapitel 6).¹⁴⁶ Eine Isoformenselektivität für die hDDAH-1 konnte bisher nur für das L-257 gezeigt werden,¹⁴⁷ sollte im Rahmen dieser Arbeit aber auch für AbMEG genauer untersucht werden (Kapitel 6.6).

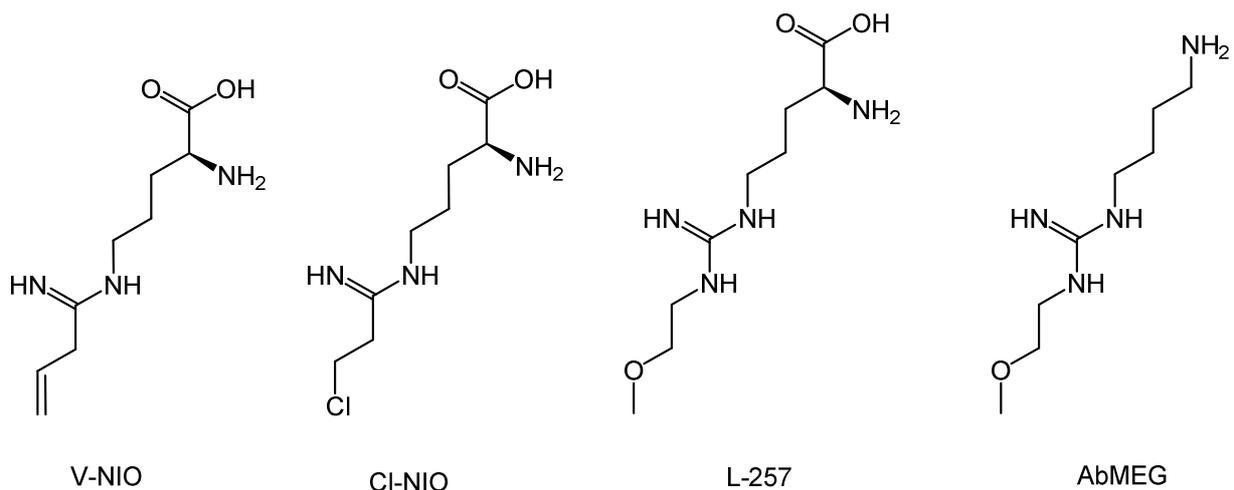


Abbildung 1-11: Strukturformeln der vier potentesten DDAH-Inhibitoren. V-NIO = N^5 -(1-Iminobut-3-enyl)-L-ornithin;¹⁴⁵ Cl-NIO = N^5 -(1-Imino-2-chlorethyl)-L-ornithin;¹⁴⁴ L-257 = N^{ω} -(2-Methoxyethyl)-L-arginin;¹⁴⁵ AbMEG = N -(4-Aminobutyl)- N' -(2-methoxyethyl)guanidin.¹⁴⁶

Bisher wurde noch kein DDAH-Hemmstoff als Arzneistoff zugelassen. Das könnte zum einen daran liegen, dass der Fokus derzeit auf der Entwicklung von Substanzen zur Steigerung der NO-Verfügbarkeit liegt, da mehr Erkrankungen auf NO-Defizite zurückzuführen sind, als auch an den bisher wenigen *in vivo*-Daten. Dennoch bleibt eine DDAH-Hemmung bei der Therapie der Migräne und des septischen Schocks eine sinnvolle pharmakologische Option.

1.3.3 Prodrugs

1.3.3.1 Definition

Prodrugs sind gemäß der IUPAC-Definition Verbindungen, die vor Ausübung ihrer pharmakologischen Funktion bioaktiviert werden müssen.¹⁴⁸ Die Entwicklung von Prodrugs ermöglicht es, den Arzneistoffcharakter einer Verbindung durch Optimierung seiner physikochemischen, pharmakokinetischen und/oder pharmakodynamischen Eigenschaften zu verbessern.

Es handelt sich also um biologisch inaktive Vorstufen von Arzneistoffen, die im Körper enzymatisch oder nicht-enzymatisch in ihre Wirkform überführt werden. Die Notwendigkeit, einen Arzneistoff als Prodrug zu formulieren, kann aus verschiedenen Gründen gegeben sein, besonders wenn die Verbesserung des pharmakokinetischen Profils im Vordergrund steht. Oft ist das Ziel, eine Steigerung der oralen Bioverfügbarkeit und/oder chemischen und metabolischen Stabilität zu erreichen. Prodrugs können aber auch bei Wirkstoffen mit sehr unangenehmen Geruch oder Geschmack sinnvoll sein. Durch Prodrugstrategien lassen sich auch bestimmte Transportmechanismen adressieren, um einen Arzneistoff an einen speziellen Wirkort zu bringen, wie es das prominente Beispiel Levodopa (L-DOPA) zeigt. Solange die Aminosäurefunktion erhalten ist, kann das L-DOPA über Aminosäuretransporter Barrieren wie die Blut-Hirn-Schranke überwinden und wird erst im ZNS durch Decarboxylasen aktiviert. Auch die in dieser Arbeit dargestellten neuen NOHA-Prodrugs sollen über Zucker- oder Aminosäuretransporter in die Zellen aufgenommen werden.¹⁴⁹ Eine Technik, Prodrugs Metabolismus-unabhängig in speziellen Geweben zu aktivieren, ist die Photoaktivierung mit UV-Licht. Solche Verfahren werden auch bei der Abspaltung photolabiler Schutzgruppen angewendet.

Bekannte Arzneistoffe, die als Prodrugs vorliegen, sind z.B. Aciclovir, Omeprazol, Metamizol, Dabigatran, Tenofovir und das bereits zuvor beschriebene Molsidomin. Häufig handelt es sich bei diesen Verbindungen um Carbonsäure- oder Carbaminsäureester (Carbamate), die durch Esterasen aktiviert werden.¹⁴⁹

1.3.3.2 Prodrugstrategien für *N*^ω-Hydroxy-L-arginin

Heutzutage existieren einige Beispiele für NO-freisetzende Prodrugs, wie z. B. Molsidomin, dessen Carbamatstruktur durch Esterasen zum aktiven Metaboliten Linsidomin gespalten wird. Die organischen Nitrate stellen streng genommen auch Prodrugs dar, da die NO-Freisetzung aus ihnen Metabolismus-abhängig ist. Auch die Diazeniumdiolate werden aufgrund ihrer mangelnden Stabilität und um eine gezieltere NO-Freisetzung zu erreichen als Prodrugs formuliert.¹⁵⁰

Neben der Tatsache, dass NOHA das beste bekannte Substrat der NOS darstellt, setzt es NO genau dort frei, wo es benötigt wird, da die NO-Freisetzung ausschließlich NOS-katalysiert abläuft. Dadurch unterscheidet sich dieser NO-Donor von anderen Verbindungen wie den Nitraten oder Molsidomin. Auch

eine Toleranzentwicklung ist im Gegensatz zu den Nitraten nicht zu erwarten. Problematisch bleibt aber NOHAs ungünstiger Arzneistoffcharakter, der bereits unter Kapitel 1.2.5 beschrieben wurde. Um NOHA zu einem potentiellen Arzneistoff zu machen, muss diese Verbindung in ein Prodrug überführt werden. SCHADE *et al.* haben dazu bereits umfangreiche Untersuchungen durchgeführt. Dabei stand besonders die Stabilisierung der N^{ω} -Hydroxyguanidinfunktion im Vordergrund. Dazu sind in **Abbildung 1-12** einige Derivatisierungsmöglichkeiten dargestellt.

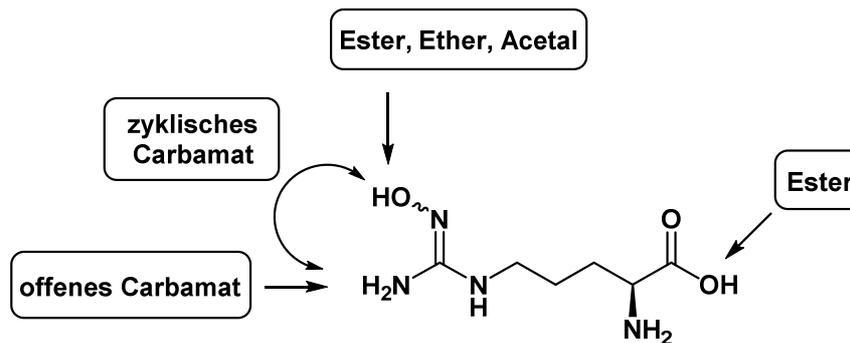


Abbildung 1-12: Übersicht über verschiedene Derivatisierungsoptionen für NOHA nach SCHADE.¹⁰⁵

Es stellte sich heraus, dass durch verschiedene *O*-Alkylierungen oder das Überführen des N^{ω} -Hydroxy-Sauerstoffs in ein glycosidisches Acetal eine deutliche Steigerung der hydrolytischen und oxidativen Stabilität erreicht werden konnte. So konnte belegt werden, dass eine *O*-Methylierung und *O*-Carboxymethylierung die Stabilität in alkalischer Lösung (pH 9,0) und gegenüber reaktiver Sauerstoffspezies wie Peroxynitrit drastisch steigern konnte, da unsubstituiertes NOHA unter diesen Bedingungen praktisch nicht mehr nachweisbar war. *O*-Glycosidische NOHA-Prodrugs führten zu den gleichen Ergebnissen. Zusätzlich sollte das Guanidin ähnlich wie die Amidfunktion des Dabigatranetexilats (Pradaxa®) in eine Carbamatstruktur eingebaut werden. Diese Modifikation zielte neben der Stabilisierung der N^{ω} -Hydroxy-guanidinfunktion besonders auf eine Steigerung der oralen Bioverfügbarkeit ab.¹⁰⁵

Weitere Untersuchungen im Arbeitskreis zeigten, dass alle *O*-substituierten Prodrugs über verschiedene enzymatische Mechanismen aktiviert wurden, mit Ausnahme der N^{ω} -Carbamate (Kapitel 3.2.1). Während Amidincarbamate über Esterasen bioaktiviert werden können, war in *in vitro* Experimenten bei den Guanidincarbamaten des NOHA keine Carbamatspaltung durch Esterasen zu beobachten.¹⁵¹ So konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Carbamatstrukturen, in denen der Stickstoff Teil eines Guanidins ist, außerordentlich stabile Verbindungen darstellten. BRENNAUER und MATSUMOTO haben die Stabilität verschiedener Guanidine untersucht, bei denen ein Stickstoffatom Teil einer Amid- oder Carbamatstruktur ist. Dabei konnten sehr unterschiedliche Zersetzungsraten der Verbindungen in einem alkalischen Puffer bei pH 10,4 und 25 °C beobachtet werden. Es stellte sich heraus, dass Amide, die ein primäres Amin an der ω -Position der Alkylseitenkette aufwiesen, schneller degradiert wurden als analoge Carbamate. Eine mögliche Ursache dafür war eine intramolekulare Zyklisierung der Seitenkette zu Lactamen, Imidazolonen oder zyklischen Carbamaten. Bei Carbamaten mit einer reinen Alkylseitenkette waren keine intramolekularen Ringschlüsse möglich und so wurde in den meisten Fällen keine Reaktion unter denselben Bedingungen beobachtet. Auch bei einfachem Acetylguanidin fand eine

deutlich verlangsamte Zersetzung statt ($t_{1/2} = 10$ h). Daraus wurde geschlussfolgert, dass Guanidine mit Carbamatstruktur generell stabiler gegenüber basischer Hydrolyse waren als analoge Guanidine mit Amidstruktur. Intramolekulare Effekte wie Zyklisierung beschleunigen die Degradation erheblich. Es konnte zudem gezeigt werden, dass auch Guanidine mit rein aliphatischer Amidstruktur eine deutlich höhere Halbwertszeit bei pH 10,4 aufwiesen als alle mit einem terminalen nukleophilen Heteroatom in der Amid-Seitenkette.^{152,153}

Diese Untersuchungen untermauern die Ergebnisse von SCHADE *et al.*, dass alle NOHA-Prodrugs mit Carbamatstruktur stabilitätsbedingt *in vitro* durch Carboxylesterasen nicht bioaktiviert werden konnten. Auch die in Kapitel 3.2.3 beschriebene Problematik bei der Abspaltung der Ethylcarbammat-Schutzgruppe (Eoc) könnte ebenfalls auf diese hohe Stabilität zurückzuführen sein. Die Frage, ob die hohe Stabilität durch mesomere Effekte zu erklären ist oder die hohe Elektronendichte am Guanidin möglicherweise die Elektrophilie des Carbamatkohlenstoffs herabsetzt, ist nicht geklärt.

O-acylierte Prodrugs oder Derivate mit einer zyklischen Carbamatstruktur aus N^{ω} -Stickstoff und N^{ω} -Hydroxy-Sauerstoff waren synthetisch nicht zugänglich.¹⁰⁵

Eine zusätzliche Prodrugstrategie für NOHA besteht in der Veresterung der α -Carboxylgruppe, die vor allem auf die Steigerung der Lipophilie abzielt und dadurch besonders passive Transportmechanismen durch Diffusion adressiert. Durch diese Modifikation wird allerdings der Transport über Aminosäuretransporter limitiert.

1.3.4 Stand der Technik

Die Entwicklung neuer NO-modulierender Arzneistoffe zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen ist nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung. Verbindungen, die auf verschiedenste Weise in die Regulation des NO-Stoffwechsels eingreifen, um die NO-Verfügbarkeit zu steigern oder zu senken, bleiben ein wertvolles und erfolgversprechendes pharmazeutisches Konzept. Das bereits erwähnte Riuciguat der Firma Bayer als erster zugelassener Stimulator der löslichen Guanylylcyclase zeigt, dass neben bewährten Strategien auch neue Targets in den Blickpunkt pharmazeutischen Interesses rücken. Auch die klassischen NO-Donoren wie ISDN, ISMN, GTN, Molsidomin und das Pentaerithryltetranitrat (PETN) sind heutzutage trotz des Risikos einer Toleranzentwicklung häufig verschriebene Arzneimittel zur Behandlung NO-defizitärer Krankheiten wie beispielsweise die koronare Herzkrankheit mit *Angina pectoris* und Atherosklerose. Generell stellt die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen auch aus finanzieller Sicht ein attraktives Ziel zukünftiger Forschung dar, da im Jahr 2011 Angiotensinhemmstoffe den ersten und Betarezeptorenblocker den dritten Platz der verordnungstärksten Indikationsgruppen in der GKV darstellten.¹⁵⁴

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Prodrugs von NOHA avisieren besonders die chronische Anwendung zur Prophylaxe und/oder Therapie von Erkrankungen, die mit endothelialer Dysfunktion assoziiert sind. Die Notwendigkeit eines Prodrugkonzeptes für die Realisierung dieser therapeutischen Strategie wurde bereits im vorherigen Kapitel 1.3.3.2 zum Ausdruck gebracht. Die Idee, dabei Monosaccharide als Prodruggruppen einzusetzen, ist bereits an anderen Verbindungen erfolgreich gezeigt worden. In neueren Untersuchungen werden diese Prodruggruppen besonders bei den instabilen

Diazeniumdiolaten eingesetzt, die zur Klasse der spontan freisetzenden NO-Donoren gehören (**Abbildung 1-13**).^{150,155}

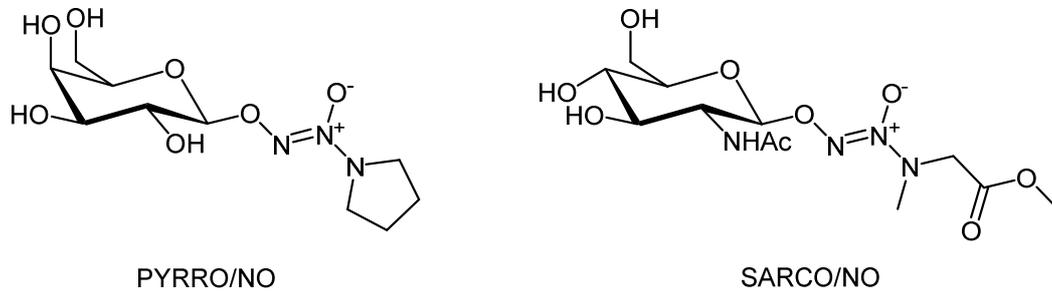


Abbildung 1-13: Strukturen literaturbekannter NO-freisetzender Monosaccharid-Prodrugs.^{150,155}

Wu *et al.* konnten zeigen, dass das β -Galactosekonjugat PYRRO/NO im Vergleich zu analogen Glucose- und Mannosekonjugaten am besten enzymatisch aktiviert wurde und deutlich stabiler war als das Aglycon.¹⁵⁵ In weiteren Untersuchungen wurde ein Diazeniumdiolat-Prodrug auf der Basis von *N*-Acetylglucosamin und Sarkosinmethylester entwickelt, welches von der *N*-Acetylglucosaminidase erfolgreich aktiviert wurde. Der Vorteil von SARCO/NO bestand darin, dass beide Prodruggruppen aus toxikologischer Sicht unkritisch zu bewerten waren.¹⁵⁰

Aus den Erkenntnissen von SCHADE und anderen Arbeitsgruppen konnte abgeleitet werden, dass das Konzept glycosidischer Prodrugs eine erfolgversprechende pharmazeutische Strategie für die Entwicklung neuer NO-freisetzender Prodrugs darstellte.

2 ZIELSETZUNG

2.1 Synthese von enantiomerenreinem N^δ -Methyl-L-arginin und N^δ -Methyl-L-ornithin

Die (patho)physiologische Bedeutung N^ω -methylierter Arginine wie NMMA und ADMA sind heutzutage gut untersucht. Jüngste Arbeiten lieferten den Beweis, dass das bisher nur in Hefen nachgewiesene N^δ -Methyl-L-arginin erstmals auch im Menschen detektiert werden konnte, obgleich dessen biologische Funktion im Organismus noch unbekannt ist.⁷³ Durch diese Entdeckung wurde der Grundstein zukünftiger Forschungsarbeiten zu der biologischen Funktion dieser Verbindung gelegt, die auf die Verfügbarkeit des natürlich vorkommenden L-Enantiomers angewiesen sein werden.

In der Literatur wurden bereits Synthesestrategien für die Darstellung von N^δ -Methyl-L-arginin beschrieben, die aber bisher nur die racemische Aminosäure lieferten. SCHADE *et al.* konnten unter Optimierung verschiedener Reaktionsbedingungen eine Synthese entwickeln, die N^δ -Methyl-L-arginin in einer optischen Reinheit von über 98 % *ee* zugänglich machte. Das Risiko einer Racemisierung des optisch reinen Ausgangsmaterials war aber auch bei diesem neuen Ansatz durch das weiterhin Tosyl-basierte Schutzgruppenkonzept nach wie vor sehr hoch.^{133,156,157}

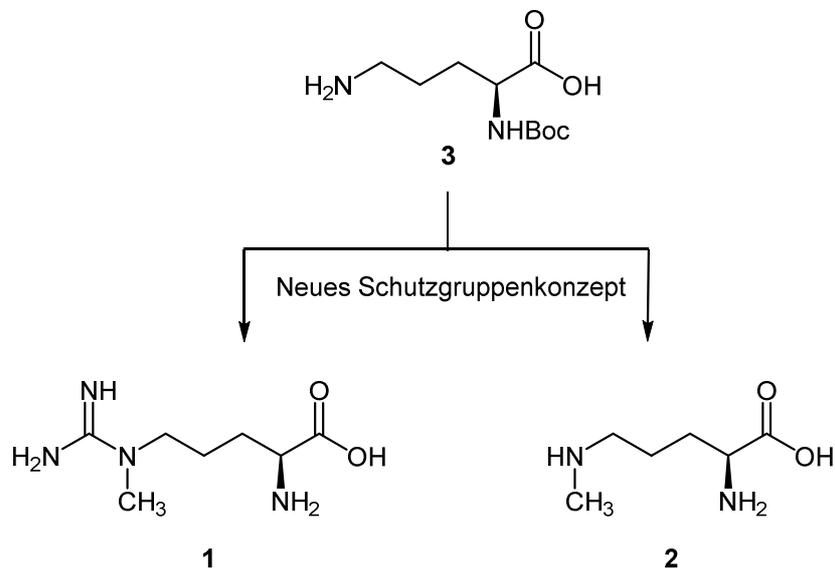


Abbildung 2-1: Zielsetzung zur Darstellung von enantiomerenreinem N^δ -Methyl-L-arginin und -ornithin.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch Optimierung des Schutzgruppenkonzeptes eine Synthese entwickelt werden, die ausgehend von dem geschützten L-Ornithin **3** sowohl das N^δ -Methyl-L-arginin **1** als auch dessen potentiellen Metaboliten N^δ -Methyl-L-ornithin **2** in enantiomerenreiner Form zugänglich machte (**Abbildung 2-1**). Daher war auch die Entwicklung einer chromatografischen Analytik, mit der ein

valider Nachweis für die hohe optische Reinheit erbracht werden konnte, von zentraler Bedeutung, da klassische chiroptische Methoden wie die Polarimetrie keine Informationen darüber liefern, in welchem Verhältnis zwei Enantiomere zueinander vorliegen.

2.2 Entwicklung acetalischer Prodrugs des N^{ω} -Hydroxy-L-arginins

Bisher konnte noch kein Substrat der NOS identifiziert werden, aus dem eine höhere NO-Freisetzung erzielt wurde als aus N^{ω} -Hydroxy-L-arginin. Darüber hinaus stellt NOHA einen potenten Hemmstoff der Arginase dar und könnte durch diesen dualen und selektiven Wirkmechanismus ein vielversprechender Arzneistoffkandidat zur Steigerung der NO-Verfügbarkeit für die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen werden. Der schlechte Arzneistoffcharakter von NOHA hinsichtlich hydrolytischer und metabolischer Stabilität macht allerdings einen direkten therapeutischen Einsatz, vor allem zur peroralen Applikation, unmöglich.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Strategien entwickelt werden, um NOHAs mangelnde Arzneistoffqualitäten zu verbessern. Von SCHADE und KOTTHAUS konnten in früheren Arbeiten chemische Derivatisierungen an NOHA beschrieben werden, die sowohl die hydrolytische als auch die metabolische Stabilität erhöhten. Dabei stand vor allem die *N*- und *O*-Substitution der *N*-Hydroxyguanidinfunktion im Vordergrund. Durch einfache *O*-Alkylierungen konnten stabile Prodrugs dargestellt werden, deren pharmakologisches Profil allerdings durch die CYP-abhängige Bioaktivierung und dem damit verbundenen Interaktionspotential deutlich eingeschränkt wurde. Durch die Entwicklung eines *O*-acetalischen Prodrugs durch Konjugation mit Galactose konnte ein ebenfalls stabiles und CYP-unabhängiges Prodrug synthetisch zugänglich gemacht werden. Die biologische Evaluierung dieser Prodrugstrategie zeigte an einer einfachen Modellverbindung, dass der Zuckerrest Galactosidase-katalysiert abgespalten werden konnte, die Bioaktivierung der N^{ω} -Carbamate durch Esterasen in *in vitro* Ansätzen allerdings nicht gelang.^{105,151}

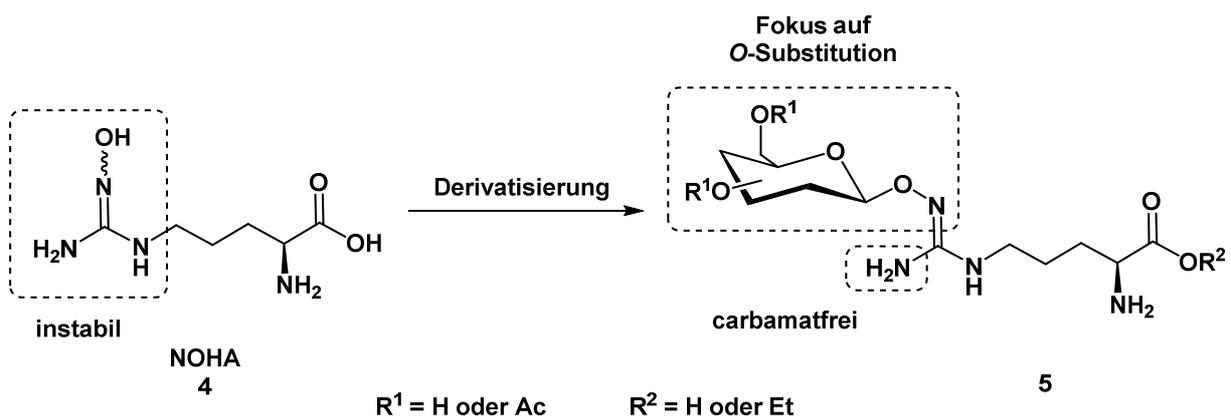


Abbildung 2-2: Übersicht über das neue Prodrugkonzept für N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA).

Zuckerkonjugate von NOHA stellen besonders aus pharmakokinetischer Sicht hochinteressante Verbindungen dar, da sie nicht-toxische Abgangsgruppen liefern, über Zucker- oder

Aminosäuretransporter resorbiert und Glycosidase-abhängig bioaktiviert werden können. Durch Verbindungen mit höherem Substitutionsgrad (z.B. Ester) werden im Gegensatz dazu vorwiegend passive Transportmechanismen angesteuert.

Aus den bisherigen Erkenntnissen über NOHA-Prodrugs sollte in dieser Arbeit der Fokus auf *O*-acetalische und zugleich carbamatfreie Derivate gelegt werden. Dazu sollte für spätere biologische Untersuchungen eine Serie unterschiedlich substituierter *O*-Galactosyl- und *O*-Glucosyl-Prodrugs synthetisiert werden, die über keine *N*^ω-Carbamatstruktur verfügten und an der α -Carboxylgruppe optional verestert vorlagen (**Abbildung 2-2**). Dazu musste aus synthetischer Sicht zunächst ein komplett neuartiges orthogonales Schutzgruppenkonzept erarbeitet werden, das kompatibel mit NOHAs anspruchsvollem Stabilitätsprofil war. Dieses Schutzgruppenkonzept sollte anfänglich an einfachen Modellverbindungen etabliert werden, um danach auf die Darstellung verschiedener NOHA-Prodrugs übertragen zu werden.

Um die breite Einsatzfähigkeit des neuen Synthesewegs zu testen, sollte ebenfalls ein NOHA-Prodrug mit einer offenen, nicht Monosaccharid-basierten *O*-Acetalstruktur dargestellt werden.

2.3 Herstellung, Reinigung und Kristallisation der humanen DDAH-1

Die Entwicklung neuer Inhibitoren der hDDAH-1 ist im Arbeitskreis CLEMENT Gegenstand langjähriger Forschung. Diese intensiven Untersuchungen brachten eine Vielzahl unterschiedlichster Amidin- und Guanidin-basierter Verbindungen hervor, die wertvolle Erkenntnisse über die Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen dem Enzym und den Hemmstoffen lieferten. Dabei gelangten verschiedene Leitstrukturen in den Vordergrund, die trotz erheblicher struktureller Unterschiede alle wirksame hDDAH-1-Inhibitoren darstellten und gleichzeitig verschiedene Selektivitätsprofile gegenüber Arginase und NOSs aufzeigten (**Abbildung 2-3**).

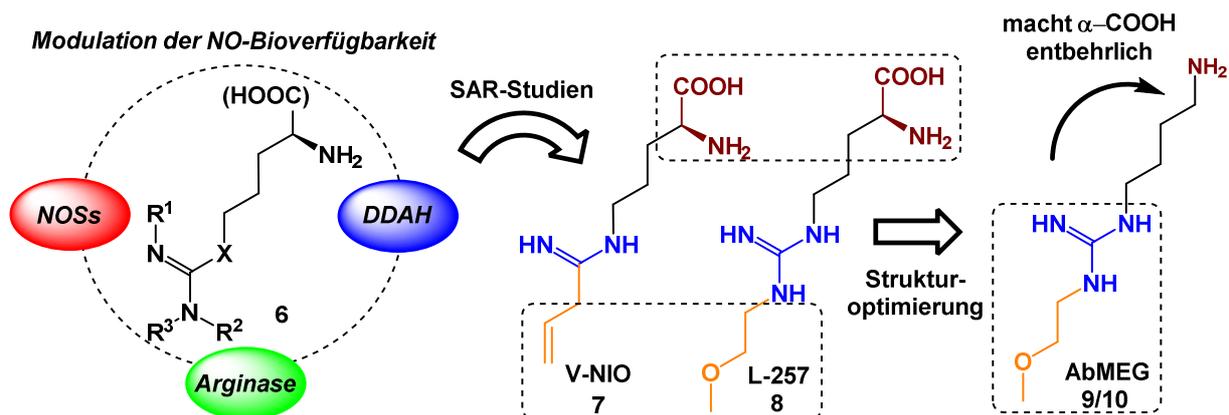


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der komplexen Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen den Schlüsselenzymen der NO-Regulation und den Leitstrukturen verschiedener Modulatoren. SAR = Struktur-Wirkungsbeziehungen

Zum besseren Verständnis dieser komplexen Zusammenhänge sollte im Rahmen dieser Arbeit die humane DDAH-1 mit und ohne den bis heute wirksamsten und zugleich selektivsten Hemmstoff AbMEG (co)kristallisiert werden. Die Kristallstrukturen sollten letztendlich Aufschluss darüber geben, welche der strukturellen Merkmale des AbMEGs für die Potenz und Selektivität verantwortlich sind. Dazu musste zunächst eine ausreichende Menge des Proteins rekombinant hergestellt werden. Anders als die bisherigen im Arbeitskreis etablierten Methoden zur rekombinanten Herstellung der hDDAH-1 in kleineren Schüttelkulturen, sollte in dieser Arbeit ein Verfahren zur Großherstellung des Proteins in einem Fermenter entwickelt werden, das die für die Kristallisationsscreenings benötigte Menge von mindestens 10 mg hochreinen Proteins liefern konnte. Kristallisationsuntersuchungen stellen höchste Ansprüche an die Reinheit von Proteinen. Um diesem Erfordernis nachzukommen, mussten Methoden entwickelt werden, mit denen das rekombinant gewonnene Protein anschließend über verschiedene, hintereinandergeschaltete chromatografische Verfahren gereinigt werden konnte. Auf Seite des Inhibitors sollte AbMEG in verschiedene Salzformen überführt werden, um deren Einfluss auf die Cokristallisation mit der hDDAH-1 zu analysieren. Die (Co)Kristallisationsuntersuchungen sollten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von SCHADE und VETTER an der Technischen Universität in Dortmund sowie dem Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund durchgeführt werden.

3 SYNTHESSEN

3.1 Synthese von enantiomerenreinem N^δ -Methyl-L-arginin und N^δ -Methyl-L-ornithin

3.1.1 Einleitung

Die (patho)physiologische Bedeutung von N^δ -methylierten Argininderivaten ist schon lange Gegenstand unserer Untersuchungen.¹¹⁹ Bis heute ist aber die Funktion der posttranslationalen N^δ -Methylierung von Argininresten in Lebewesen noch weitestgehend unbekannt. N^δ -Methylarginin und -ornithin konnten in der Vergangenheit bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen erfolgreich synthetisiert werden.^{133,156–158} Die optische Reinheit der Verbindungen wurde in diesen Arbeiten nicht untersucht oder war von geringfügiger Bedeutung. Bisher wurde nur von SCHADE *et al.* eine Synthese für N^δ -methylierte Argininderivate beschrieben, die Produkte mit nachweislich hoher Enantiomerenreinheit lieferte. Diese Synthesestrategie sollte im Rahmen dieser Arbeit optimiert werden.¹³³

3.1.2 Synthesestrategien

Die synthetische Herausforderung bei der Darstellung von N^δ -Methyl-L-arginin **1** und -ornithin **2** (**Abbildung 3-1**) bestand in der selektiven Methylierung der N^δ -Position. Während N^ω -alkylierte Argininderivate durch die Umsetzung von Thiocitrullinen mit einem entsprechenden Alkylamin aufgebaut werden konnten, musste die Methylgruppe bei **1** bereits vor dem Aufbau der Guanidinfunktion eingeführt werden.¹⁵⁹

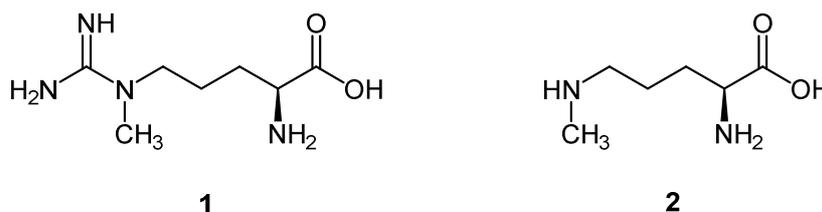


Abbildung 3-1: Strukturen des N^δ -Methyl-L-arginin **1** und -ornithin **2**, die im Rahmen dieser Arbeit in enantiomerenreiner Form synthetisiert wurden.

Es wurden bereits einige Versuche im Arbeitskreis unternommen, einen gemeinsamen Syntheseweg für die beiden Aminosäuren **1** und **2** zu entwickeln. SCHADE *et al.* konnten bereits eine Synthese beschreiben, die beide Verbindungen in hoher optischer Reinheit von > 98 % *ee* lieferte (**Abbildung 3-2**).^{133,146} Dabei wurde in einer fünfstufigen Synthese zunächst ausgehend von L-Ornithin **11** das N^δ -Methyl-L-ornithin **2** dargestellt. Dazu musste **11** zunächst in einen Kupferkomplex überführt werden, um die Seitenkette selektiv tosylieren zu können. Durch eine zusätzliche Benzoyl-Schutzgruppe an der α -Aminogruppe, konnte die N^δ -Position von **12** anschließend selektiv methyliert werden, was zu Verbindung **13** führte.

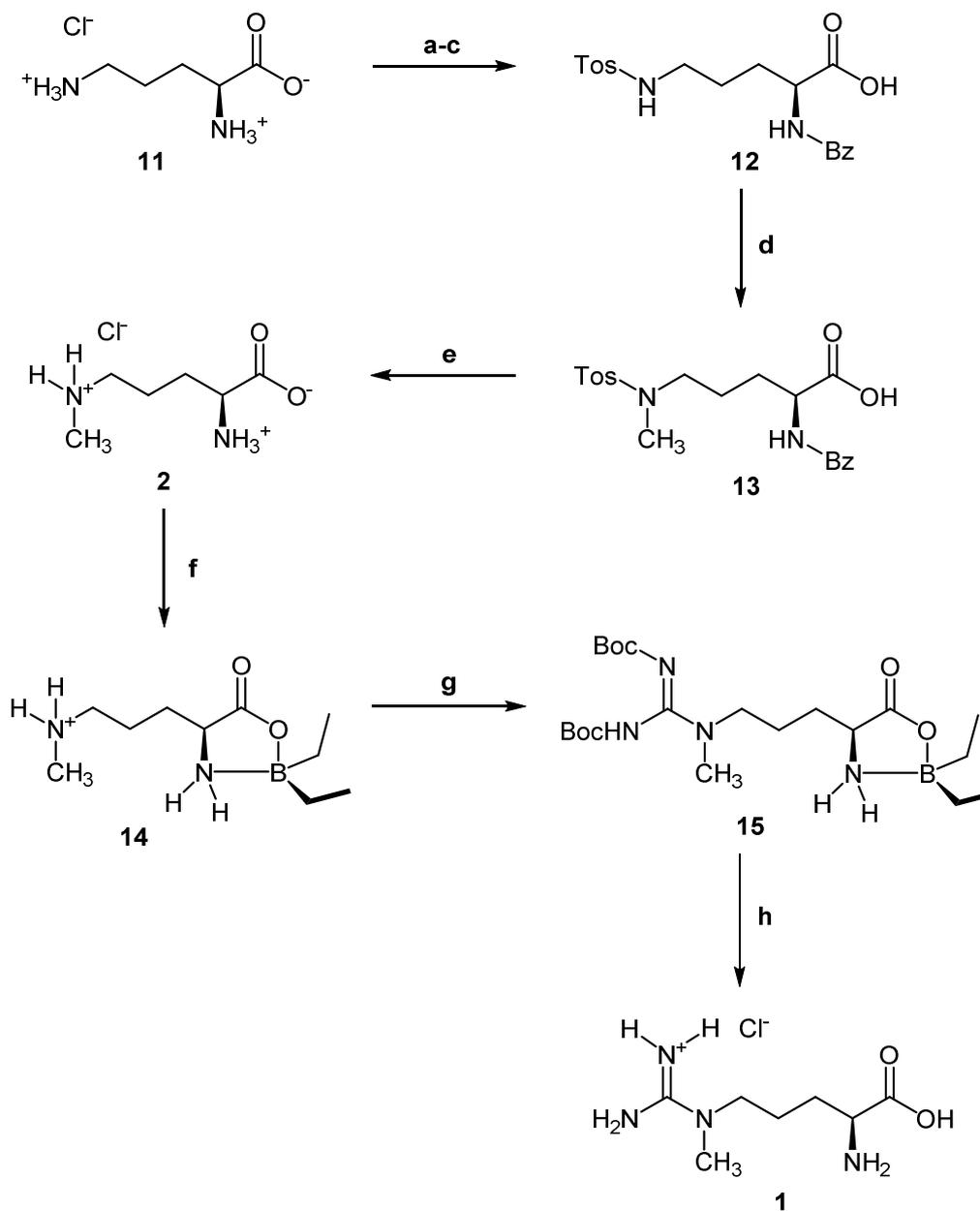


Abbildung 3-2: Synthese von *N*^δ-Methyl-L-arginin **1** und -ornithin **2** nach SCHADE *et al.*^{133,146} a) basisches CuCO₃; b) Tosylchlorid in Et₂O, 2 N NaOH 71 % für beide Schritte; c) Benzoylchlorid, 2 N NaOH, 79 %; d) Dimethylsulfat, NaOH, 90 %; e) HBr (47 % in Eisessig), 1,5 h Rückfluss, 85 %; f) Triethylboran in DME, 72 h Rückfluss, 89 %; g) *N,N'*-Bis(*tert*-butyloxycarbonyl)thioharnstoff **16**, TEA, HgCl₂ in DMF, 37-41 %; h) 1. 1,5 N HCl, 1 h 100 °C, 2. TFA, 1 h RT, 85 %.

Die Deprotektion von **13** war in der gesamten Synthesesequenz aufgrund der möglichen Racemisierung von **2** der kritischste Schritt. Die Abspaltung der Tosyl-Schutzgruppe mit Bromwasserstoff in Eisessig wurde bereits von LUZZI und MALETTA beschrieben, ohne die bei diesen Reaktionsbedingungen unvermeidbare Racemisierung zu untersuchen.¹⁵⁷ Der Mechanismus einer säurekatalysierten Racemisierung am Kohlenstoff in α -Position ist durch Protonierung des Carboxylsauerstoffs zu erklären. Das dabei entstehende ionische Intermediat bildet durch Protonenabspaltung am α -Kohlenstoffatom ein

Enol **18**, an dessen Doppelbindung wiederum ein Proton addiert werden kann. Diese Addition kann von beiden Seiten erfolgen, sodass sich aus der Rückreaktion dieser Gleichgewichtsreaktion sowohl die L- als auch die D-Form bilden kann (**Abbildung 3-3**).^{160,161}

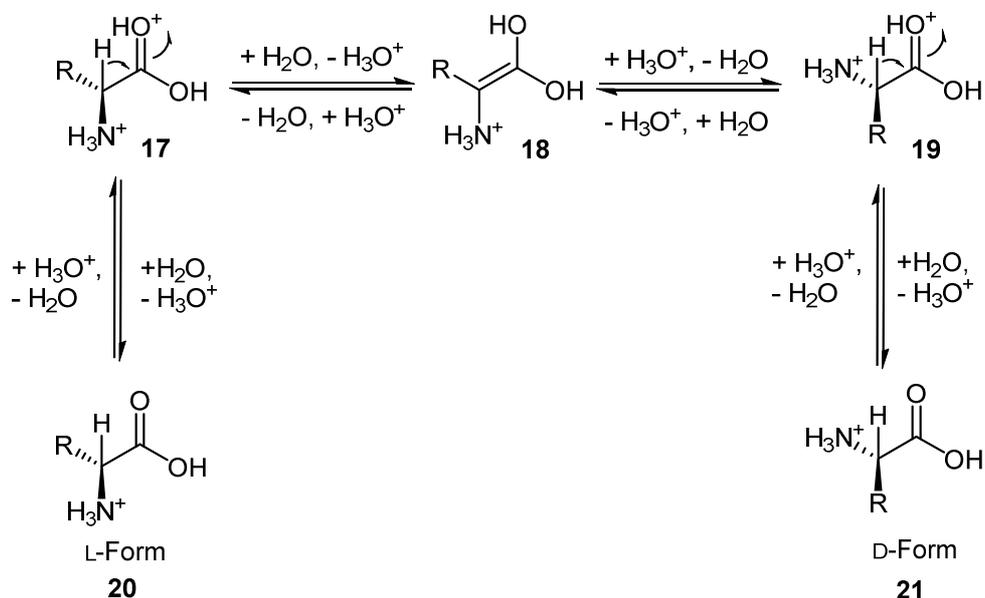


Abbildung 3-3: Mechanismus einer säurekatalysierten Racemisierung in wässriger Lösung nach FRIEDMAN.¹⁶⁰

Diese für die Racemisierung verantwortliche Gleichgewichtseinstellung verläuft schneller bei erhöhter Temperatur. Auch durch den Einfluss starker Basen tritt über ein intermediäres Enol Racemisierung ein.¹⁶⁰ Es stellte sich heraus, dass zur Minimierung der Racemisierung des optisch reinen Ausgangsmaterials, die Reaktionszeit auf 1,5 h verkürzt werden musste. Zusätzlich durfte die Temperatur beim Entfernen des Bromwasserstoffs im Vakuum (< 1 mbar) 50-60 °C nicht überschreiten.¹³³ Bevor die Guanidierung stattfinden konnte, musste die Aminosäurefunktion von **2** geschützt werden. Dafür wurde **2** u. a. mit Triethylboran in den Boroxazolidinon-Komplex **14** überführt. Die Guanidierung zum vollgeschützten *N*^δ-Methyl-L-arginin **15** wurde durch Behandlung mit *N,N'*-Bis(*tert*-butyloxycarbonyl)thioharnstoff **16** realisiert, mit anschließender Deprotektion zu **1**.

3.1.3 Optimierung des Schutzgruppenkonzepts

Da die in Kapitel 3.1.2 beschriebene Abspaltung der Tosyl-Schutzgruppe mit Bromwasserstoff auch unter optimierten Bedingungen nach wie vor ein großes Racemisierungsrisiko darstellte, sollte zunächst das Schutzgruppenkonzept überarbeitet werden. Es war bekannt, dass die Abspaltung von Tosyl-Schutzgruppen nur unter drastischen Bedingungen zu realisieren war.^{162,163} Aus diesem Grund erschien der Austausch der Tosyl-Schutzgruppe naheliegend.

Ein erklärtes Ziel dieser Arbeit war, eine gemeinsame Synthese für **1** und **2** zu entwickeln, bei der das Risiko einer Racemisierung des optisch reinen Ausgangsmaterials auf ein Minimum reduziert wäre. Dafür stand bei der Auswahl der Schutzgruppen besonders deren möglichst schonende Abspaltung im

Vordergrund. Zusätzlich musste gewährleistet werden, dass eine selektive Monomethylierung der N^δ -Position möglich wäre. Der Vorteil der Überführung des Stickstoffs an δ -Position in ein Sulfonamid war, dass durch den elektronegativen Effekt der benachbarten Sulfonyl-Gruppe die NH-Acidität gesteigert und somit die basenkatalysierte Monomethylierung mit klassischen Methylierungsreagenzien wie Methyljodid oder Dimethylsulfat erleichtert werden konnte.¹⁶³ Eine Weiterentwicklung der Tosyl-Schutzgruppen stellten die strukturell sehr ähnlichen 2- bzw. 4-Nitrophenylsulfonamid-Schutzgruppen (2-NBS bzw. 4-NBS) dar.^{164,165} Diese NBS-Schutzgruppen ließen sich analog zu den Tosyl-Schutzgruppen einführen, zeichneten sich aber durch schonendere Abspaltungsbedingungen aus. Gleichzeitig blieb die Möglichkeit der selektiven Monomethylierung des Sulfonamid-Stickstoffs durch ein klassisches Alkylierungsreagenz wie Methyljodid erhalten. Durch die Behandlung dieser *o*- oder *p*-Nitrophenylsulfonamide mit einem nukleophilen Reagenz wie Thiophenol in DMF ließen sich die entsprechenden methylierten Aminosäuren effizient freisetzen.^{164–166} Bei dieser Reaktion greift das freie Elektronenpaar des Schwefelatoms der Thiol-Gruppe nukleophil in 1-Position des desaktivierten Aromaten an, wobei sich der intermediäre Meisenheimer-Komplex unter Abspaltung von 2-Nitrodiphenylsulfid auflöst. Das Sulfonamid setzt anschließend unter Bildung von Schwefeldioxid das gewünschte sekundäre Amin frei. Mit dieser Schutzgruppentechnik sollte die Gefahr einer Racemisierung auf ein Minimum reduziert werden.

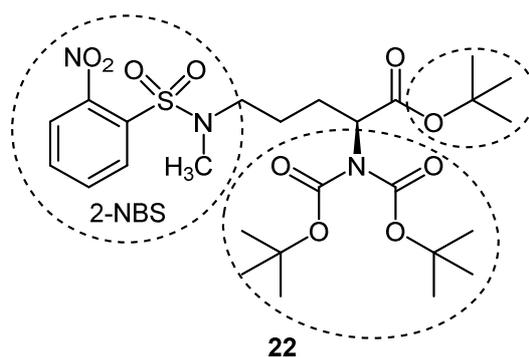


Abbildung 3-4: Darstellung des optimierten Schutzgruppenkonzeptes für die Darstellung von **1** und **2**.

Bevor die 2-NBS-Schutzgruppe an der Seitenkette des Ornithins eingeführt werden konnte, musste zunächst die α -Aminosäurefunktion ausreichend geschützt werden, um eine unerwünschte Methylierung der α -Aminogruppe oder eine Veresterung der Carbonsäure zu verhindern. Diese Protektion sollte durch eine klassische Veresterung der Carbonsäure zu einem *tert*-Butylester und eine doppelt Boc-geschützte α -Aminogruppe realisiert werden (**Abbildung 3-4**). Bei Aminosäuren mit funktionellen Gruppen in der Seitenkette bedarf die Einführung dieser Schutzgruppen allerdings mehrerer Schritte.¹⁶⁷ Ein Vorteil der Kombination von Boc- und *tert*-Butyl-Schutzgruppen ist zusätzlich, dass sie gleichzeitig in einem Schritt abgespalten werden können. Dies kann säurekatalysiert durch Behandlung mit Trifluoressigsäure erfolgen oder schonender mit Chlorwasserstoff in absolutem Diethylether unter Schutzgasatmosphäre.

3.1.4 Synthese von N^{δ} -Methyl-L-ornithin

Zunächst wurde die Aminogruppe in der Seitenkette des kommerziell erworbenen N^{α} -Boc-L-ornithins **3** durch Behandlung mit Phthalanhydrid **23** in das Phthalimid **24** überführt, um die selektive Protektion der α -Aminosäurefunktion zu ermöglichen (Abbildung 3-5).¹⁶⁸ Da die für eine Methylierung zugängliche α -Carbonsäure ebenfalls geschützt werden musste, wurde das Phthalimid-geschützte Ornithin **24** zusätzlich mit *tert*-Butylbromid **25** verestert.¹⁶⁹ Der Einsatz von K_2CO_3 diente dabei zur Deprotonierung der Carbonsäure. Das polar aprotische Lösungsmittel Dimethylformamid (DMF) eignete sich für die Veresterung durch Alkylierung besonders gut als Lösungsmittel, da es die während der Reaktion auftretenden polaren Übergangszustände gut stabilisieren konnte (nicht gezeigt).¹⁷⁰

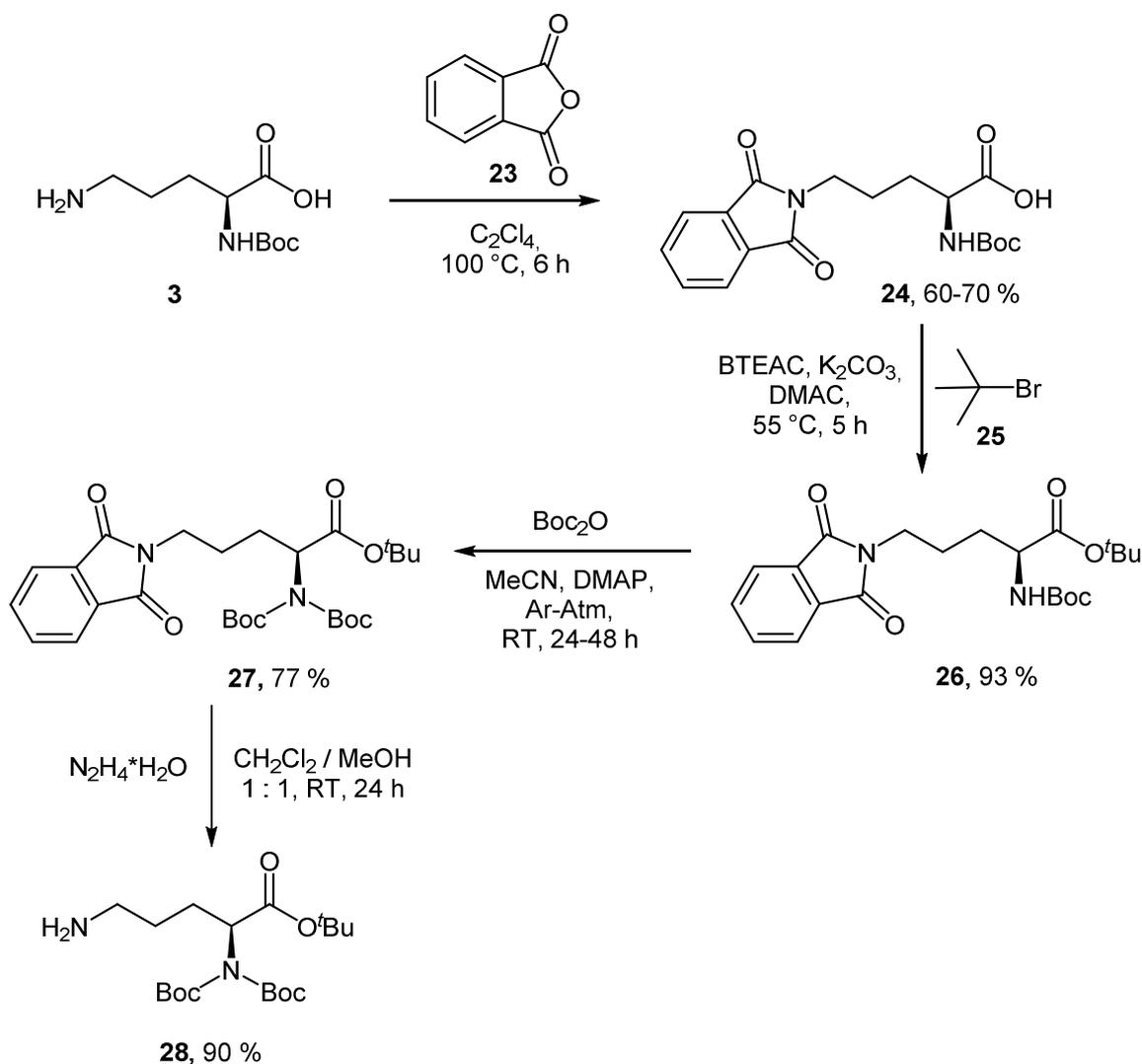


Abbildung 3-5: Synthese des N^{α}, N^{δ} -Bis-(*tert*-butyloxycarbonyl)-L-ornithin-*tert*-butylesters **28** ausgehend von optisch reinem N^{α} -Boc-L-ornithin **3**.

Um die bereits in Kapitel 3.1.3 erwähnte Methylierung der einfach Boc-geschützten N^{α} -Position zu verhindern, wurde **26** durch Behandlung mit Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc_2O) und katalytischen Mengen

4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) zu der vollständig geschützten Verbindung **27** umgesetzt.^{136,171} Diese Synthese musste aufgrund der hohen Reaktivität des Boc₂O gegenüber Wasser in trockenem Acetonitril unter Schutzgas erfolgen. Durch eine anschließende Hydrazinolyse konnte die Phthalimid-Schutzgruppe abgespalten und das primäre Amin **28** erhalten werden. Diese Reaktion stellt den finalen Schritt der Gabriel-Synthese dar.¹⁷² Hydrazin eignete sich aufgrund seines α -Effekts für die Abspaltung der Phthalimid-Schutzgruppe besser als beispielsweise Methylamin, da die Hydrazinolyse im Gegensatz zu klassischen Hydrolysen bei wesentlich mildereren Bedingungen ablief.^{173,174} Das so in einer sehr guten Ausbeute erhaltene Ornithin **28** war an seiner Aminosäurefunktion vollständig geschützt, wohingegen der Stickstoff in δ -Position für die folgende Einführung der 2-NBS-Schutzgruppe zugänglich wurde.

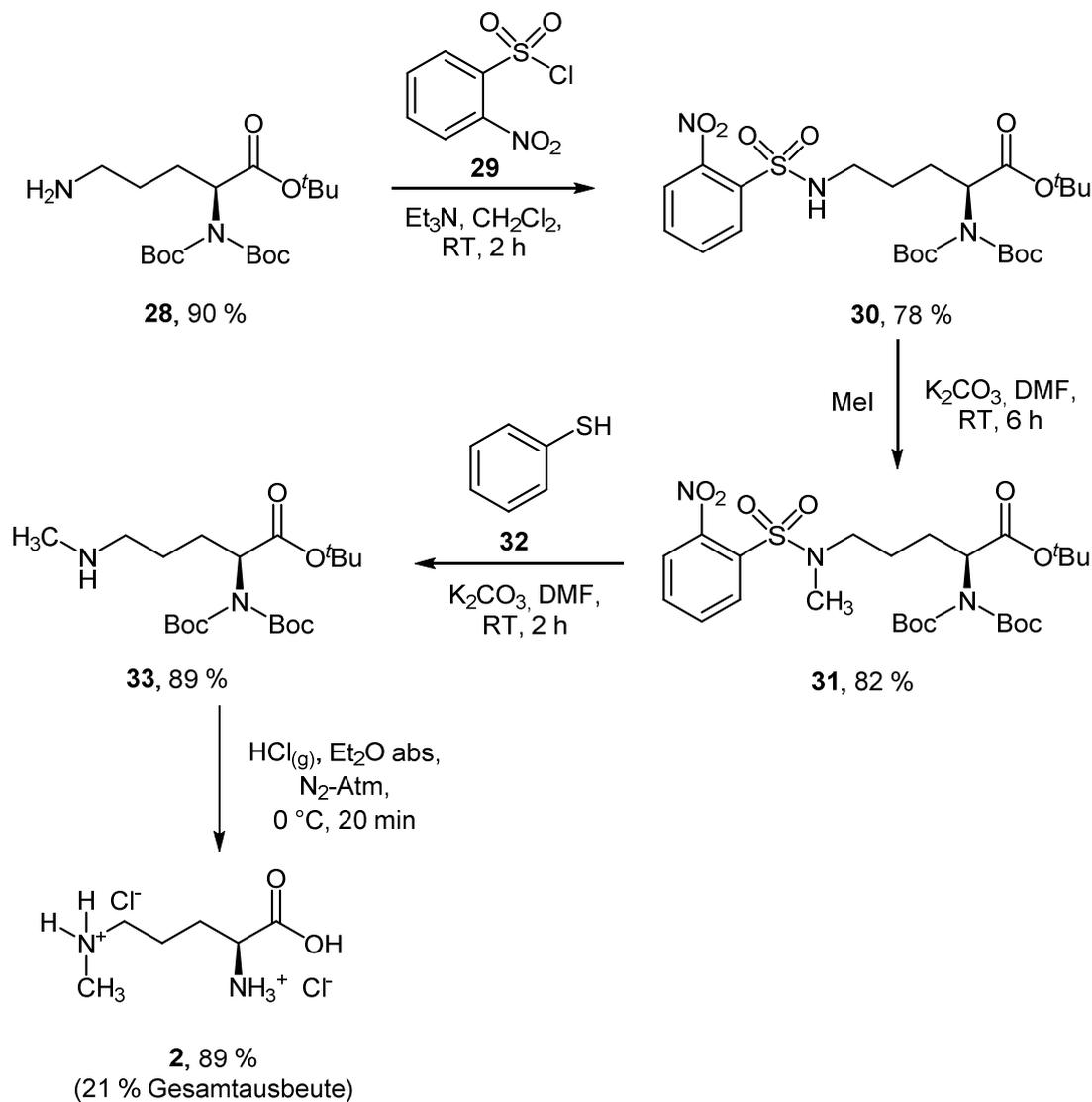


Abbildung 3-6: Synthese des N^{δ} -Methyl-L-ornithins **2**.

Durch die Behandlung von **28** mit einem Überschuss an 2-Nitrophenylsulfonylchlorid **29** und Triethylamin (TEA) als Hilfsbase konnte das Sulfonamid **30** synthetisiert werden (**Abbildung 3-6**). Nach der selektiven

Methylierung der N^δ -Position mit Methyljodid folgte die entscheidende basenkatalysierte Abspaltung der 2-NBS-Schutzgruppe mit Thiophenol in DMF. Diese Reaktion verlief problemlos bei Raumtemperatur. Das so gewonnene universelle Intermediat **33** war die gemeinsame Schlüsselverbindung für die anschließende Synthese der beiden Zielverbindungen **1** und **2**. Mit diesem entscheidenden Schritt konnte das in Kapitel 3.1.3 beschriebene Schutzgruppenkonzept erfolgreich umgesetzt werden. Für die finale Deprotektion der α -Aminosäurefunktion von **33** wurde unter absolutierten Bedingungen für 20 Minuten mit Chlorwasserstoff begast. Diese schonende Behandlung sollte eine säurekatalysierte Racemisierung verhindern. Das gewünschte N^δ -Methyl-L-ornithin **2** konnte nach Aufarbeitung über RP-18-Säulenchromatografie als stark hygroskopisches Dihydrochlorid isoliert werden.

3.1.5 Synthese von N^δ -Methyl-L-arginin

Für die Darstellung des N^δ -Methyl-L-arginins **1** musste zunächst die Guanidinfunktion aufgebaut werden (**Abbildung 3-7**). Dafür wurde in Anlehnung an SCHADE *et al.* N,N' -Bis(*tert*-butyloxycarbonyl)thioharnstoff **16** eingesetzt.¹³³ Statt des sehr toxischen und weniger effizienten HgCl_2 konnte für die Entschwefelung 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDCI) eingesetzt werden. EDCI ist wie das Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) ein klassisches Kopplungsreagenz in der Peptidsynthese und kann durch den aktivierenden Effekt auf die C-S-Doppelbindung unter Bildung eines entsprechenden Thioharnstoffs zum Guanidinaufbau eingesetzt werden.¹⁷⁵ Statt des schwerlöslichen Quecksilbersulfids kann der entstandene 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylthioharnstoff aufgrund seiner basischen tertiären Aminfunktion mit stark verdünnter HCl (1 %) durch Ausschütteln entfernt werden. Da das EDCI als Hydrochloridsalz vorlag, musste N,N -Diisopropylethylamin (DIPEA) als Hilfsbase eingesetzt werden. Nach Aufarbeitung mittels Flashchromatografie konnte das vierfach Boc-geschützte Intermediat **34** in einer sehr guten Ausbeute isoliert werden.

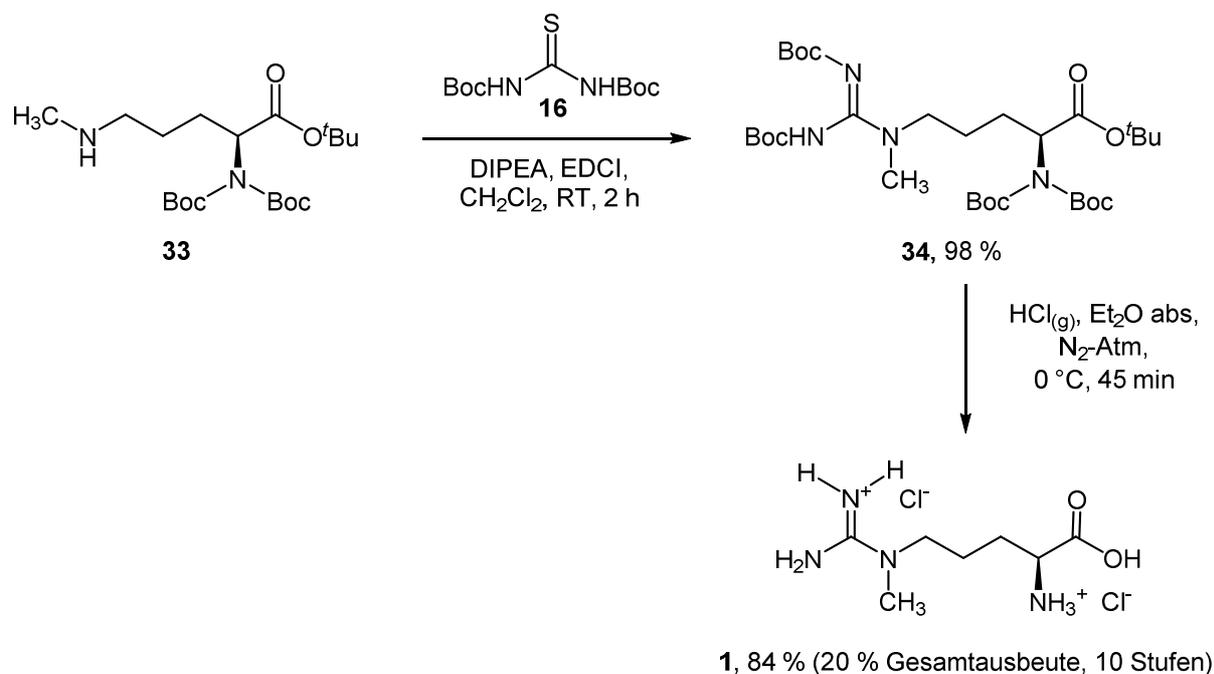


Abbildung 3-7: Synthese des N^δ -Methyl-L-arginins **1**.

Analog zu **2** wurde die finale Deprotektion der Verbindung **34** unter absolutierten Bedingungen durch Begasen mit Chlorwasserstoff durchgeführt. Das N^{δ} -Methyl-L-arginin **1** konnte ebenfalls nach säulenchromatografischer Aufarbeitung auf einer Umkehrphase als Dihydrochlorid isoliert werden.

Der Versuch, eine von LEBLEU *et al.* beschriebene direkte Methylierung primärer Amine mit Methyltrifluormethansulfonsäure auf Verbindung **28** zu übertragen, lieferte neben dem Edukt und dem dimethylierten Nebenprodukt zwar auch die gewünschte monomethylierte Verbindung **33** (**Abbildung 3-8**), scheiterte allerdings an der schwierigen und wenig effizienten säulenchromatografischen Aufarbeitung des Produktgemisches.¹⁷⁶

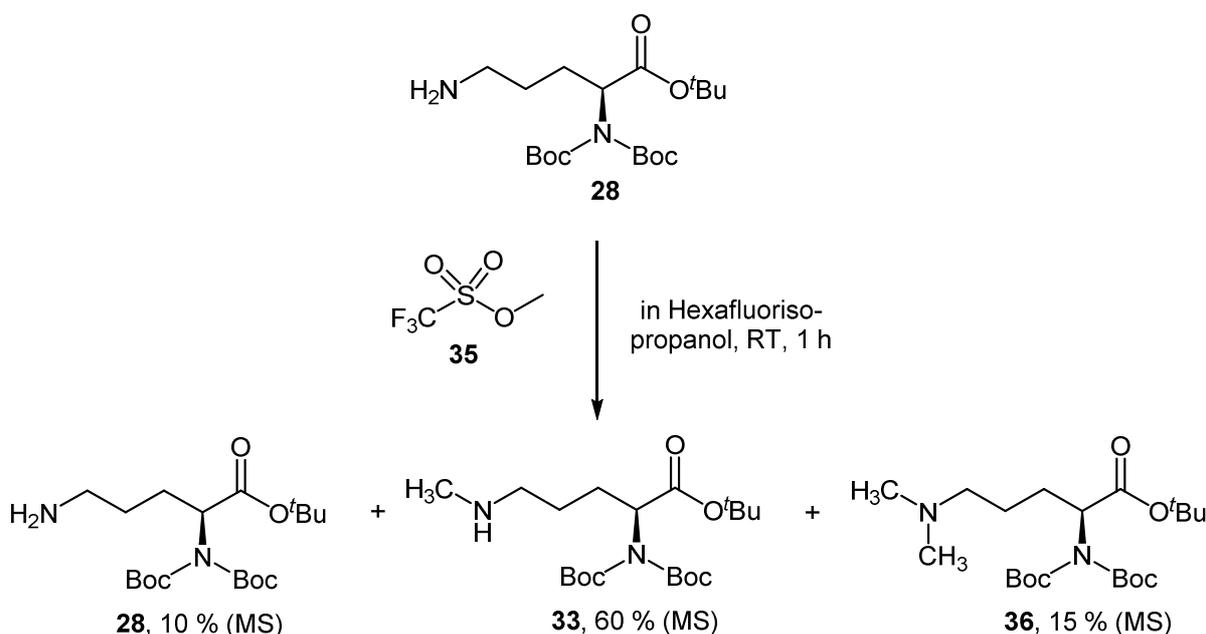


Abbildung 3-8: Alternativer Methylierungsversuch der N^{δ} -Position in Anlehnung an LEBLEU *et al.*¹⁷⁶

Durch den Einsatz des sauer reagierenden Hexafluorisopropanols sollte die Elektrophilie der Methylgruppe der Methyltrifluormethansulfonsäure erhöht und gleichzeitig die Nukleophilie des entstehenden monomethylierten sekundären Amins herabgesetzt werden. Die dadurch gesenkte Tendenz des monomethylierten Amins zur weiteren Methylierung sollte eine Selektivität hinsichtlich monomethylierter Produkte von bis zu 90 % erzeugen. Eigene Untersuchungen mittels LC-MS-Analytik konnten diese Selektivität nicht bestätigen.

Eine Möglichkeit, die Produkte mit unterschiedlichem Methylierungsmuster direkt und ohne Aufarbeitung zu nutzen, wäre eine Behandlung mit Bromcyan im Sinne eines Von-Braun-Abbaus gewesen. Bei dieser Reaktion entstünde aus dem tertiären Amin **36** ein Cyanamid, welches nach Reaktion mit Hydroxylamin ein *N*-Hydroxyguanidin bilden würde. Dieses Hydroxyguanidin hätte anschließend hydrogenolytisch zum gewünschten Produkt **1** umgesetzt werden können.^{133,136,146} Aufgrund der geringen Ausbeute von 15 % bei der Darstellung des tertiären Amins wurde auf diese Option verzichtet.

3.1.6 Zusammenfassung und Ausblick

Ein Ziel dieser Arbeit war, einen gemeinsamen Syntheseweg für enantiomerenreines N^{δ} -Methyl-L-arginin **1** und -ornithin **2** zu entwickeln.

SCHADE *et al.* konnten zwar beide Verbindungen in einer Enantiomerenreinheit von > 98 % *ee* darstellen, verließen sich aber weiterhin auf eine Tosyl-Schutzgruppen basierte Synthesestrategie, die ein hohes Risiko für die Racemisierung der Aminosäuren darstellte. Durch Austausch der Tosyl-Schutzgruppe durch eine strukturell ähnliche 2-Nitrophenylsulfonamid-Schutzgruppe, dessen schonende Abspaltung die optische Reinheit der Verbindungen nicht beeinflusste, konnte die Synthese grundlegend optimiert werden. Thiophenol lieferte dafür das optimale Abspaltungsreagenz, das im Sinne einer nukleophilen aromatischen Substitutionsreaktion (S_NAr) die 2-NBS-Schutzgruppe effizient entfernte, ohne dabei die optisch aktive Aminosäurefunktion zu beeinträchtigen. Absolutierte Bedingungen für die finale Deprotektion verhinderten darüber hinaus jegliche Racemisierung und bildeten eine weitere wichtige Weiterentwicklung zu den bisher beschriebenen Synthesestrategien.

Durch die Darstellung der universellen Vorstufe **33** war es gelungen, eine Verbindung zu erzeugen, aus der beide angestrebten Zielverbindungen **1** und **2** hervorgingen. Die Gesamtausbeute der insgesamt zehnstufigen Synthese lag bei 20 % für **1** und 21 % für **2**. Die Untersuchung der Enantiomerenreinheit beider Substanzen ist in Kapitel 5 detailliert beschrieben.

Mit den beiden enantiomerenreinen Aminosäuren **1** und **2** ist es in Zukunft möglich, biologische Untersuchungen durchzuführen, die auf das Vorhandensein natürlich vorkommender L-Aminosäuren bzw. deren Metabolite angewiesen sind. So soll es möglich werden, die (patho)physiologische Bedeutung der N^{δ} -Methylierung von Arginin und seiner Derivate in Lebewesen besser zu verstehen.

3.2 Synthese acetalischer Prodrugs des N^{ω} -Hydroxy-L-arginins

3.2.1 Einleitung

Prodrugs von Arzneistoffen mit Amidin- und Guanidinstruktur sind Bestandteil unserer langjährigen intensiven Forschung im Arbeitskreis und wurden im Rahmen vieler vorangegangener Arbeiten synthetisiert und biochemisch charakterisiert. N^{ω} -Hydroxy-L-arginin ist als physiologisches Intermediat der NOS-katalysierten NO-Freisetzung eine besonders interessante Verbindung hinsichtlich der Behandlung von Erkrankungen, die auf ein NO-Defizit zurückzuführen sind. Während bei der Entwicklung vieler Arzneistoff-Prodrugs u. a. eine Steigerung der oralen Bioverfügbarkeit im Vordergrund steht, sollen Prodrugs des N^{ω} -Hydroxy-L-arginins ganz besonders den Arzneistoffcharakter der Verbindung hinsichtlich hydrolytischer und metabolischer Stabilität verbessern. Die Problematik hinsichtlich der Stabilität und pharmakokinetischen Eigenschaften von NOHA und die sich daraus erschließenden Derivatisierungsoptionen wurden bereits in der Einleitung (Kapitel 1.2.1 und 1.3) und in der Zielsetzung (Kapitel 2.2) dieser Arbeit ausführlich dargestellt.

Die erste zehnstufige Synthese von NOHA wurde 1991 mit einer Gesamtausbeute von 18 % beschrieben.¹⁷⁷ Im gleichen Jahr konnte eine weitere effizientere sechsstufige Darstellung mit einer Gesamtausbeute von 28 % beschrieben werden.¹⁷⁸ Im Arbeitskreis erfolgte die erste Synthese mit anschließender NMR-spektroskopischer Untersuchung von u. a. auch ¹⁵N-markiertem N^{ω} -Hydroxy-L-arginin durch CLEMENT *et al.*¹⁷⁹ Dabei konnte die Hydroxyguanidinfunktion durch Umsetzung eines Cyanamids mit Hydroxylamin aufgebaut werden. Erst zwölf Jahre später beschrieben MARTIN *et al.* eine weitere Möglichkeit, NOHA synthetisch zugänglich zu machen.¹⁸⁰ Hier wurde die Hydroxyguanidinfunktion aus einem geschützten Thiocitrullin durch Umsetzung mit *O*-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)hydroxylamin aufgebaut. Nach Deprotektion mit Trifluoressigsäure (TFA) konnte aus dieser acetalischen Schutzgruppe die *N*-Hydroxyguanidinfunktion von NOHA freigesetzt werden. Diese effiziente vierstufige Synthese verlief unter milden Reaktionsbedingungen mit sehr guten Ausbeuten. Einige Jahre später konnte von SCHADE eine Synthese für die ersten NOHA-Prodrugs beschrieben werden.^{105,146} Dabei wurden verschiedene *O*- und *N*-substituierte Verbindungen synthetisiert. Neben diversen *O*-alkylierten Verbindungen konnte auch eine *O*-acetalische Verbindung durch Konjugation mit peracetylierter Galactose erfolgreich dargestellt werden. Während die Amidoxime des Dabigatrans und Pentamidins erfolgreich mit Bernstein- oder Glutarsäure verestert werden konnten, waren alle bisherigen Versuche, die *N*-Hydroxyguanidinfunktion des N^{ω} -Hydroxy-L-arginins zu acylieren, nicht erfolgreich.^{105,181}

Unter dem Aspekt, dass die *O*-Alkylierung der Hydroxyguanidine einen wesentlichen Beitrag zur Stabilisierung leistete, aufgrund von möglichen Monooxygenase-katalysierten *O*-Desalkylierungen aber ein erhebliches Interaktionspotential aufwies,¹⁸² sollte im Rahmen dieser Arbeit die Überführung der *N*-Hydroxyguanidinfunktion in ein Acetal näher untersucht werden.

Ein derartiges Prodrugkonzept, bei dem der Sauerstoff von Carbonsäuren oder Phosphonsäuren Teil eines Acetals ist, konnte bereits erfolgreich auf bekannte Arzneistoffe wie das Cephalosporin-Antibiotikum Cefpodoximproxetil **37** oder das Virustatikum Tenofoviridisoproxil **38** übertragen werden (**Abbildung 3-9**).

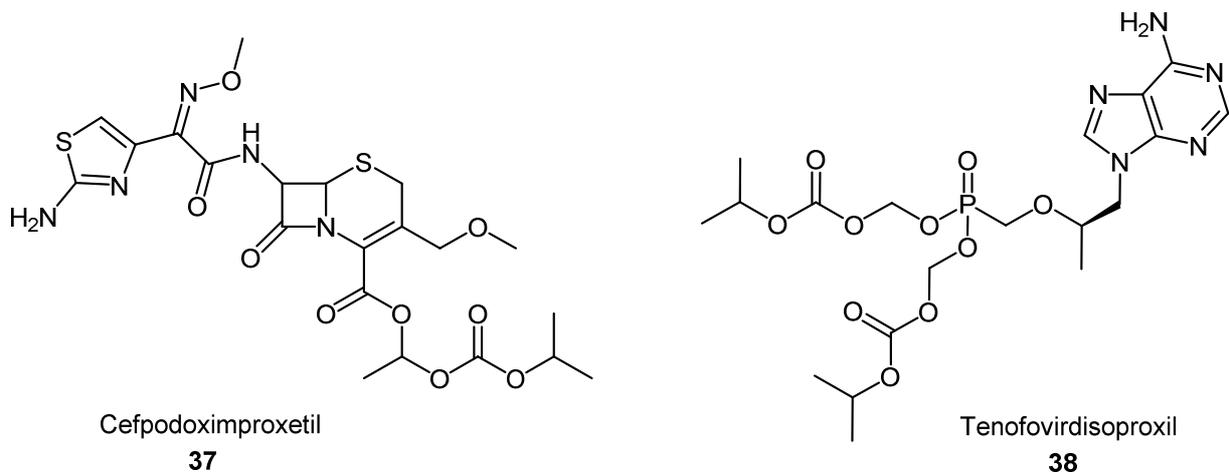


Abbildung 3-9: Strukturen des Tenofovirdisoproxils **38** und Cefpodoximproxetils **37** als Beispiele für Arzneistoffe mit acetalischem Prodrugkonzept

Durch Esterase-katalysierte Hydrolyse der Kohlensäureester zerfallen die zurückbleibenden Halbacetale unter Freisetzung des entsprechenden Aldehyds. Es resultiert die freie Carbon- oder Phosphonsäure.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Synthese von sowohl N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Prodrugs mit offenkettiger *O*-acetalischer Struktur als auch von *O*-Glycosiden. Zuckerkonjugate stellen eine besondere Form der Acetale dar, da einer der Sauerstoffe bei diesen Verbindungen Teil eines Ringsystems ist, wohingegen der andere Teil eines *N*-Hydroxyguanidins ist. Fraglich bei diesen speziellen Acetalen war deren Bioaktivierung, da es sich nicht um eine klassische glycosidische Bindung handelte. KLEIN konnte durch *in vitro* Untersuchungen an einer *O*-glycosidischen Modellverbindung **39** bereits zeigen, dass diese acetalischen *N*-Hydroxyguanidin-Prodrugs von β -Galactosidasen als Substrate akzeptiert und zu β -Galactose **40** und dem resultierenden *N*-Hydroxyguanidin **41** aktiviert wurden (**Abbildung 3-10**).¹⁵¹

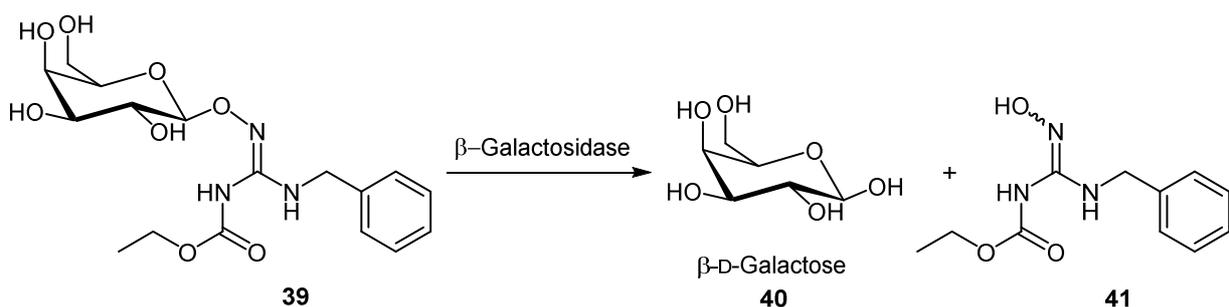


Abbildung 3-10: Aktivierung einer *O*-glycosidischen Modellverbindung **39** durch β -Galactosidasen.¹⁵¹

Darauf aufbauend sollte aus synthetischer Sicht zunächst ein Konzept entwickelt werden, das Verbindungen ohne Carbamatstruktur zugänglich machte. Gleichzeitig sollte die *N*-Hydroxyguanidinfunktion mit unterschiedlichen Galactosyl- und Glucosyl-Substituenten konjugiert

werden. Zudem stellte die gezielte Veresterung der α -Carbonsäure mit Ethanol ebenfalls ein wichtiges Ziel bei der Umsetzung der Prodrugstrategien dar (Kapitel 2.2).

3.2.2 Synthesestrategien

Die bereits etablierte Synthesestrategie des Hydroxyguanidinaufbaus über geschützte Thiocitrulline sollte auch in dieser Arbeit die Grundlage für die folgenden Synthesen darstellen (**Abbildung 3-11**). Dazu wurde zunächst das kommerziell erhältliche Boc- und *tert*-Butyl-geschützte Ornithin **42** mit Ethoxycarbonylisothiocyanat **43** (EocNCS) in das entsprechende Thiocitrullin **44** überführt. Aus diesem Thioharnstoff konnte anschließend mit dem Zuckerbaustein 1-Aminoxy-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranose (**45**), DIPEA und EDCI als Entschwefelungsreagenz das vollgeschützte *N*-Hydroxy-L-arginin **46** synthetisiert werden. Diese Vorstufe musste unter absolutierten Bedingungen mit Chlorwasserstoff begast werden, um die Boc- und *tert*-Butyl-Schutzgruppen abzuspalten. Anschließend erfolgte die Überführung des vermutlich instabilen Hydrochloridsalzes in das stabilere Natriumsalz, um einer autokatalytischen Spaltung der säurelabilen glycosidischen Bindung bei Kontakt mit Wasser vorzubeugen. Die so erhaltene Verbindung **47** stellte das erste stabile acetalische NOHA-Prodrug mit Carbamatstruktur dar.

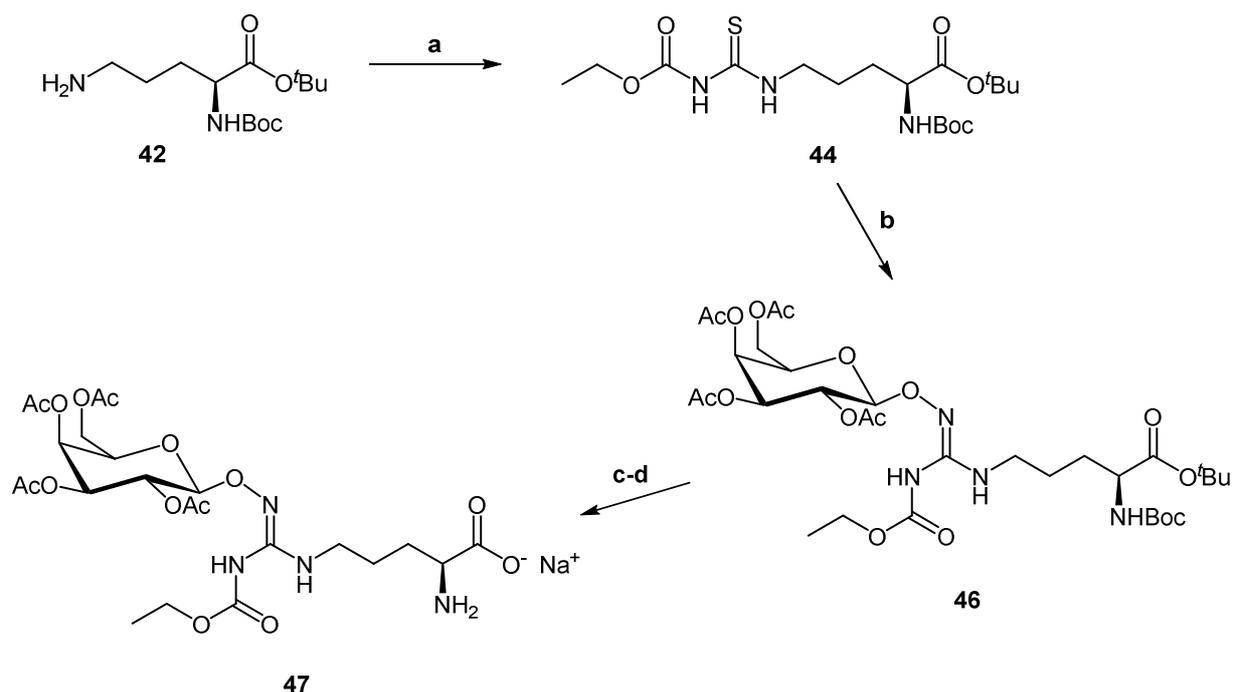


Abbildung 3-11: Synthese des ersten acetalischen NOHA-Prodrugs mit Carbamatstruktur **47** nach SCHADE *et al.*¹⁰⁵ a) Ethoxycarbonyloxyisothiocyanat **43** (EocNCS), TEA, 81 %; b) 1-Aminoxy-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranose (**45**), DIPEA, EDCI, 75 %; c) $\text{HCl}_{(g)}$, Et_2O abs., Argon-Atm., -10°C ; d) 0,5 M NaHCO_3 -Lsg., RP-18, 85 % für c und d.

Aufgrund der Notwendigkeit carbamatfreier Guanidinstrukturen sollten in folgenden Synthesen zunächst Bedingungen zur Abspaltung der Ethoxycarbonyl-Schutzgruppe (Eoc-) etabliert werden. Dabei war es von

großer Bedeutung die empfindliche acetalische Bindung nicht zu beeinträchtigen. Diese Problematik soll in dem folgenden Kapitel ausführlich diskutiert werden.

3.2.3 Entwicklung eines orthogonalen Schutzgruppenkonzeptes anhand von Modellverbindungen

Unter einem orthogonalen Schutzgruppenkonzept versteht man idealerweise den Einsatz von Schutzgruppen, deren Abspaltung in beliebiger Reihenfolge und unter Bedingungen erfolgen kann, die andere Schutzgruppen nicht beeinträchtigen.¹⁶⁷ So sollte es möglich sein, die Aminosäure-, die Guanidin- und die Monosaccharidfunktion des *N*^ω-Hydroxy-L-arginins gezielt zu entschützen (**Abbildung 3-12**). Bei NOHA wurden diese Bedingungen zusätzlich durch dessen allgemeine chemische Instabilität limitiert.

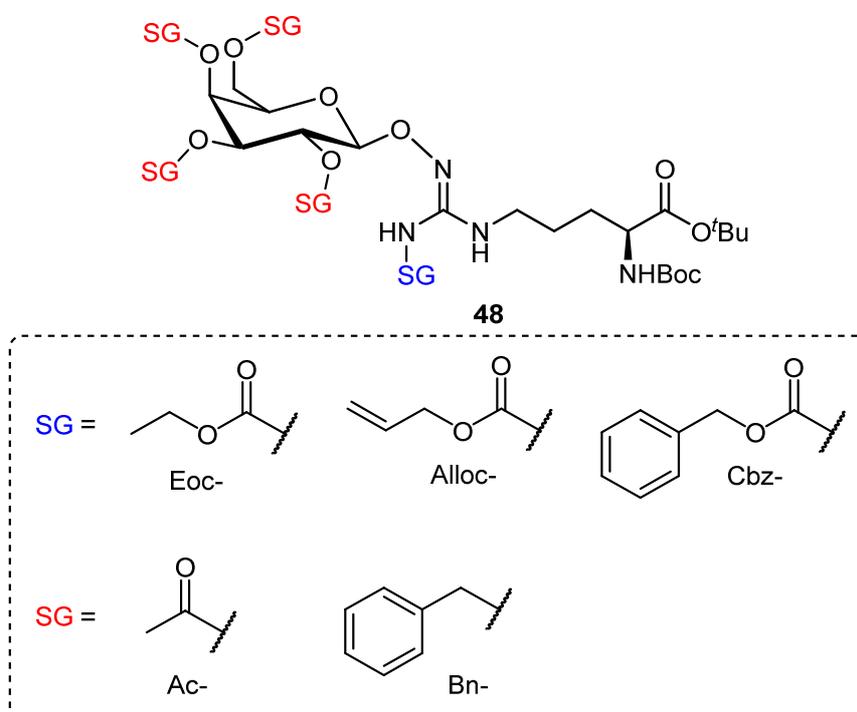


Abbildung 3-12: Schematische Darstellung eines orthogonalen Schutzgruppenkonzeptes mit Beispielen. SG = Schutzgruppe.

Eine weitere wichtige Voraussetzung für die geplanten Synthesen war die Einführung der Carbamatschutzgruppe durch Umsetzung des entsprechenden Säurechlorids in das korrespondierende Isothiocyanat, das für den Aufbau der Thioharnstoffe notwendig war. In der Literatur existieren Protokolle für Benzyloxycarbonyl- (Cbz-) und Eoc-Isothiocyanate.^{180,183} Boc-Schutzgruppen ließen sich dagegen nicht zu dem entsprechenden Isothiocyanat umsetzen.¹⁸⁰

Es ist bekannt, dass die Abspaltung der reaktionsträgen Alkylcarbamatschutzgruppen am leichtesten unter drastischen Reaktionsbedingungen abläuft, wie z.B. durch Behandlung mit wässriger KOH- oder Ba(OH)₂-Lösung in wässrigem Methanol oder Ethylenglykol bei 100-110 °C für 12 Stunden.^{184,185} Diese Reaktionsbedingungen kamen für das thermo- und basenlabile NOHA nicht in Frage.¹⁰⁴ Um geeignete

Abspaltungsbedingungen für die Eoc-Schutzgruppe zu etablieren, sollte zunächst eine einfache Modellverbindung synthetisiert werden, die die komplexe Schutzgruppenproblematik simulierte. Dafür wurde aus Kostengründen statt des Ornithins **42** einfaches Benzylamin **49** verwendet und mit EocNCS **43** zum Thioharnstoff **50** umgesetzt.¹⁸³ Der Aufbau des Guanidins **51** erfolgte dann mit der peracetylierten 1-Aminoxygalactose **45**. Die Darstellung der 1-Aminoxygalactose ist in Kapitel 3.2.4 gezeigt.

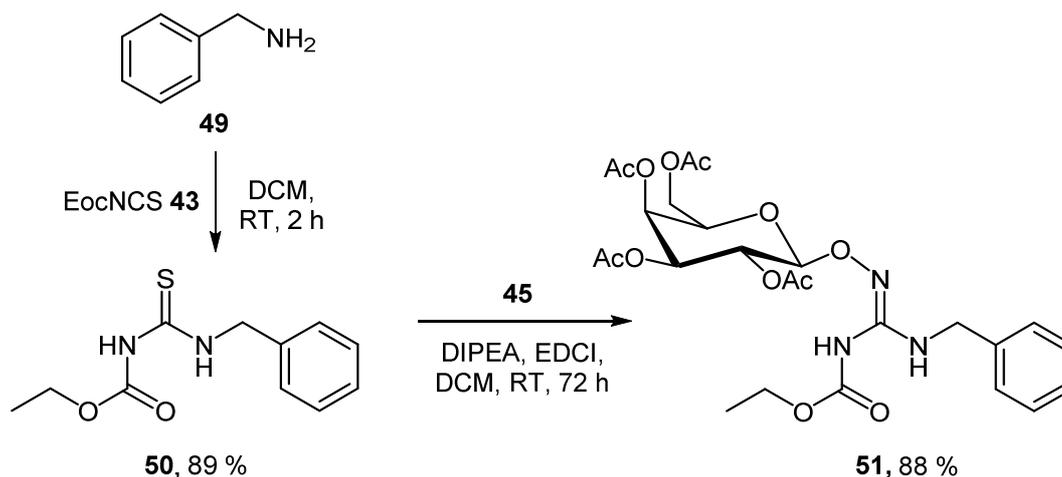


Abbildung 3-13: Synthese der *O*-glycosylierten Modellverbindung **51**. Der Thioharnstoff **50** wurde aus Benzylamin und EocNCS **43** synthetisiert.

Ausgehend von der *O*-glycosylierten Modellverbindung **51** wurden verschiedene Versuche unternommen, die Eoc-Schutzgruppe abzuspalten. Die Behandlung mit wässrigen oder methanolischen 1-5 M NaOH- oder KOH-Lösungen führte erwartungsgemäß zu einer schnellen Deacetylierung des Zuckers, ließ das Carbamat aber weitestgehend unversehrt. Im Falle der KOH-Behandlung war nach einigen Tagen zunächst eine beginnende Umesterung zu einem Methylcarbamat zu beobachten. Nach vier Tagen lag die Ausbeute für **52** bei lediglich 10-15 % (laut LC/MS-Analyse des Rohprodukts; ermittelt durch Integration der Signale im Totalionenchromatogramm). Erst der Einsatz einer wässrigen 2 M LiOH-Lösung in einem Lösungsmittelsystem aus Methanol und THF in einem Verhältnis von 4:3:6 zeigte neben der schnellen Deacetylierung des Galactoserestes auch eine langsame Abspaltung der Eoc-Schutzgruppe. Nach 96 h war eine nahezu quantitative Umsetzung zu der carbamatfreien Verbindung **52** zu beobachten (**Abbildung 3-14**).

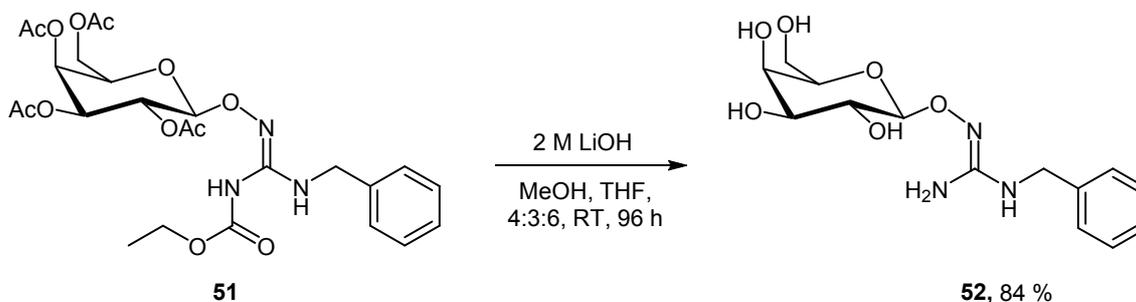


Abbildung 3-14: Eoc-Abspaltung von **51** zur carbamatfreien Modellverbindung **52**.

Der Grund, warum LiOH als schwächste der drei Basen die Abspaltung erleichterte, ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt. Sicher ist aber, dass das Lösungsmittelsystem eine entscheidende Rolle spielte. Die Kombination von wässriger LiOH-Lösung mit Methanol und THF war am effektivsten. Wurde nur methanolische LiOH-Lösung verwendet, war wenig Deprotektion zu beobachten (< 20 % laut LC/MS). Der Einsatz von KOH im neuen Lösungsmittelsystem lieferte ebenfalls dürftige Ergebnisse (< 30 % laut LC/MS). Ob der stärkere kovalente Charakter des LiOH in dem lipophileren Lösungsmittelsystem eine Rolle spielte, bleibt fraglich. Jedoch wurde in der Literatur bereits darüber berichtet, dass bei der Hydrolyse von Gallensäureestern LiOH in einem Methanol/Wasser-Gemisch eine effektivere Base darstellte als NaOH und KOH.¹⁸⁶

Problematisch bei der basischen Hydrolyse war der automatische Verlust der Acetylgruppen des Zuckers als ungewünschte Nebenreaktion. Dieses Konzept widersprach dem eines orthogonalen Schutzgruppenkonzeptes. Es wurden daher Versuche unternommen, das Monosaccharid nachträglich durch Behandlung mit Essigsäureanhydrid zu reacetylieren.¹⁸⁷ Diese Versuche waren allerdings wenig effizient, da **52** in unterschiedlichem Acetylierungsmuster erhalten wurde, bei dem u.a. auch die Acetylierung des Guanidinstickstoffs beobachtet werden konnte. Das ließ den Rückschluss zu, dass diese Methode nur in eine Richtung anwendbar war und lediglich für die Prodrugs **76** und **94** praktikabel wäre. Alle anderen Verbindungen müssten über alternative Strategien synthetisch zugänglich gemacht werden.

Eine weitere in der Literatur beschriebene Möglichkeit zur Carbamatspaltung ist der Einsatz von Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF).¹⁸⁸ Dabei greift das Fluorid-Anion nukleophil am Carbonylkohlenstoff des Alkylcarbamats an. Der entstehende tetrahedrale Übergangszustand zerfällt anschließend unter Bildung eines ionischen Amids und des entsprechenden Alkylfluorcarbonats.¹⁸⁹ Tatsächlich konnte bei eigenen Versuchen eine Spaltung des Ethylcarbamats beobachtet werden. Dies geschah allerdings simultan zur schrittweisen Deacetylierung des Zuckers. Da die Acetylgruppen aber ein wichtiges Prodrugkonzept darstellten, wurde diese Technik zur Deprotektion nicht weiter verfolgt.

Eine vielversprechende Methode erschien die Einführung einer Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Cbz-) am Guanidinstickstoff. Durch Umsetzung von Benzyloxycarbonylisothiocyanat **56** mit Benzylamin konnte zunächst der Thioharnstoff **55** aufgebaut werden, der anschließend mit **45** zu **53** umgesetzt wurde. Statt einer Deprotektion mit Wasserstoff unter erhöhten Druck sollte eine mildere Variante mit 1,4-Cyclohexadien als Wasserstoff-Donator und Pd/C als klassischem Katalysator zum Einsatz kommen (**Abbildung 3-15**).^{190,191} Entsprechend den Angaben der Literatur sollte die Reaktion mit nahezu quantitativen Ausbeuten und unter gleichzeitigem Erhalt der *N*-Benzylgruppe ablaufen.¹⁹¹

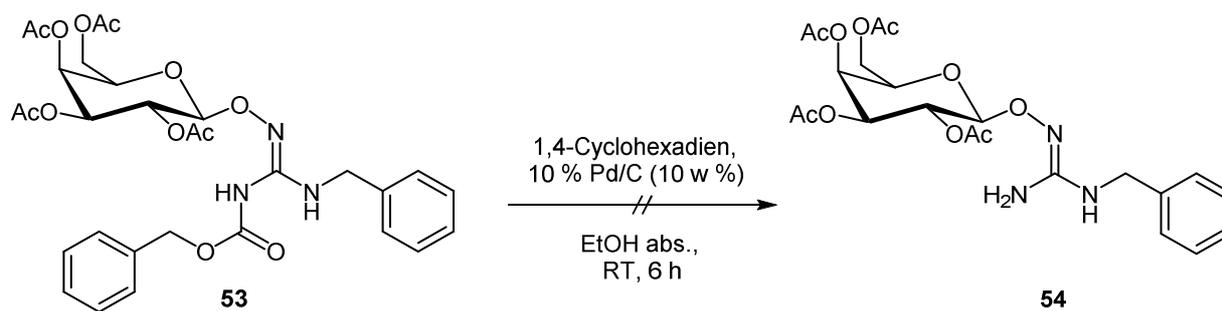


Abbildung 3-15: Versuch zur hydrogenolytischen Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe von **53** mit 1,4-Cyclohexadien als Wasserstoff-Donator. Der für die Synthese von **53** benötigte Thioharnstoff **55** wurde in Anlehnung an JIRGENSONS *et al.* aus Benzylamin **49** und CbzNCS **56** dargestellt.¹⁹²

Eigene Untersuchungen der aufgearbeiteten Produkte mittels LC-MS-Kopplung zeigten eine erfolgreiche Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe. Unglücklicherweise konnte ebenfalls die Spaltung der glycosidischen Bindung verzeichnet werden. Eine weitere elegante Möglichkeit zur Deprotektion von Cbz-Schutzgruppen ist ein *push-pull*-Mechanismus mit Thioanisol und TFA.¹⁹³ Diese Technik konnte bereits erfolgreich für die Synthese des AbMEG **9** eingesetzt (Kapitel 3.3) werden, fand hier aber aufgrund der säurelabilen glycosidischen Bindung keinen Einsatz.

Eine der wohl bekanntesten Schutzgruppen in der Peptidchemie ist die 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe (Fmoc-), die in der Festphasen-Peptidsynthese eine breite Anwendung findet.^{194,195} Diese Schutzgruppe wird basenkatalysiert, z.B. mit Piperidin, Morpholin, DMAP oder DIPEA, in einer E1cb-Eliminierungsreaktion abgespalten.¹⁹⁶ Auch bei der Protektion von Thioharnstoffen, die der Synthese von 2-Aminothiazolen dienen, wurde die Fmoc-Schutzgruppe bereits erfolgreich eingesetzt.¹⁹⁷ Da aber beim Aufbau der Hydroxyguanidinfunktion DIPEA als Hilfsbase eingesetzt wird, war demnach eine Interaktion mit der Fmoc-Schutzgruppe in Form von partieller Deprotektion zu erwarten. Aus diesem Grund wurden dazu keine synthetischen Versuche unternommen.

Bei der Synthese von Glycopeptiden treffen die Probleme der Peptid- mit denen der Kohlenhydratchemie aufeinander. Solche Verbindungen stellen hohe Anforderungen an die Auswahl geeigneter Schutzgruppen. KUNZ und UNVERZAGT setzten bei der Synthese von Peptiden und Glycopeptiden auf den Einsatz von Allyloxycarbonyl-Schutzgruppen (Alloc-) zur Protektion von Aminogruppen.^{198,199} Der große Vorteil dieser Alloc-Schutzgruppen besteht darin, dass sie über einen katalytischen Allyltransfer mit einem Pd(0)-Katalysator auf einen Allylgruppenakzeptor wie das CH-acide 5,5-Dimethylcyclohexan-1,3-dion (Dimedon **59**) übertragen werden können. Diese schnelle Reaktion läuft in konventionellen Lösungsmitteln wie Tetrahydrofuran (THF) bei Raumtemperatur ab.¹⁹⁸

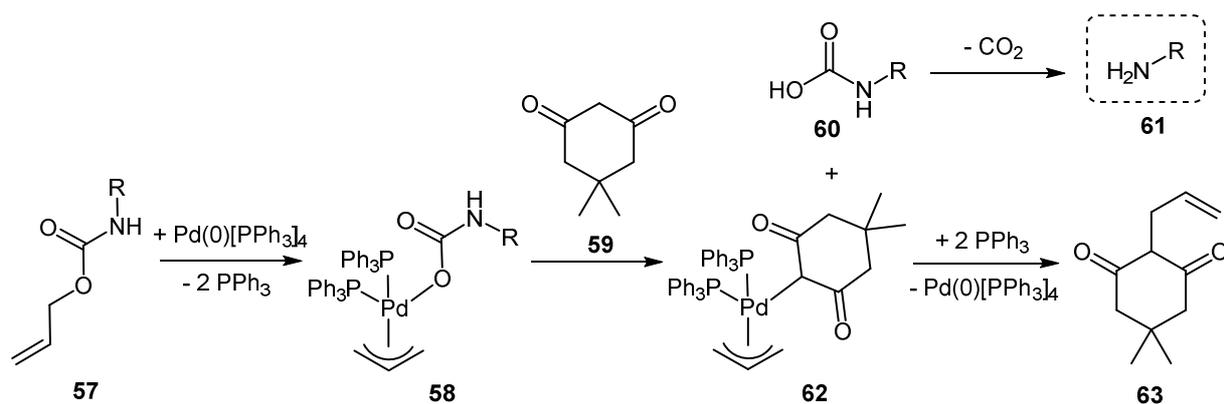


Abbildung 3-16: Mechanismus der Pd(0)-katalysierten Alloc-Abspaltung mit Dimedon als Allylgruppenakzeptor.

Der Mechanismus der Alloc-Abspaltung ist in **Abbildung 3-16** gezeigt. Zunächst bildete sich mit dem Allylcarbamat **57** ein π -Allyl-Palladium-Komplex **58** der anschließend durch nukleophilen Angriff des Dimedons **59** die instabile Carbaminsäure **60** lieferte, die sofort unter Kohlenstoffdioxidabspaltung das primäre Amin **61** freisetzte. Ein sieben bis achtfacher Überschuss an Dimedon stellte sicher, dass das Amin **61** nicht selbst als Allylgruppenakzeptor fungierte. Hinsichtlich der Aufarbeitung war sowohl das schwach acide Dimedon **59** als auch das entstandene 2-Allyl-substituierte Dimedon **63** leicht zu separieren.

Dieses vielversprechende Schutzgruppenkonzept sollte anhand einer Modellverbindung getestet werden. Dazu musste zunächst das entsprechende Allyloxycarbonylisothiocyanat (AllocNCS) **65** synthetisiert werden. Dieses Isothiocyanat wurde bereits in der Literatur beschrieben,^{200,201} konnte in dieser Arbeit aber erstmals über eine von MARTIN *et al.* beschriebene Methode mit Kaliumthiocyanat unter Katalyse von 18-Krone-6 aus dem Säurechlorid **64** erfolgreich dargestellt werden.¹⁸⁰ Die hier dargestellte Methode zur Darstellung von **65** ist bedeutend effizienter als die in der Literatur beschriebene Methode, da statt 3,5 % eine mehr als 20fach höhere Ausbeute von 83 % erzielt werden konnte (**Abbildung 3-17**).

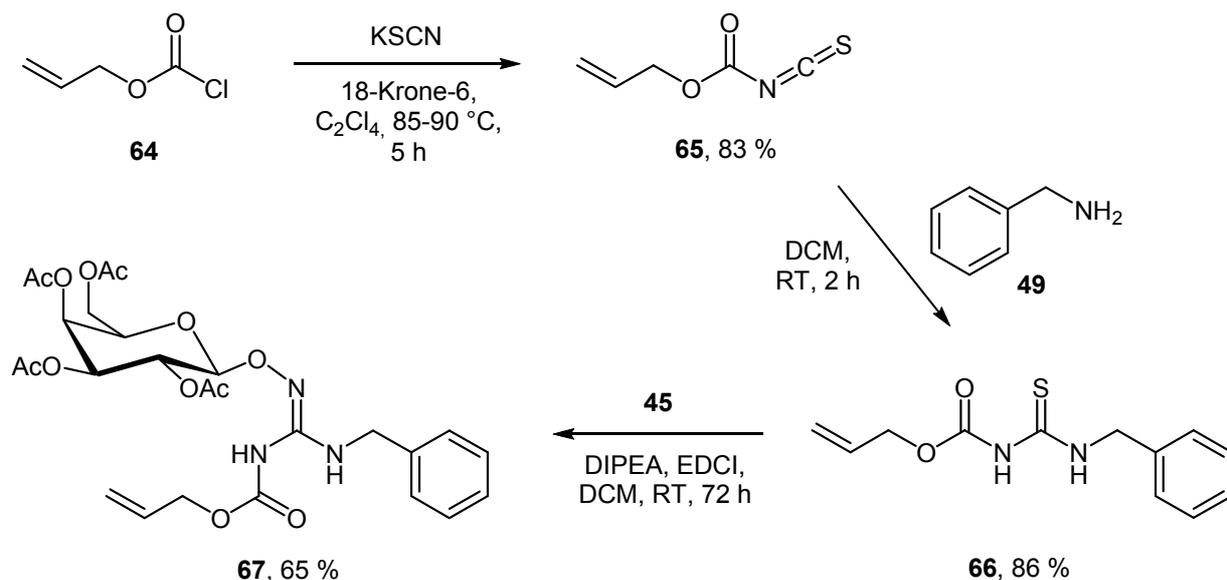


Abbildung 3-17: Synthese der Alloc-geschützten Modellverbindung **67**.

Dem Aufbau des Carbamoylthioharnstoffs **66** mit Benzylamin **49** folgte die Guanidierung mit der peracetylierten 1-Aminooxygalactose **45** zu der gewünschten Modellverbindung **67**. Die Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe zu **54** sollte wie bereits beschrieben mit Dimedon **59** als Allylgruppenakzeptor und Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) als Katalysator in THF durchgeführt werden.¹⁹⁸ LC/MS-Untersuchungen zeigten, dass bei der Reaktion keine Nebenprodukte mit abgespaltenem Galactoserest aufgetreten waren. Bevor das Rohprodukt flashchromatografisch aufgearbeitet wurde, konnten Überschüsse an Dimedon leicht mit verdünnter Ammoniaklösung entfernt werden. Entstandenes Triphenylphosphinoxid wurde flashchromatografisch an Kieselgel entfernt. Eine Deacetylierung infolge der Behandlung mit Ammoniaklösung war nicht eingetreten.

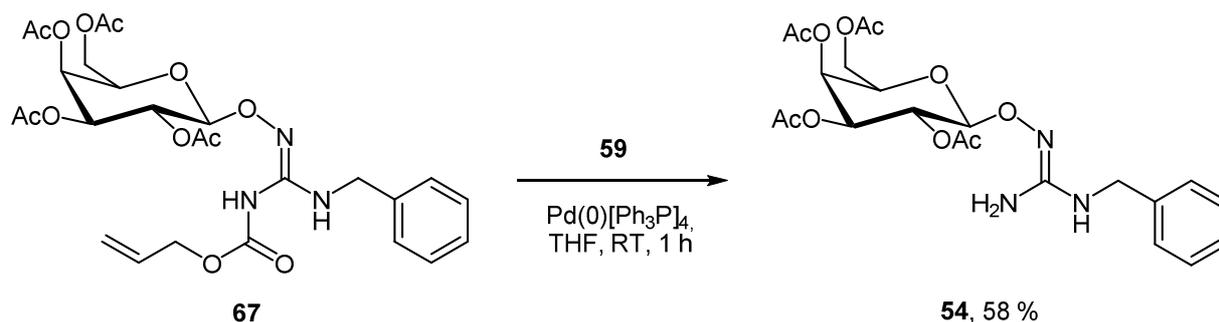


Abbildung 3-18: Palladium-katalysierte Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe zur ersten carbamatfreien Verbindung mit peracetyliertem Monosaccharid **54**.

Dieses erfolgreiche Schutzgruppenkonzept sollte nun auf die Synthese der NOHA-Prodrugs übertragen werden. Da bereits an Verbindung **47** (Kapitel 3.2.2) gezeigt werden konnte, dass die anschließende Deprotektion mit Chlorwasserstoff unter absolutierten Bedingungen die Acetylgruppen des

Galactosyl-Restes nicht beeinträchtigt, konnte von der Orthogonalität des Schutzgruppenkonzeptes ausgegangen werden.

3.2.4 Synthese der β -D-Galactosyl-NOHA-Prodrugs

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Serie verschiedener *O*-Galactosyl-Prodrugs des *N*^ω-Hydroxy-L-arginins synthetisiert werden. Dazu musste das in Kapitel 3.2.3 beschriebene Alloc-basierte Schutzgruppenkonzept von der Modellverbindung auf die NOHA-Prodrugs übertragen werden. Die Synthese der peracetylierten 1-aminooxylierten β -D-Galactose **45** wurde nach einer Vorschrift von SCHADE durchgeführt (**Abbildung 3-19**).¹⁴⁶

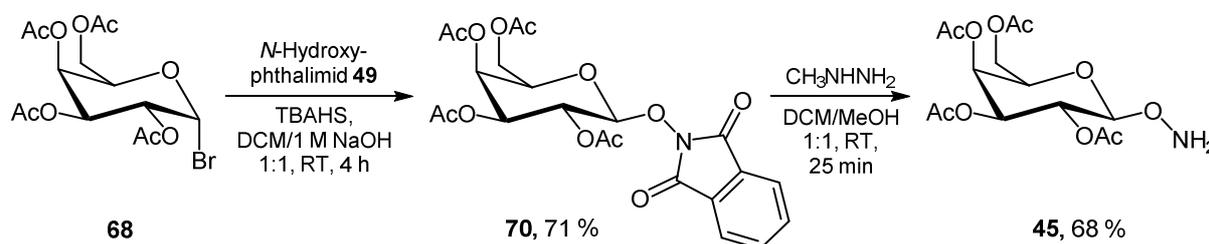


Abbildung 3-19: Synthese von 1-Aminooxy-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranose (**45**).

Dazu wurde in einer Phasentransferkatalyse zunächst die peracetylierte 1-Brom- α -D-galactose **68** in das Phthalimid-geschützte Intermediat **70** überführt. Diese Reaktion läuft nach einem $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus ab, wodurch die Anomerisierung von der α - in die β -Form zu erklären ist. In Kapitel 4.2 sind die spektroskopischen Untersuchungen dieser Anomerisierung detailliert beschrieben. Die Inversion war aus biologischer Sicht von enormer Bedeutung, da nur das β -Anomer von den β -Galactosidasen als Substrat akzeptiert wird.²⁰²

Die Abspaltung einer Phthalimid-Schutzgruppe wird in der Regel mit Methylhydrazin oder Hydrazin durchgeführt. Die Arbeit mit diesen Verbindungen ist allerdings sehr problematisch, da beide Substanzen in Tierversuchen als eindeutig krebserzeugend eingestuft wurden. Zusätzlich sind beide Stoffe nach den REACH-Verordnungen wegen der großen Gefahr für Mensch und Umwelt als besonders besorgniserregend klassifiziert worden. Deshalb sollten Versuche unternommen werden, diese Stoffe zu substituieren. Mit dem deutlich weniger toxischen Methylamin oder Ethanolamin konnte die Phthalimid-Schutzgruppe zwar ebenfalls abgespalten werden, allerdings in geringerer Ausbeute und unter Bildung schwer abtrennbarer Spaltprodukte. Auch die Deacetylierung des Zuckers trat schneller ein, da sowohl Methylamin ($\text{pK}_{\text{a}} = 10,6$) als auch Ethanolamin ($\text{pK}_{\text{a}} = 9,5$) stärkere Basen darstellen als das Hydrazin ($\text{pK}_{\text{a}} = 8,1$).²⁰³ Selbst beim Einsatz von Methylhydrazin oder Hydrazin trat bereits nach kurzer Zeit eine beginnende Deacetylierung des Zuckerrestes ein und so musste die Reaktion bereits nach 25 Minuten mit NaHCO_3 -Lösung gequenched werden.

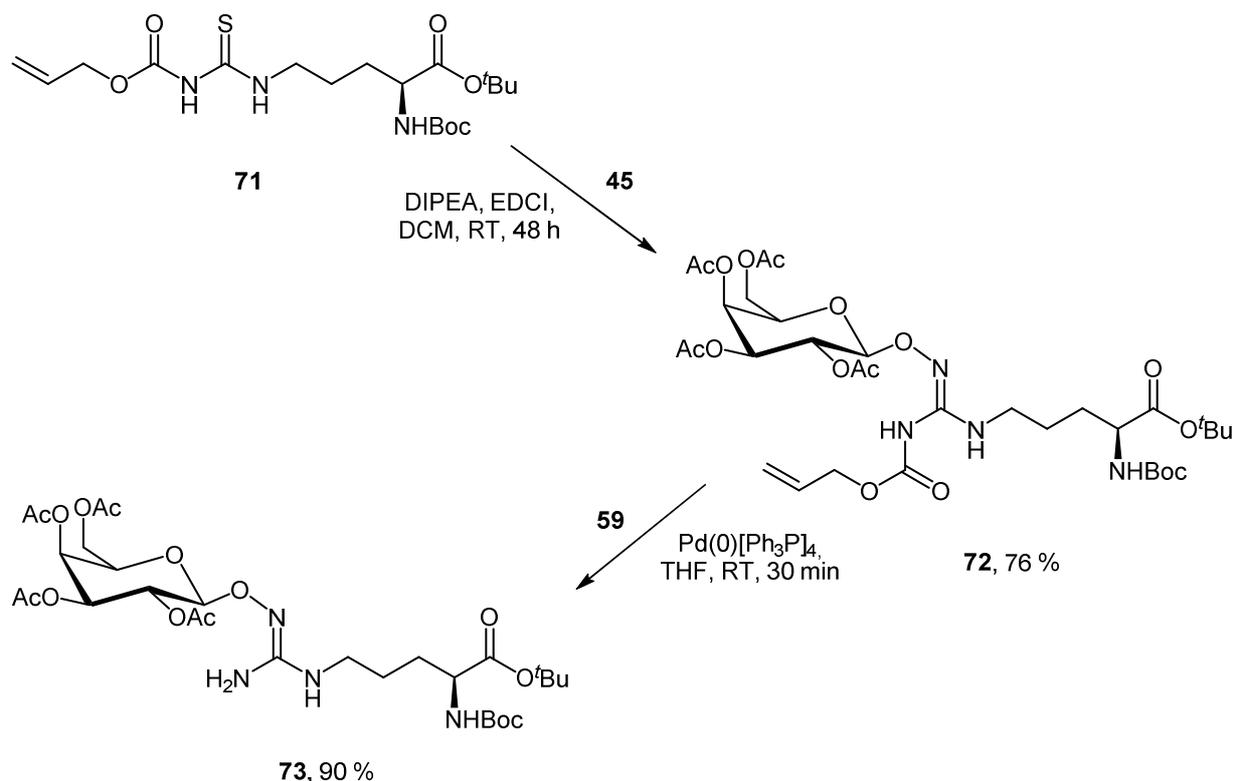


Abbildung 3-20: Synthese der carbamatfreien Prodrug-Vorstufe **73**.

Mit **45** und dem Alloc-geschützten Thio-citrullin **71** konnte zunächst die vollständig geschützte Vorstufe **72** dargestellt werden (**Abbildung 3-20**). Die problemlose Deprotektion der Alloc-Schutzgruppe mit Dimedon und Pd(0) als Katalysator verlief analog zu der Modellverbindung **54** (**Abbildung 3-18**). Die Herausforderung bestand in der finalen Abspaltung der Boc- und *tert*-Butyl-Schutzgruppen, bei der die säurelabile glycosidische Bindung unversehrt bleiben sollte. Dazu musste unter absolutierten Bedingungen gearbeitet werden, indem unter Schutzgasatmosphäre trockenes HCl-Gas in eine Lösung von **73** in absolutem Et₂O geleitet wurde (**Abbildung 3-21**). Eine wichtige Beobachtung war an dieser Stelle, dass anders als die Verbindung **47** (Kapitel 3.2.2) das Prodrug **75** als Dihydrochloridsalz isoliert werden konnte. Eine autokatalytische Spaltung der glycosidischen Bindung bei Kontakt mit Wasser konnte entgegen den Erwartungen nicht beobachtet werden. Demnach verzichtete man auch aus Gründen der Ausbeuteoptimierung auf die Überführung in das Natriumsalz, da bei der Aufnahme von **75** mit NaHCO₃-Lösung nicht selten eine Deacetylierung eintrat. Auch nach wässriger Aufarbeitung von **75** über RP-18-Säulenchromatografie war keine Zersetzung zu beobachten.

Die bei den Modellverbindungen durch basenkatalysierte Esterspaltung als unerwünschte Nebenreaktion eingetretene Deacetylierung des Zuckers sollte im Folgenden für die Darstellung eines komplett entschützten Prodrugs genutzt werden. Dafür sollte anstelle wässriger Hydroxidlösungen mit Natriummethanolat in Methanol gearbeitet werden. Das bei dieser Reaktion präzipitierende deacetylierte Prodrug **76** konnte auf diese Weise problemlos als Natriumsalz isoliert werden. Diese

Verbindung stellt das Prodrug mit dem niedrigsten Substitutionsgrad und dadurch auch mit der höchsten Hydrophilie ($\text{clogP} = -6,1$) dar (**Tabelle 3-1**).

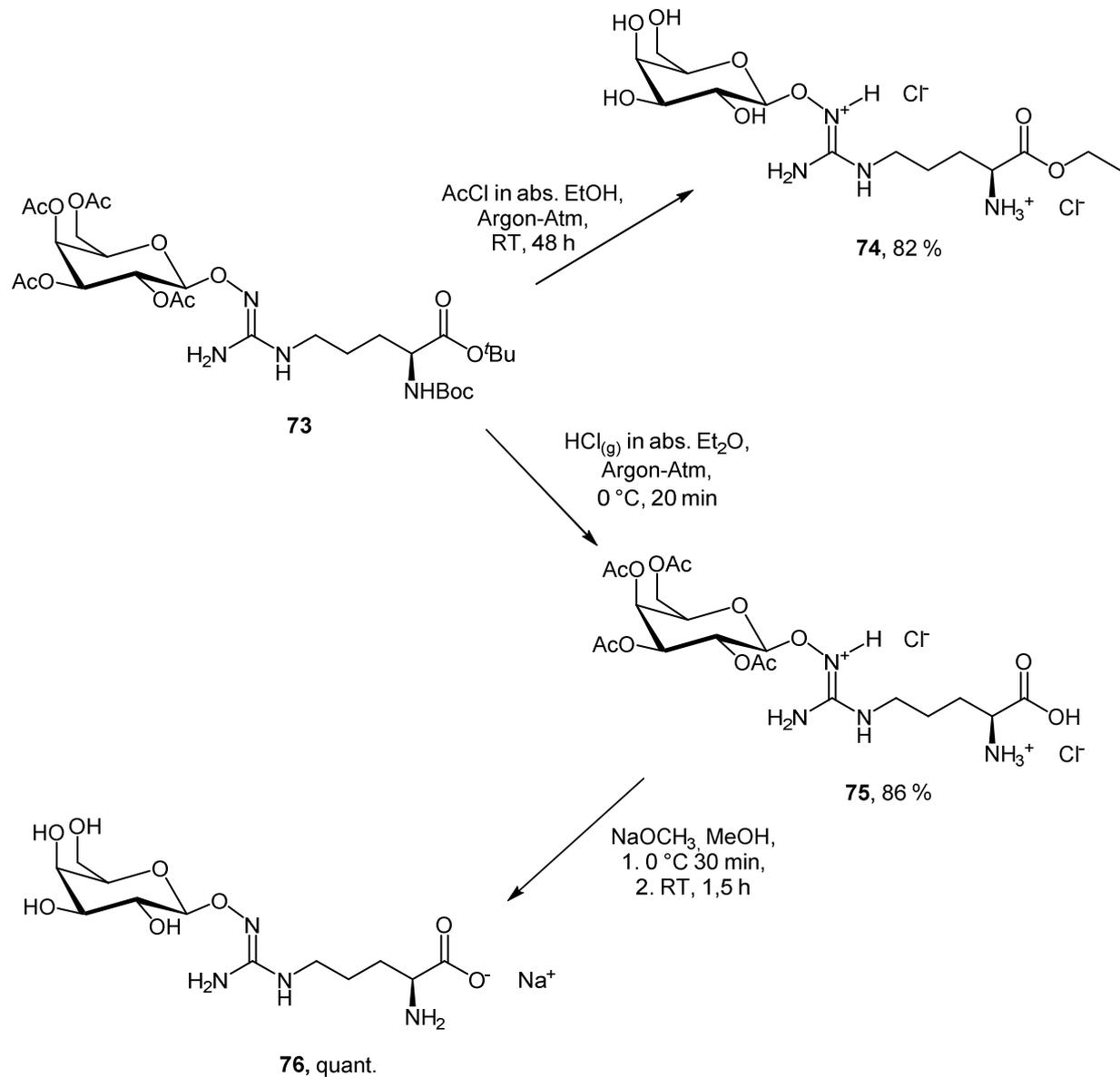


Abbildung 3-21: Finale Synthese der O-galactosylierten NOHA-Prodrugs **74**, **75** und **76**.

Eine weitere Prodrugstrategie bestand in der Veresterung der α -Carboxylgruppe. Dazu sollten ausgehend von der carbamatfreien Vorstufe **73** verschiedene Versuche zur Veresterung der Carbonsäure unternommen werden. Die Veresterung der Carbonsäure sollte die Lipophilie der Prodrugs steigern. Deshalb war es von Interesse, eine Veresterungsstrategie zu entwickeln, bei der die Acetylgruppen des Zuckers erhalten bleiben. Bei einer säurekatalysierten Veresterung der α -Carbonsäure käme es zu einer gleichzeitigen Protonierung des Carbonylsauerstoffs der Acetylgruppen, sodass auch hier Ethanol

nukleophil am Carbonylkohlenstoff angreifen könnte und der tetrahedrale Übergangszustand anschließend unter Freisetzung von Ethylacetat zerfällt. So war es keineswegs überraschend, dass das Einleiten von trockenem Chlorwasserstoff in abs. Ethanol zwar eine sehr effektive Veresterungsmethode darstellte (die Ausbeute für **74** lag bei 96 %), aber automatisch mit einer Deacetylierung einherging.

Deshalb sollte eine schonendere Methode zur Veresterung der α -Carbonsäure unter Erhalt der Acetylgruppen entwickelt werden. Eine Möglichkeit bestand in einer ebenfalls säurekatalysierten Veresterung, bei der HCl allerdings *in situ* gebildet wurde. Durch Zugabe von Acetylchlorid in abs. Ethanol konnte HCl kontrolliert in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge Säurechlorid generiert werden. Leider zeigte sich aber auch bei dieser Methode eine Abspaltung der Acetylgruppen, lieferte aber im Vergleich zu kommerziellem HCl-Gas zugleich eine kostengünstigere Möglichkeit für die Darstellung von Prodrug **74**.

Um einen Ethylester des N^{ω} -Hydroxy-L-arginins mit peracetylierter Galactose darzustellen, musste zunächst ein Ornithin synthetisiert werden, das bereits an der α -Position als Ethylester vorlag. Dazu war es notwendig, die reaktive Aminogruppe in der Seitenkette des Ornithins zu schützen. Aus synthetischer Sicht erfolgte dieser Schritt in Analogie zu der Darstellung der N^{δ} -methylierten Argininderivate **1** und **2**. Demnach überführte man das N^{α} -Boc-geschützte Ornithin **3** an der N^{δ} -Position zunächst in das Phthalimid **24** (**Abbildung 3-5**). Die säurelabile Boc-Schutzgruppe von **24** limitierte bereits an dieser Stelle der Synthese die Möglichkeiten zur Veresterung. Eine technisch elegante Lösung dieser Problematik bestand im Einsatz von Carbonylaktivatoren wie EDCI oder DCC für die Veresterung der α -Carbonsäure. So konnte **24** im Sinne einer Veresterung nach NEISES und STEGLICH problemlos zu dem Ethylester **77** umgesetzt werden.²⁰⁴

Die folgende Abspaltung der Phthalimid-Schutzgruppe mit Hydrazin gestaltete sich als besonders problematisch, da die α -Carboxylgruppe des Ornithins durch die Veresterung stark aktiviert wurde. Ethanol bildete hinsichtlich eines intramolekularen Ringschlusses durch einen nukleophilen Angriff der terminalen Aminfunktion am Carbonylkohlenstoff im Vergleich zur Carbonsäure eine ideale Abgangsgruppe. So kam es bereits während der Hydrazinolyse zu dieser schnellen und unerwünschten Nebenreaktion, bei der autokatalytisch durch Zyklisierung von **78** ein δ -Lactam **79** entstand (**Abbildung 3-22**). Durch die Evaporation des Lösungsmittels im Vakuum wurde diese Zyklisierung weiter begünstigt. Diesem Prozess konnte nur durch eine Verkürzung der Reaktionszeit während der Hydrazinolyse und der sofortigen Umsetzung mit AllocNCS **65** zu dem stabilen Thioharnstoff **80** entgegengewirkt werden. Diese Anpassung verlief zu Ungunsten der Ausbeute, die für beide Reaktionsschritte bei lediglich 40 % lag.

Der Aufbau der Guanidinstruktur zu **81** und die Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe verliefen analog zu den Verbindungen **72** und **73** (**Abbildung 3-20**). Bei der finalen Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit Chlorwasserstoff unter absolutierten Bedingungen blieb der Ethylester bestehen, sodass das NOHA-Prodrug **83** in einer guten Ausbeute von 60 % isoliert werden konnte. Die vollständige Synthese des peracetylierten NOHA-Ethylesters **83** ist in **Abbildung 3-22** dargestellt.

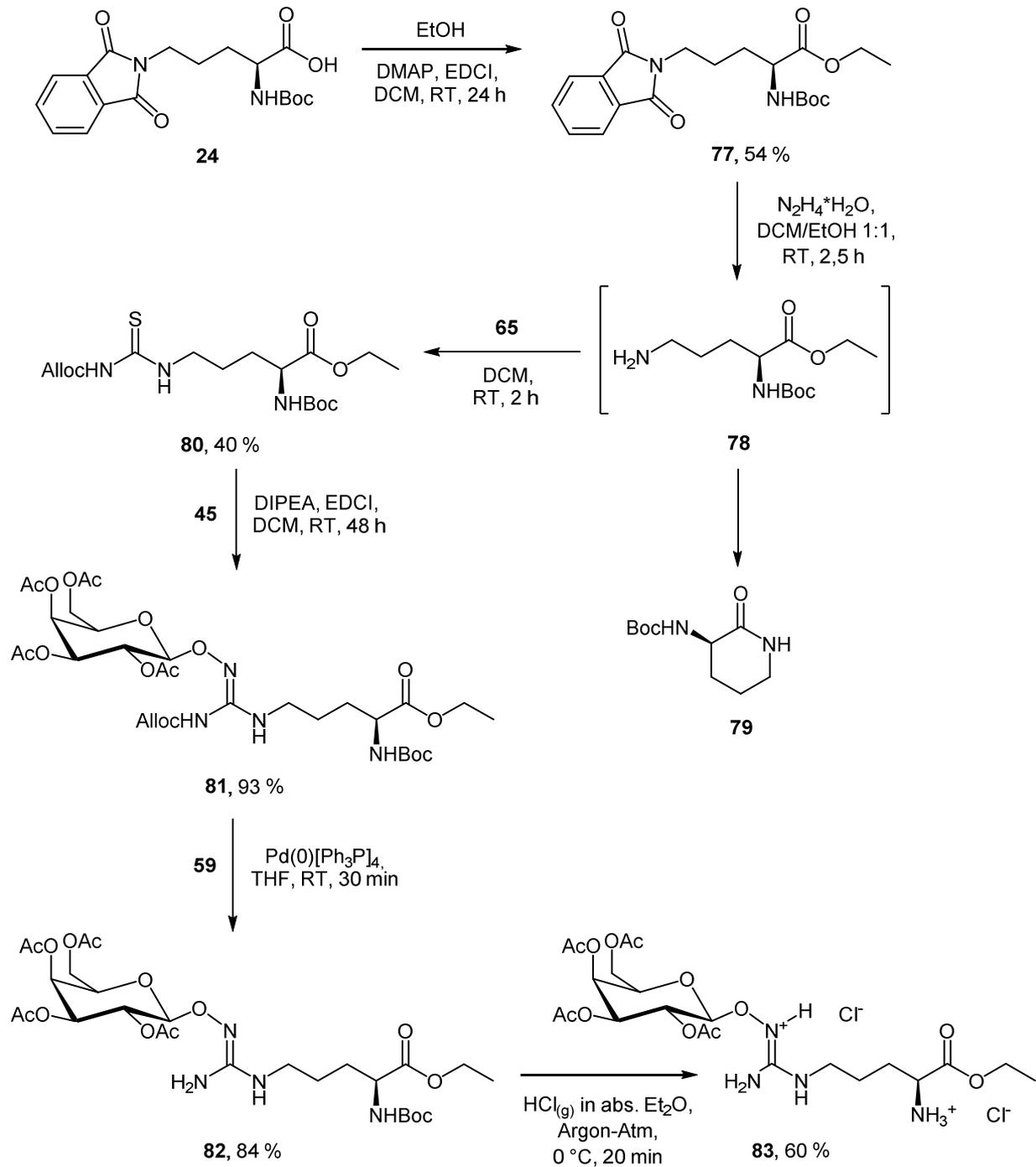


Abbildung 3-22: Synthese des N^{ω} -(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranos-1-yl)oxy-L-arginin-ethylesters **83**. Der Ornithinethylester **78** konnte nicht isoliert werden, stattdessen wurde **78** in Lösung direkt mit AllocNCS **65** in das stabile Thiocitrullin **80** überführt.

3.2.5 Synthese der β -D-Glucosyl-NOHA-Prodrugs

In biologischen Untersuchungen sollte auch der Einfluss verschiedener Monosaccharidsubstituenten auf die enzymatische Aktivierung der Prodrugs durch Glycosidasen getestet werden. Dazu sollte in Analogie zu den in Kapitel 3.2.4 beschriebenen *O*-Galactosyl-Prodrugs eine Serie *O*-Glucosyl-Prodrugs synthetisiert werden.

Die Synthese dafür verlief dabei analog zu den Galactosylderivaten. Auch die Synthese für **45** konnte erfolgreich auf das entsprechende Epimer **86** übertragen werden (**Abbildung 3-23**).

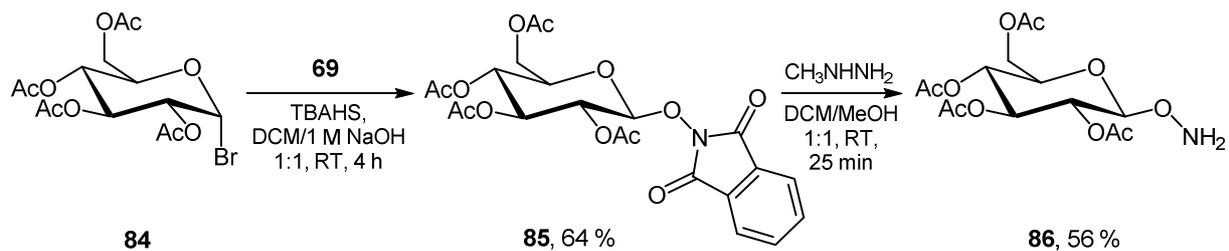


Abbildung 3-23: Synthese von 1-Aminooxy-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranose **86**; TBAHS = Tetrabutylammoniumhydrogensulfat.

In **Abbildung 3-24** ist die gesamte Synthese der *O*-glucosylierten NOHA-Prodrugs dargestellt. Aus den beiden Thiocitrullinen **71** und **80** konnte mit Hydroxylamin **86** die Guanidinstruktur aufgebaut werden. Im Anschluss erfolgte die bereits etablierte Alloc-Abspaltung mit Dimedon **59** unter Pd(0)-Katalyse, gefolgt von der finalen Deprotektion mit Chlorwasserstoff zu den beiden Prodrugs **92** und **93**. Aus Intermediat **89** konnte über säurekatalysierte Veresterung mit Ethanol das Prodrug **91** erhalten werden. Durch Behandlung von **92** mit NaOCH_3 konnte das vollständig entschützte Prodrug **94** dargestellt werden.

Der problemlose Transfer dieser Synthesestrategie auf die Glucosekonjugate könnte die Basis zukünftiger Arbeiten darstellen, in denen weitere NOHA-Prodrugs als Konjugate anderer physiologisch relevanter Monosaccharide zugänglich gemacht werden. In diesem Zusammenhang könnte eine Serie von Mannosekonjugaten für biologische Untersuchungen von Interesse sein. Da die limitierte Bioverfügbarkeit ein generelles Problem bei Arzneistoffen mit Guanidinstruktur darstellt, wäre der Transfer dieser Monosaccharid-basierten Prodrugstrategie auf andere Arzneistoffe eine therapeutisch wertvolle Option.

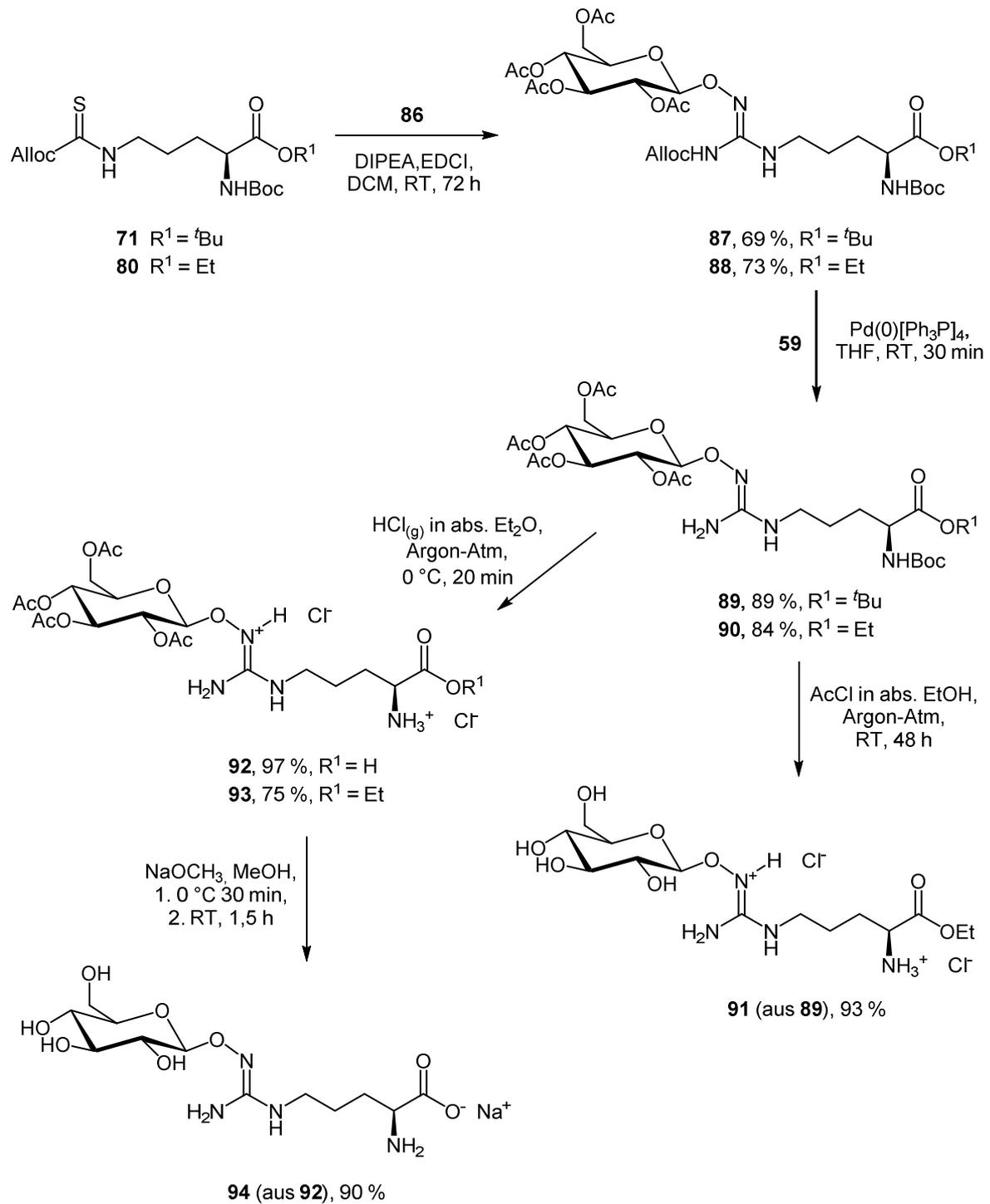


Abbildung 3-24: Übersicht über die Synthese der *O*-glucosylierten NOHA-Prodrugs **91-94**.

3.2.6 Darstellung eines offen-acetalischen NOHA-Prodrugs

Eine vielversprechende Prodrugstrategie für das N^{ω} -Hydroxy-L-arginin wäre eine, die hauptsächlich auf die Aktivierung durch Esterasen aufbaut. Da aber O-acylierte Hydroxyguanidin-Prodrugs synthetisch nicht zugänglich sind und die Monosaccharidkonjugate auf die Aktivierung durch Glycosidasen angewiesen sind, war das bereits erwähnte Prodrugkonzept des Tenofovirdisoproxils **38** und Cefpodoximproxetils **37** in den Vordergrund gerückt. Eine solche Modifikation des NOHAs wäre aus synthetischer und aus biologischer Sicht von höchstem Interesse (**Abbildung 3-25**). Eine erfolgreiche Darstellung offen-acetalischer NOHA-Prodrugs über die in den vorherigen Kapiteln beschriebene Technik würde zusätzlich einen wichtigen *proof-of-concept* liefern. Alle bisherigen Versuche, ein solches Konzept auf Hydroxyguanidine zu übertragen, scheiterten bereits an der Darstellung der benötigten Hydroxylamine. Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, eine Lösung für diese synthetische Herausforderung zu finden.

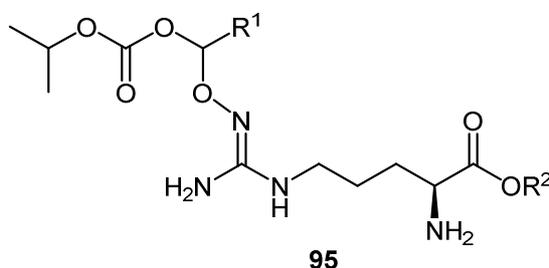


Abbildung 3-25: Schematische Darstellung eines NOHA-Prodrugs mit einer offenen Acetalstruktur. $R^1 = \text{H}$ oder CH_3 ; $R^2 = \text{H}$ oder Et.

Das bereits bei den Zuckerderivaten etablierte Konzept, die Hydroxylaminfunktion über ein Phthalimid einzuführen, erschien naheliegend. In der Vergangenheit wurde erfolglos versucht, einen Pivalinsäurechlormethylester mit *N*-Hydroxyphthalimid umzusetzen.¹⁴⁶ Beim Tenofovirdisoproxil **38** hingegen konnte die Phosphonsäure durch Behandlung mit Chlormethylisopropylcarbonat **96** unter Basenkatalyse in ein Acetal überführt werden.²⁰⁵ SINGH *et al.* haben das Carbapenem-Antibiotikum Ertapenem in eine Vielzahl acetalischer Prodrugs überführen können. Dabei haben sie ebenfalls den Sauerstoff einer Carbonsäure in ein Acetal eingebunden. Diese Alkylierungen des Sauerstoffs verliefen besonders gut in einem polar aprotischen Lösungsmittel wie DMF unter Verwendung von DIPEA als Hilfsbase und BTEAC als Hilfsreagenz.^{206,207} Da das *N*-Hydroxyphthalimid ebenfalls acide Eigenschaften aufwies, erschien diese Strategie übertragbar zu sein.

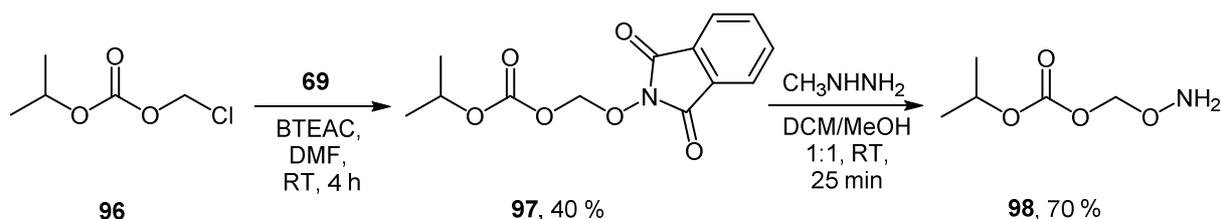


Abbildung 3-26: Synthese von Aminoxyethylisopropylcarbonat **98**.

Dazu wurde Chlormethylisopropylcarbonat **96** in einer nukleophilen Substitutionreaktion zu dem Phthalimid **97** umgesetzt. Durch anschließende Behandlung mit Methylhydrazin konnte aus dem Phthalimid **97** das entsprechende Hydroxylamin **98** erhalten werden (**Abbildung 3-26**). Diese nicht lagerstabile Verbindung musste für alle folgenden Synthesen kurz vor der weiteren Umsetzung hergestellt werden. Eine Möglichkeit, die Stabilität von **98** zu erhöhen, wäre die Überführung in das Hydrochlorid gewesen. Um dieses Hydroxylamin für die Synthese weiterer NOHA-Prodrugs einzusetzen, sollte zunächst die Kompatibilität des vorhandenen Schutzgruppenkonzepts an einer einfachen Modellverbindung gezeigt werden (**Abbildung 3-27**). Dazu musste zunächst aus dem Thioharnstoff **66** und dem Aminoxyethylisopropylcarbonat **98** ein Guanidin aufgebaut werden. Diese Reaktion verlief problemlos, wenn auch in einer geringeren Ausbeute als bei den analogen Zuckerkonjugaten. Die anschließende Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe unter den bereits beschriebenen Bedingungen zu dem carbamatfreien Guanidin **100** war ebenfalls in moderater Ausbeute möglich.

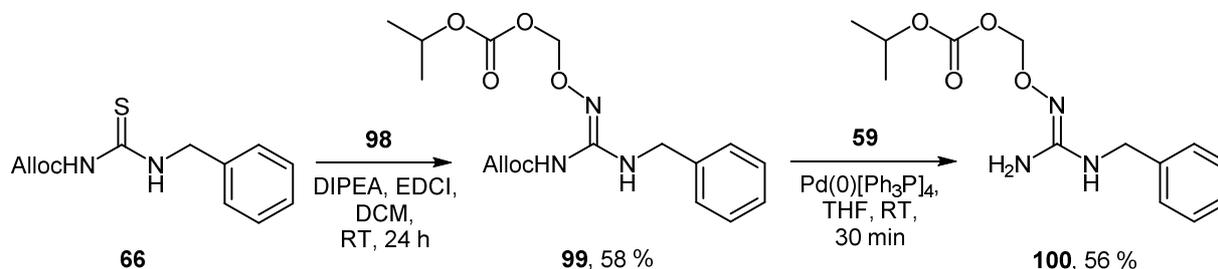


Abbildung 3-27: Synthese eines *O*-Methylisopropylcarbonat-Prodrugs **100** als Modellverbindung.

Nachdem an der Modellverbindung gezeigt werden konnte, dass sich die Hydroxyguanidinfunktion erfolgreich in ein offenes Acetal einbauen ließ und das bereits bei den Zuckerkonjugaten etablierte Schutzgruppenkonzept problemlos übertragbar war, sollte diese Strategie nun auf das *N*^ω-Hydroxy-L-arginin angewendet werden. Dazu wurde in Analogie zu den *O*-glycosidischen NOHA-Prodrugs verfahren, indem zunächst das Thiocitrullin **71** mit dem Hydroxylamin **98** zu dem vollgeschützten Hydroxyguanidin **101** umgesetzt wurde (**Abbildung 3-28**). Wie bereits an der Modellverbindung gezeigt werden konnte, sollte auch an dieser Verbindung die Alloc-Schutzgruppe Palladium-katalysiert abgespalten werden. Der letzte Schritt in der Synthese des Prodrugs **103** stellte sich als besonders kritisch heraus, da Kohlensäureester besonders empfindlich gegenüber säurekatalysierter Hydrolyse sind. Folglich musste bei der finalen Deprotektion mit Chlorwasserstoff besonders auf Feuchtigkeitsausschluss geachtet werden. Prodrug **103** konnte überraschenderweise ebenfalls als Dihydrochloridsalz direkt nach Evaporation des mit Chlorwasserstoff gesättigten Diethylethers in Wasser aufgenommen und säulenchromatografisch an RP-18-Kieselgel aufarbeitet werden. Das so als stark hygroskopisches Dihydrochlorid isolierte Prodrug **103** zeigte ebenfalls entgegen den Erwartungen keine Zersetzung in Wasser. Genauere flüssigchromatografische HPLC-Stabilitätsuntersuchungen wurden an dieser Verbindung bisher jedoch nicht durchgeführt, weshalb die Aussagen über die Stabilität der Verbindung noch mit Vorsicht bewertet werden sollten.

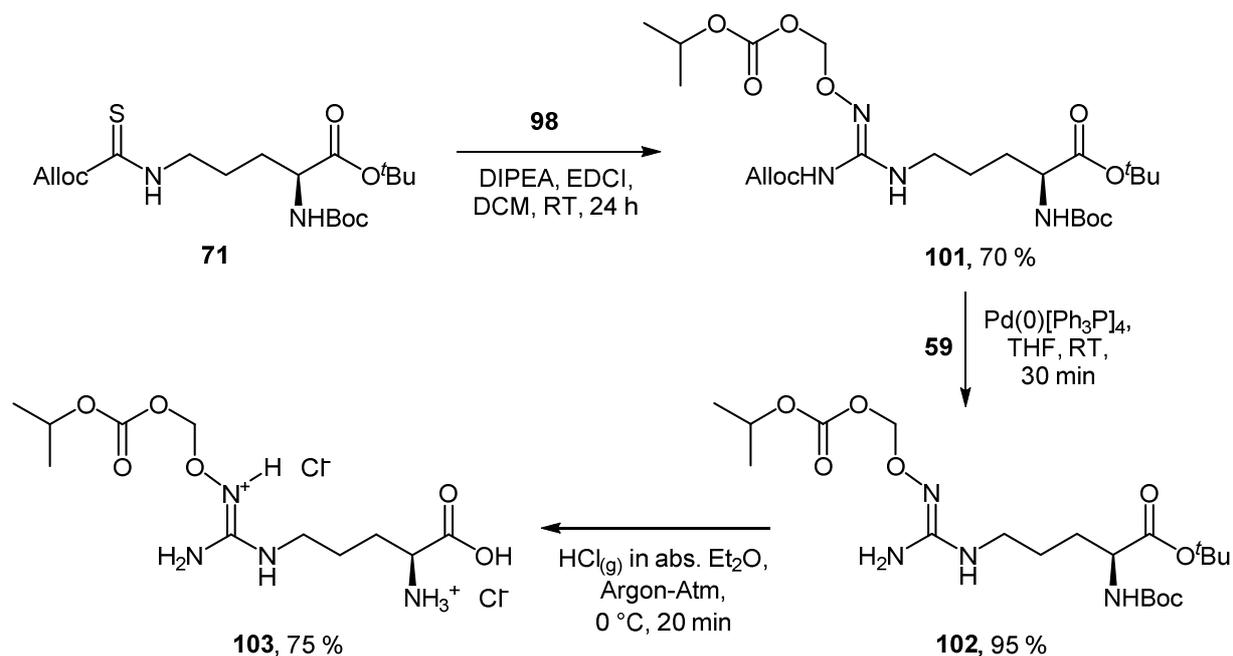


Abbildung 3-28: Darstellung des ersten *O*-Methylisopropylcarbonat-substituierten NOHA-Prodrugs **103**.

3.2.7 Versuche zur Darstellung *O*-acylierter Prodrugs

Es ist bisher noch nicht gelungen, ein *O*-acylisches NOHA-Prodrug darzustellen. Alle Versuche, NOHA direkt zu acylieren oder entsprechende Hydroxylamine zum Guanidinaufbau zu synthetisieren, blieben erfolglos. Bislang konnte nur von ZINNER über die erfolgreiche Synthese dieser *O*-Acylhydroxylamine berichtet werden.^{208,209}

Bei der Synthese des Phthalimids **97** ist ein für die mögliche Darstellung eines Acyl-substituierten Prodrugs interessantes Nebenprodukt **104** entstanden. Durch den nukleophilen Angriff des deprotonierten *N*-Hydroxyphthalimids am Carbonylkohlenstoff des Chlormethylisopropylcarbonats **96** ist unter Formaldehydabspaltung ein desmethyliertes *N*-(Isopropoxycarbonyloxy)phthalimid **104** entstanden (**Abbildung 3-29**).

Bei der anschließenden Hydrazinolyse mit Hydrazinhydrat oder Methylhydrazin zeigte sich allerdings, dass nicht die gewünschte Abspaltung des Phthalimids zu **105** eintrat. Stattdessen kam es durch den nukleophilen Angriff des Hydrazins am Carbonylkohlenstoff des Kohlensäureesters lediglich zur Bildung des entsprechenden Kohlensäure(methyl)hydrazids. Dieses ungewünschte Produkt der Hydrazinolyse konnte eindeutig NMR-spektroskopisch anhand seiner drei aciden NH-Protonen identifiziert werden.

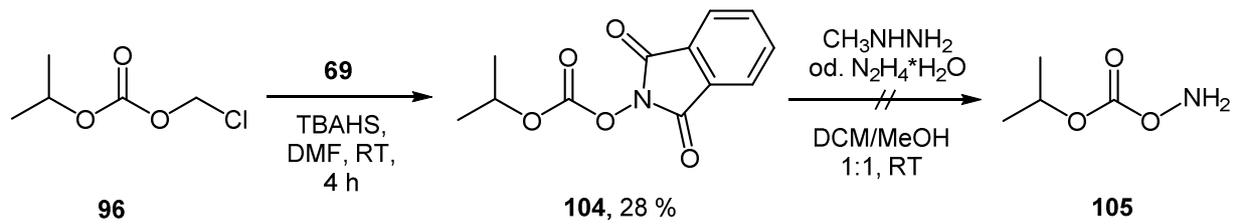


Abbildung 3-29: Versuch zur Darstellung eines Aminoxyisopropylcarbonats **105**.

In vorherigen Kapiteln wurde bereits beschrieben, dass Hydrazin durch seinen α -Effekt ein ideales Reagenz lieferte, um an beiden Carbonylgruppen des Phthalimids anzugreifen. Der Angriff am Kohlenstoffatom des Kohlensäureesters erschien aus energetischer Sicht begünstigt zu sein, sodass auch der Einsatz anderer nukleophiler Additive wenig erfolgsversprechend gewesen wäre. So wurden schlussendlich auch diese Arbeiten zur Darstellung eines *O*-acylierten Prodrugs eingestellt.

3.2.8 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Serie verschieden substituierter *O*-glycosidischer NOHA-Prodrugs synthetisch zugänglich gemacht werden. Diese Derivatisierungen dienten zum einen der Stabilisierung der *N*-Hydroxyguanidinfunktion aus chemischer Sicht und zum anderen zur Verbesserung des pharmakokinetischen Profils des *N*^ω-Hydroxy-L-arginins. Durch die Veresterung der Aminosäure und Acetylierung des Monosaccharids sollte vor allem die orale Bioverfügbarkeit hinsichtlich passiver Diffusionswege erhöht werden, wohingegen die Prodrugs mit niedrigem Substitutionsgrad **76** und **94** Zucker- oder Aminosäuretransporter adressieren könnten.

In Hinblick auf carbamatfreie Prodrugs hat sich das Alloc-basierte orthogonale Schutzgruppenkonzept als besonders effizient bewiesen. Die schonende Palladium-katalysierte Deprotektion dieser Guanidin-Schutzgruppe konnte an allen Verbindungen problemlos gezeigt werden. Zudem war es möglich, entgegen ersten Erwartungen alle NOHA-Prodrugs zunächst als Dihydrochloridsalze zu isolieren. Eine befürchtete autokatalytische Hydrolyse der glycosidischen Bindung war bei keiner der Verbindungen zu beobachten. Alle synthetisierten *O*-glycosidischen NOHA-Prodrugs sind in **Tabelle 3-1** dargestellt.

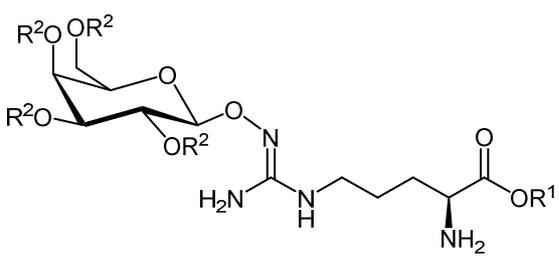
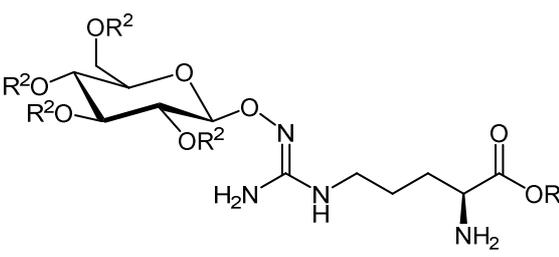
| <i>O</i> -galactosylierte NOHA-Prodrugs | | | <i>O</i> -glucosylierte NOHA-Prodrugs | | |
|--|----------------|----------------|---|----------------|----------------|
|  | | |  | | |
| Prodrug | R ¹ | R ² | Prodrug | R ¹ | R ² |
| 74 | Et | H | 91 | Et | H |
| 75 | H | Ac | 92 | H | Ac |
| 76 | H | H | 93 | Et | Ac |
| 83 | Et | Ac | 94 | H | H |

Tabelle 3-1: Übersicht aller im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Monosaccharid-konjugierten NOHA-Prodrugs.

Zudem war es gelungen, ein Prodrug zu synthetisieren, dessen *N*-Hydroxyguanidinfunktion nicht Teil eines glycosidischen Acetals war, sondern als offenkettige Acetalstruktur vorlag (**Abbildung 3-30**). Die Inspiration dazu waren Arzneistoffe wie Tenofoviridisoproxil **38** oder Cefpodoximproxitel **37**, bei denen ein solches Prodrugkonzept bereits erfolgreich angewendet wurde.

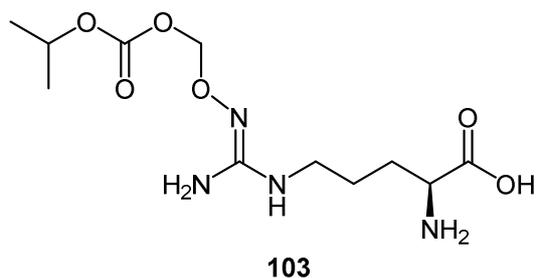


Abbildung 3-30: O-Methylisopropylcarbonat-substituiertes NOHA-Prodrug **103** mit offen-acetalischer Struktur.

An Verbindung **103** wurden bisher noch keine Stabilitätsuntersuchungen und biologische Testungen hinsichtlich der NO-Freisetzung durchgeführt. Wenn sich in zukünftigen Arbeiten zeigt, dass **103** einen guten Arzneistoffcharakter aufweist, wäre dieses, lediglich durch Esterasen zu aktivierende, Prodrug besonders attraktiv. Aus synthetischer Sicht sollte auch die Veresterung der α -Carboxylgruppe weiter verfolgt werden, die im Rahmen dieser Arbeit bereits an einer Vorstufe (**118**) erfolgte (Kapitel 8.1.2.2.8).

3.3 Synthese von N-(4-Aminobutyl)-N'-(2-methoxyethyl)guanidin Dihydrochlorid (AbMEG)

3.3.1 Einleitung

Bei dem decarboxylierten Argininderivat N-(4-Aminobutyl)-N'-(2-methoxyethyl)guanidin (AbMEG) handelt es sich um einen selektiven und potenten Hemmstoff der hDDAH-1, der von SCHADE synthetisiert wurde.¹⁴⁶ Da im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zur Cokristallisation der DDAH-1 mit dieser Verbindung unternommen werden sollten (Kapitel 6), musste AbMEG dazu auch aus synthetischer Sicht modifiziert werden. Bisher wurde AbMEG nach finaler Deprotektion mit TFA und Thioanisol als Bistrifluoracetatsalz isoliert. Um den möglichen Einfluss verschiedener Salzformen dieses hDDAH-1-Hemmstoffs bei den Cokristallisationsscreenings zu untersuchen, sollte die Verbindung auch als Dihydrochloridsalz dargestellt werden.

3.3.2 Synthesestrategie (Umsalzen)

Die grundlegende Idee zum Überführen des Bistrifluoracetatsalzes **9** in das entsprechende Dihydrochloridsalz **10** war die Verwendung eines starken Kationenaustauschers vom Typ Amberlite IR 120 H⁺-Form, der auf seiner Matrix aus Styrol-DVB Sulfonsäuren trägt. Dazu wurde AbMEG **9** zunächst in *Aqua bidest.* gelöst und anschließend die Lösung auf das vorbereitete Austauschermaterial überführt. Die freigewordene Trifluoressigsäure konnte durch mehrfaches Spülen mit *Aqua bidest.* und pH-Kontrolle des Eluats vollständig entfernt werden. Die Elution von **10** gestaltete sich hingegen schwieriger als zunächst angenommen, da es sich beim AbMEG um eine Verbindung mit stark basischer Guanidinstruktur handelte die starke Wechselwirkungen mit dem Austauschermaterial ausbildete. Erst nach Elution mit 3 N HCl konnte eine Ausbeute von 52 % erzielt werden (**Abbildung 3-31**). Da die ¹H-NMR-Spektren der in beiden Fällen zweifach-protonierten Verbindung sowohl in DMSO-*d*₆ als auch in D₂O keinen Beweis für die Überführung in eine neue Salzform liefern konnten und auch die identischen

LC/MS-Spektren bei dieser Problematik nicht von Nutzen waren, musste nach einer alternativen Analytik gesucht werden. Einzig das ^{13}C -NMR-Spektrum der beiden unterschiedlichen AbMEG-Salze ließ erahnen, dass das Dihydrochloridsalz **10** tatsächlich vorlag, da im protonenkoppelten ^{13}C -NMR-Spektrum im Falle des TFA-Salzes **9**, nicht aber beim HCl-Salz **10**, die beiden Kohlenstoffatome des Anions mit ihrer Fluoraufspaltung beobachtet werden konnten.

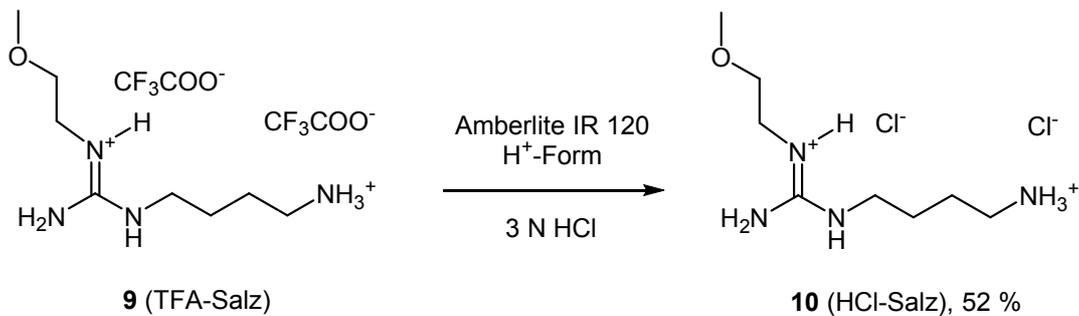


Abbildung 3-31: Umsalzen von AbMEG in das Dihydrochloridsalz **10**.

Eine argentometrische Titration mit potentiometrischer Endpunkterkennung des Dihydrochloridsalzes **10** wäre eine alternative Möglichkeit gewesen, die Chlorid-Ionen selektiv zu quantifizieren. Diese Analytik wurde aber aufgrund des hohen Substanzbedarfs nicht weiter verfolgt. Daher wurden weitere ^{19}F - und ^{35}Cl -NMR-spektroskopischen Untersuchungen durchgeführt, die ein sehr empfindliches Ergebnis lieferten. Im ^{19}F -NMR-Spektrum des Dihydrochloridsalzes **10** konnte kein Fluor nachgewiesen werden, wohingegen in anschließenden quantitativen ^{35}Cl -NMR-Messungen 91 % des Chlorids wiedergefunden werden konnte (Kapitel 4.1).

3.4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Strategien zur Modulation endogener NO-Level untersucht werden. Da eine Vielzahl der an der NO-Regulation beteiligten Enzyme L-Arginin oder dessen Derivate als Substrate umsetzen, sollten aus synthetischer Sicht Konzepte zur Derivatisierung des L-Arginins erarbeitet werden. Dabei standen folgende Optionen im Vordergrund:

- N^{δ} -Methyl-derivate des L-Arginins und L-Ornithins
- Entwicklung von Prodrugs des N^{ω} -Hydroxy-L-arginins.

Die Entwicklung einer linearen Synthese für N^{δ} -Methyl-L-arginin **1** und -ornithin **2** ist seit kurzem wieder von besonderem biologischen Interesse, da das N^{δ} -Methyl-L-arginin erstmals im Menschen nachgewiesen werden konnte.⁷³ Dazu wurden bereits in der Vergangenheit wichtige Vorarbeiten geleistet, in denen das N^{δ} -Methyl-L-arginin massenspektrometrisch in Gegenwart anderer methylierter Arginine wie ADMA und NMMA selektiv erfasst werden konnte.²¹⁰ Die in dieser Arbeit beschriebene Synthese für optisch reines **1** und **2** stellt einen besonders wichtigen Fortschritt in der Arginin-Chemie dar, da für zukünftige biologische Untersuchungen zum Verständnis dieser posttranslationalen Modifikation die natürlich vorkommenden L-Aminosäuren essentiell sind. Im Vordergrund stehen dabei

besonders der (patho)physiologische Effekt und die Frage, ob N^{δ} -Methyl-L-ornithin als potentieller Metabolit ebenfalls im Menschen nachgewiesen werden kann.

Die synthetische Weiterentwicklung bestand in der Optimierung des Schutzgruppenkonzeptes der bisher beschriebenen Synthesestrategien, um die Enantiomerenreinheit beider Produkte während der gesamten Synthese sicherzustellen. Durch den Austausch der bisher eingesetzten Tosyl-Schutzgruppe durch die wesentlich effizientere 2-NBS-Schutzgruppe konnte das Racemisierungsrisiko auf ein Minimum gesenkt werden. Die Deprotektion mit Thiophenol bei Raumtemperatur erwies sich als besonders schonende Methode ganz besonders im Vergleich zum bisher eingesetzten Bromwasserstoff in Eisessig, der für die Abspaltung der Tosyl-Schutzgruppen ein essentielles Reagenz darstellte. Die selektive Monomethylierung der N^{δ} -Position konnte ebenfalls an beiden Verbindungen problemlos gezeigt werden. Durch die universelle Vorstufe **33** konnte eine Schlüsselverbindung dargestellt werden, aus der beide Zielverbindungen **1** und **2** enantiomerenrein zugänglich waren. Dabei wurden **1** in insgesamt zehn Stufen in einer Gesamtausbeute von 20 % und **2** in acht Stufen in einer Gesamtausbeute von 21 % dargestellt.

Eine therapeutisch interessante Strategie zur Erhöhung endogener NO-Level ist der Einsatz von NO-Donoren wie Prodrugs des N^{ω} -Hydroxy-L-arginins (NOHA). Besonders bei kardiovaskulären Erkrankungen, die oftmals mit NO-Defiziten einhergehen, erschien dieses Konzept attraktiv. Um Stickstoffmonoxid allerdings dort freizusetzen, wo es benötigt wird, musste der Arzneistoffcharakter des N^{ω} -Hydroxy-L-arginins durch verschiedene Prodrugstrategien verbessert werden. Dabei hatte sich bereits in vorausgegangenen Arbeiten gezeigt, dass besonders die *O*-Alkylierung der *N*-Hydroxyguanidinfunktion die hydrolytische und oxidative Stabilität positiv beeinflusste. Dieses Konzept wurde aber, aufgrund möglicher Interaktionen infolge einer Monooxygenase-abhängigen Aktivierung, nicht weiter verfolgt. Auch die *N*-Acylierung in Form von Carbamaten zeigte sich aufgrund gescheiterter *in vitro* Bioaktivierung als wenig effektiv. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit ein carbamatfreier Ansatz erarbeitet werden, bei dem der Sauerstoff der *N*-Hydroxyguanidinfunktion gleichzeitig Teil einer Acetalstruktur war. Darauf aufbauend konnten verschiedene *O*-glycosidische Prodrugs von NOHA in Form von Galactose- oder Glucosekonjugaten synthetisiert werden, die aufgrund der toxikologisch unbedenklichen Monosaccharide als Abgangsgruppen besonders attraktiv erschienen. Das dafür an einfachen Modellverbindungen etablierte neue orthogonale Schutzgruppenkonzept konnte auf die Darstellung aller Prodrugs erfolgreich übertragen werden. Durch die Palladium-katalysierte Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe waren alle Verbindungen ohne Carbamatstruktur zugänglich. Die finale Deprotektion der α -Aminosäurefunktion mit Chlorwasserstoff unter absolutierten Bedingungen zeigte sich als besonders schonend hinsichtlich des Erhalts der glycosidischen Bindung. Die Prodrugs **83** und **93** weisen durch Veresterungen den höchsten Substitutionsgrad auf und sollen passive Diffusionswege adressieren, wohingegen die vollständig entschützten Prodrugs **76** und **94** über aktiven Transport via Zucker- oder Aminosäuretransporter in Zellen aufgenommen werden können. Mit der oben beschriebenen Synthesestrategie für die Zuckerkonjugate ließ sich auch ein Prodrug mit einer offenen Acetalstruktur synthetisieren (**103**), dessen Prodrugkonzept bereits an zugelassenen Arzneistoffen wie dem Tenofoviridisoproxil **38** erfolgreich gezeigt werden konnte. Diese Verbindung war sowohl aus biologischer Sicht als auch ganz besonders aus der synthetischen Perspektive ein wichtiger *proof-of-concept*, da gezeigt werden konnte, dass sich das Synthesekonzept auch auf nicht-zyklische Acetale übertragen ließ.

In einer parallel angefertigten Arbeit von GUDD konnte in einem zellulären Testsystem bewiesen werden, dass alle im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten *O*-Galactosyl- und *O*-Glucosyl-NOHA-Prodrugs Stickstoffmonoxid freisetzen. Dabei ließ sich eine Tendenz erkennen, bei der die Glucosederivate demnach mehr NO freisetzen als die Galactosederivate. Des Weiteren zeichnete sich ab, dass die höher substituierten Derivate hinsichtlich der NO-Freisetzung die effektiveren Prodrug-Kandidaten darstellten, wobei der Effekt nicht signifikant war. Auch der postulierte Mechanismus der Bioaktivierung konnte *in vitro* mit unspezifischen Esterasen und verschiedenen Glycosidasen belegt werden.²¹¹

In zukünftigen Arbeiten sollte *in vivo* gezeigt werden, ob die neuen NOHA-Prodrugs effektive NO Donoren mit einem realistischen Marktpotential darstellen. Hier ist besonders die Verbindung **103** zu nennen, die bisher noch nicht biologisch untersucht worden ist und möglicherweise das attraktivste Prodrug darstellen könnte. Hier wären auch aus synthetischer Sicht weitere Modifikationen denkbar, wie z.B. die Veresterung der α -Carbonsäure oder das Überführen der *N*-Hydroxyguanidinfunktion in ein höher substituiertes Acetal oder ein Ketal.

4 SPEKTROSKOPIE

4.1 Quantifizierung von Chlorid mittels ^{35}Cl -NMR-Spektroskopie

Da bis auf die Verbindungen **76** und **94** alle Prodrugs als Dihydrochloridsalze vorliegen und auch das N^{δ} -Methyl-L-arginin und -ornithin durch finale Deprotektion mit Chlorwasserstoff als Dihydrochloridsalze isoliert wurden, war eine Quantifizierung der Chloridionen als Beweis für die zweifache Protonierung wichtig. Beim AbMEG sollte ebenfalls das Umsalzen zum Dihydrochloridsalz verifiziert werden (Kapitel 3.3.2).

Eine Technik zur Quantifizierung von Chloridionen ist die NMR-spektroskopische Messung des ^{35}Cl -Kerns. Da sowohl das ^{35}Cl - als auch das ^{37}Cl -Isotop NMR-aktiv sind, ist die Messung des ^{35}Cl -Kerns aufgrund seiner größeren natürlichen Häufigkeit von ca. 75 % sinnvoll. Die große Schwierigkeit bei der Messung des ^{35}Cl -Kerns ist seine schnelle Quadrupol-Relaxation, die in der Regel zu sehr breiten Signalen bis in den kHz-Bereich führt.²¹² Die Erfassung von organisch gebundenem Chlor ist besonders schwierig, da die schnelle Relaxation hier besonders stark ausgeprägt ist.²¹³ Durch den Einsatz der *solid state* NMR-Technik bei ^{35}Cl -Messungen, bei der die Probe als Feststoff vorliegt, verläuft die Relaxation der Kerne langsamer.^{213–215} In der Literatur wurde bereits über die Quantifizierung von Chlorid in wässrigen Lösungen berichtet,²¹⁶ deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit alle ^{35}Cl -NMR-Messungen mit gelösten Proben in D_2O durchgeführt, d.h. es wurden ausschließlich Chloridsalze gemessen. Zur Quantifizierung des Chlorids wurde zunächst eine Dreipunktkalibrierung mit NaCl in D_2O vorgenommen (**Abbildung 4-1**).

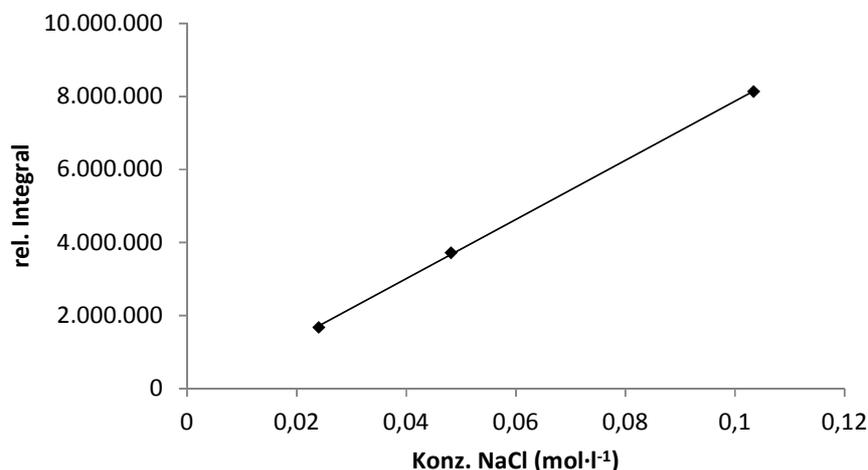


Abbildung 4-1: Beispiel einer ^{35}Cl -spektroskopischen Dreipunktkalibrierung mit NaCl in D_2O . Jede Konzentration wurde einfach bestimmt, wobei jede Einzelmessung eine Akkumulation von 3072 scans darstellt. Auf der Ordinate sind dimensionslose Integrale der entsprechenden Signale aufgetragen ($R^2 = 0,9998$, $n = 1$, Messzeit pro Spektrum = 19 min 42 s).

Alle vermessenen Proben wurden in einer Konzentration von 0,04-0,06 M in D₂O gelöst. Die Chlorid-Wiederfindung lag bei allen Verbindungen in einem Bereich von 85 % bis hin zu annähernd quantitativen 99 % (**Abbildung 4-2**). Daher kann angenommen werden, dass sowohl die Guanidinderivate als auch die weniger basischen *N*-Hydroxyguanidine in zweifach-protonierter Form als Dihydrochloridsalze vorliegen. Die ³⁵Cl-NMR-Spektroskopie stellt also eine effektive Alternative zur volumetrischen Titration für die Chlorid-Quantifizierung in ionischen Verbindungen dar.

| Verbindung | Wiederfindung (%) |
|------------|-------------------|
| 1 | 91 |
| 75 | 95 |
| 91 | 85 |
| 103 | 99 |
| 10 | 91 |

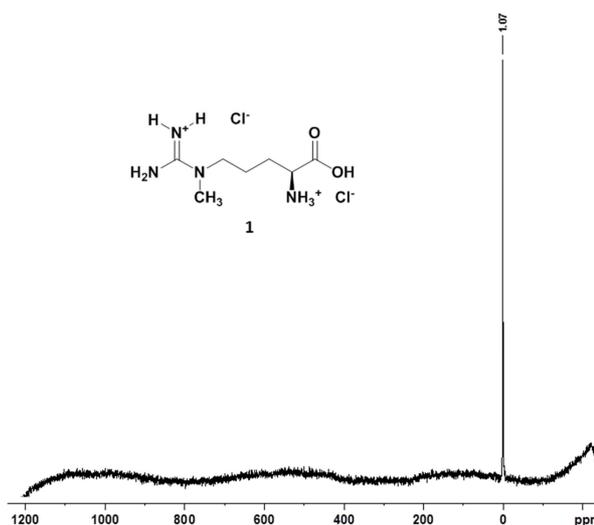


Abbildung 4-2: Links: Chlorid-Wiederfindung an ausgewählten Verbindungen durch ³⁵Cl-NMR. Alle Prozentangaben beziehen sich auf die entsprechenden Dihydrochloridsalze; rechts: Beispiel eines ³⁵Cl Spektrums von *N*^δ-Methyl-L-arginin **1** in D₂O. Akkumulation von 16 dummy scans und 3072 scans.

4.2 Spektroskopische Aspekte verschiedener Zuckerkonjugate

Zuckerkonjugate stellen nicht nur aus Sicht der Prodrug-Entwicklung interessante Verbindungen dar, sondern sind auch aus NMR-spektroskopischer Sicht informative, obgleich anspruchsvolle Moleküle. In Kapitel 3.2.4 wurde bereits erwähnt, dass während der Phasentransferkatalyse eine Anomerisierung am 1'-C-Atom stattgefunden hat. Diese Inversion (WALDEN-Umkehr) ist chemisch durch einen S_N2-Mechanismus zu erklären, kann aber auch spektroskopisch belegt werden. In Zuckern erscheinen äquatoriale Protonen weiter tieffeldverschoben als axial ausgerichtete Protonen.²¹⁷ Zusätzlich unterscheiden sich die Frequenzen der ³J-Kopplungen in Abhängigkeit von dem Winkel, in dem die Protonen zueinander stehen. Da das Proton am 2'-C-Atom axial ausgerichtet ist, ergibt sich für Verbindung **68** ein Winkel zwischen 1'-H und 2'-H von 60 ° und für Verbindung **70** ein Winkel von 180 °. KARPLUS hat diese Abhängigkeit zwischen der Größe der Kopplungskonstante und dem Diederwinkel von vicinalen Protonen erstmals beschrieben. Danach zeigen Kopplungen axial-axial zueinanderstehender Protonen (180 °) Kopplungskonstanten zwischen 10-15 Hz, wohingegen Kopplungen zwischen axial-äquatorial zueinanderstehender Protonen (60 °) wesentlich kleinere Kopplungskonstanten von ca. 3-4 Hz aufweisen.^{218,219} Dadurch kann gezeigt werden, dass alle *O*-Galactosyl und *O*-Glucosyl-Prodrugs als β-Anomere vorliegen (**Abbildung 4-3**).

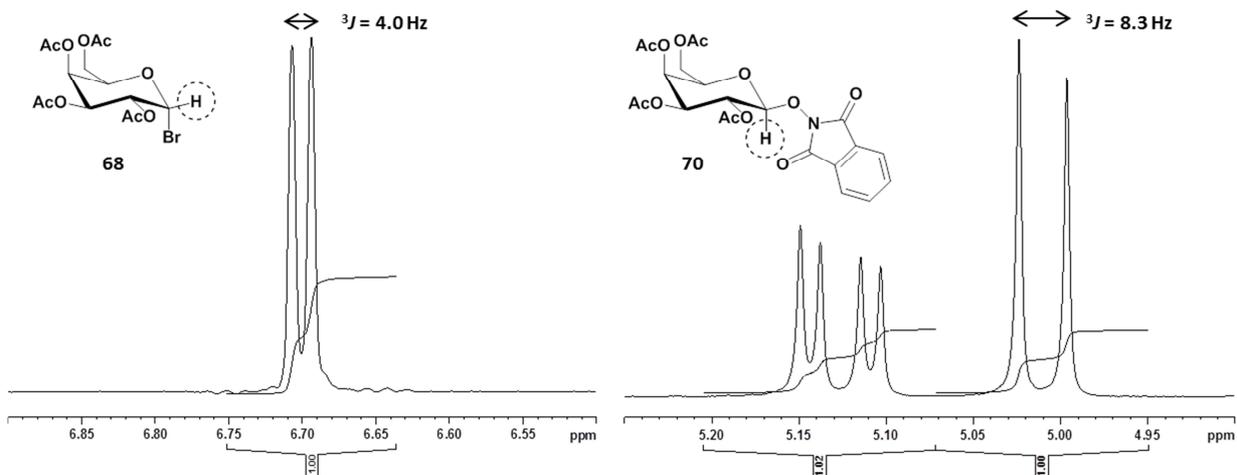


Abbildung 4-3: ^1H NMR-Spektren von **68** und **70** in CDCl_3 zur Verdeutlichung der α/β -Anomerisierung.

4.3 Spektroskopische Untersuchungen zur *E/Z*-Isomerie an ausgewählten NOHA-Prodrugs und ihren Vorstufen

Eine Frage die bei allen substituierten *N*-Hydroxyguanidinen immer wieder intensiv diskutiert wurde, ist die *E/Z*-Isomerie. Aus spektroskopischer Sicht gab es bislang keine eindeutigen Hinweise auf *E/Z*-Isomere.²²⁰ Als Ursache dafür wurde bei den *N*-Hydroxyguanidinen bisher eine schnelle Umwandlung von der *E*- in die *Z*-Form als am wahrscheinlichsten angenommen. Eine zufällige Isochronie der Signalsätze oder das Vorliegen nur eines Isomers wären allerdings auch denkbar. In eigenen NMR-spektroskopischen Untersuchungen konnten weder in den ^1H - noch in den ^{13}C -Spektren ein doppelter Signalsatz beobachtet werden. Daraus ließ sich ableiten, dass eine Mischung aus *E*- und *Z*-Isomeren sehr unwahrscheinlich war. Auch die schnelle *E/Z*-Isomerisierung erschien unwahrscheinlich, da es bei dieser Umwandlung zu einem formalen Bruch und Neuknüpfung einer Bindung käme. Es ist daher eine hohe Energiebarriere zu überwinden, die stark vom Substitutionsmuster abhängig ist. Bei dem Estrogen-Agonisten *E*-Diethylstilbestrol läuft diese *E/Z*-Isomerisierung bereits unter physiologischen Bedingungen ab.²²¹ Bei Oximen ist durch den elektronenziehenden Sauerstoff die Inversionsbarriere am Stickstoff so stark erhöht, dass praktisch keine Isomerisierung auftritt. Dieser Effekt ist bei anderen CN-Doppelbindungen mit stark elektronenziehenden Resten ebenfalls zu beobachten.^{222,223} Ein postulierter Mechanismus für eine *E/Z*-Isomerisierung ohne den formalen Bindungsbruch verläuft in stark sauren wässrigen Lösungen über einen tetrahedralen Übergangszustand der durch Protonierung des Oxim-Stickstoffs zustande kommt und bei dem Wasser als eine Art nukleophiler Katalysator auftritt. Aus dem tetrahedralen Übergangszustand wäre dann eine Rotation um die entstandene CN-Einfachbindung denkbar, die letztendlich eine Isomerisierung ermöglichen könnte.²²⁴

Um der Frage nach der *E/Z*-Isomerie analytisch nachzukommen, sollten in dieser Arbeit neben verschiedenen zweidimensionalen NMR-Techniken auch heteronukleare Messungen zum Einsatz kommen. In **Abbildung 4-4** sind zwei ^1H - ^1H -NOESY-Spektren der Prodrug-Vorstufen **101** und **72** gezeigt. Bei NOESY-Messungen wird die Pulsfolge auf alle ^1H -Kerne angewendet, wobei bei räumlich benachbarten Kernen Kreuzsignale entstehen, wenn sich die Kerne räumlich in ihrem

Relaxationsverhalten beeinflussen. Die markierten Signale deuten auf eine Wechselwirkung zwischen dem N^{ω} -Proton des Guanidins und den Protonen der Methylengruppe des Acetals (**A**) bzw. des anomeren Protons (**B**) hin. Diese Wechselwirkungen sind bevorzugt durch eine *Z*-Isomerie zu erklären. Bei anderen Derivaten wie **81** waren sogar Kontakte zwischen noch weiter auseinander liegenden Protonen, wie dem N^{ω} -Proton des Guanidins und dem 2'-Proton des Monosaccharids zu beobachten. Bei einer *E*-Isomerie wäre dieser Kontakt zum N^{δ} -Proton des Guanidins wahrscheinlicher. Dieses liefert aber ein weiter hochfeldverschobenes Triplett.

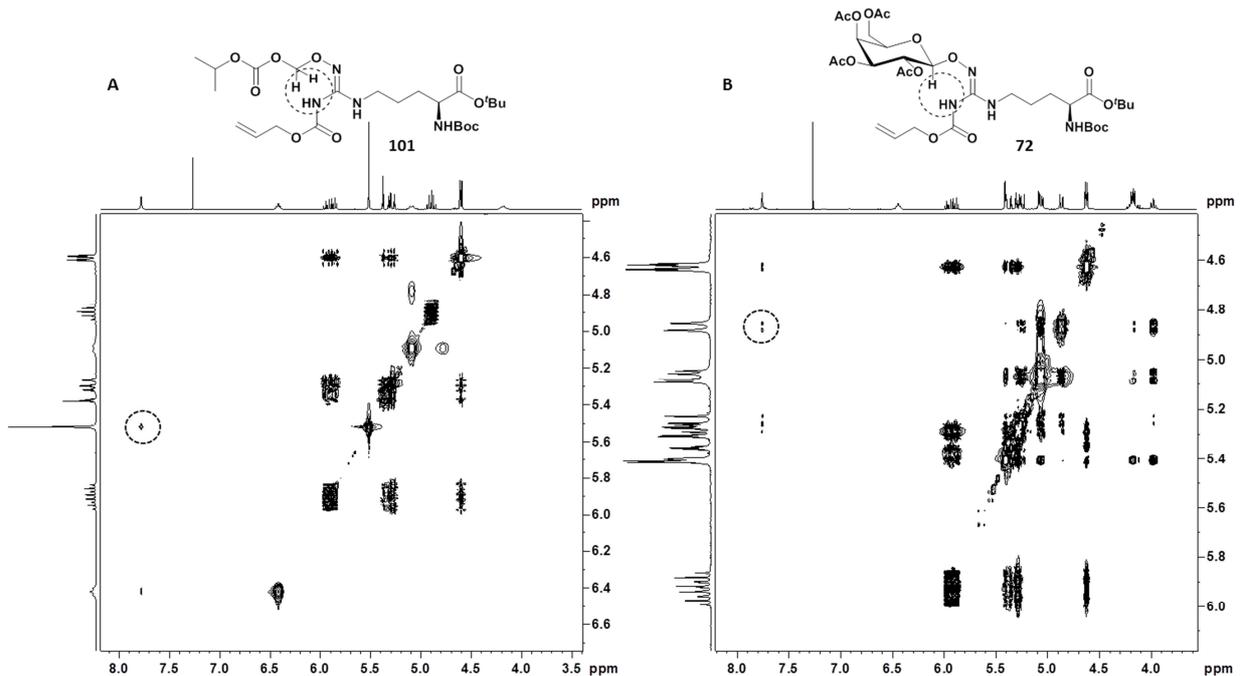


Abbildung 4-4: Ausschnitt aus den ^1H - ^1H -NOESY-Spektren von **101** und **72**. In den gestrichelten Kreisen wurden die NOESY-Kontakte des N^{ω} -Guanidin-Protons mit den Protonen der Methylengruppe des Acetals (**A**) bzw. des anomeren Protons (**B**) verdeutlicht.

In **Abbildung 4-5** sind die *Z*-Isomere der Prodrug-Vorstufen **101** (links) und **72** (rechts) dreidimensional dargestellt. Die Abbildung soll die räumliche Annäherung zwischen den Protonen des Acetals und dem N^{ω} -Proton des Guanidins verdeutlichen. Bei der Verbindung mit offen-acetalischer Struktur **101** beträgt dieser berechnete Abstand lediglich 1,22 Å. Auch beim Galactosederivat **72** ist der Abstand zwischen dem anomeren Proton und dem des N^{ω} -Stickstoffs mit 2,66 Å kurz. In NOESY-Experimenten liefern nur räumlich benachbarte Protonen Kreuzsignale, deren Abstand zueinander 4-5 Å nicht überschreitet. Der berechnete Abstand zwischen den Protonen des Acetals und dem des N^{δ} -Stickstoffs läge bei beiden Verbindungen deutlich über 4 Å, sodass die Kreuzsignale in den NOESY-Spektren (**Abbildung 4-4**) daher am besten durch das Vorliegen der *Z*-Isomere zu erklären wären.

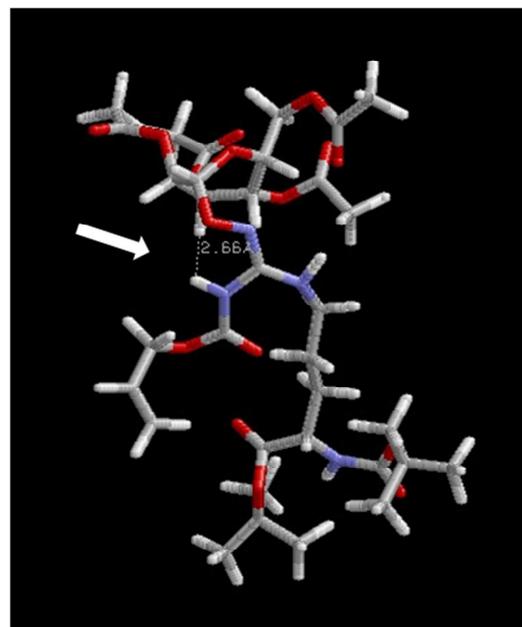
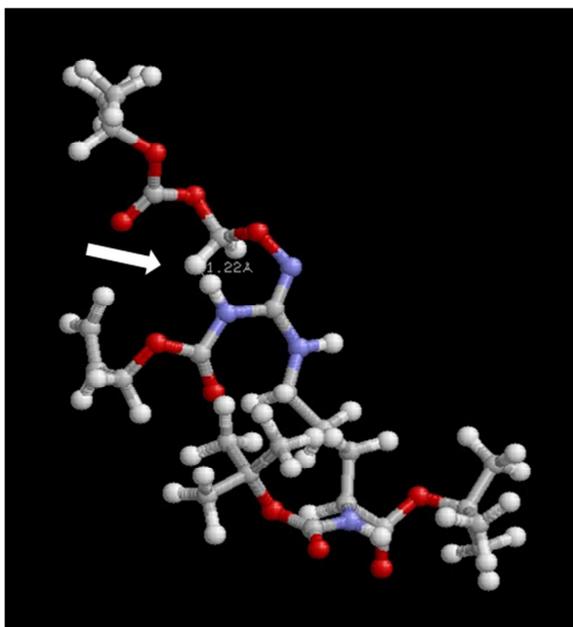
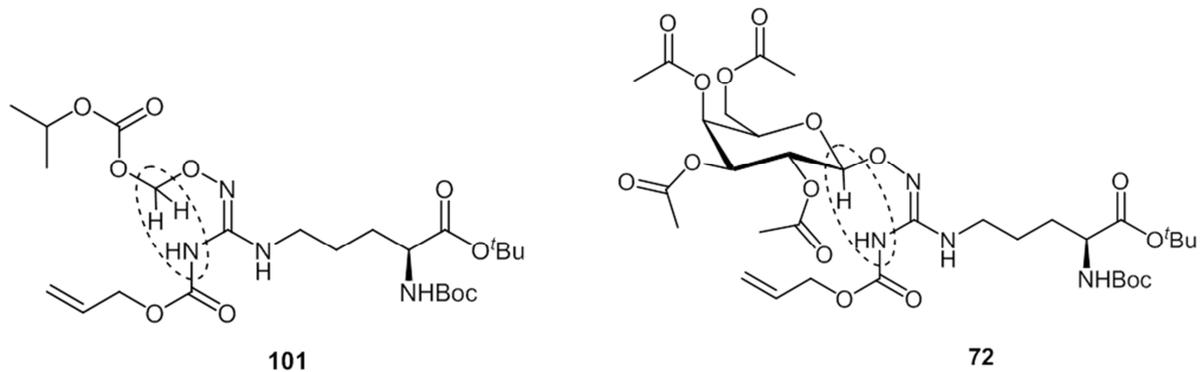


Abbildung 4-5: Dreidimensionale Darstellung von **101** und **72** in Z-Konfiguration; links: Z-Isomer von **101**; rechts: Z-Isomer von **72**. Markiert sind die Abstände der Protonen, die für die Kreuzsignale im ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum verantwortlich sind (**Abbildung 4-4**).

Um die oben vermutete Z-Isomerie zu begründen, wäre das Vorliegen des *N*-Hydroxyguanidins in oximartiger Struktur essentiell. Um aber das Vorliegen des *N*-Hydroxyguanidins als oximartiges und nicht als hydroxylaminartiges Tautomer analytisch belegen zu können, mussten zu den 2D-NOESY-Experimenten weitere heteronukleare ^{15}N -Messungen durchgeführt werden. Diese Messungen könnten Aufschluss über den Protonierungsgrad der einzelnen Stickstoffe geben, der wiederum für beide denkbaren Tautomere spezifisch war. CLEMENT *et al.* hatten zu der Problematik der Tautomerie von Hydroxyguanidinen und Amidoximen bereits ausführliche ^{15}N -NMR-Studien betrieben. In diesen Arbeiten konnte belegt werden, dass sowohl die *N*-Hydroxyguanidine als auch die Amidoxime als oximartige Tautomere vorliegen.^{220,179} In **Abbildung 4-6** ist das ^{15}N -HMBC-Spektrum der Verbindung **101** in CDCl_3 gezeigt. Das markierte Signal zeigt die Kopplung des Oxim-Stickstoffs mit der Methylengruppe des Acetals. Die chemische Verschiebung des Oxim-Stickstoffs von -115 ppm (entspricht etwa 267 ppm auf der Ammoniak-Skala) entsprach der chemischen Verschiebung des Oxim-Stickstoffs verschiedener *N*-

Hydroxyguanidine in der Literatur.²²⁰ Zudem konnte gezeigt werden, dass es sich hier um einen nicht-protonen tragenden Stickstoff handeln musste, da dieses Signal nur im ^{15}N -HMBC- nicht aber im ^{15}N -HSQC-Spektrum sichtbar war. Diese Ergebnisse waren nur mit der oximartigen Struktur in Einklang zu bringen.

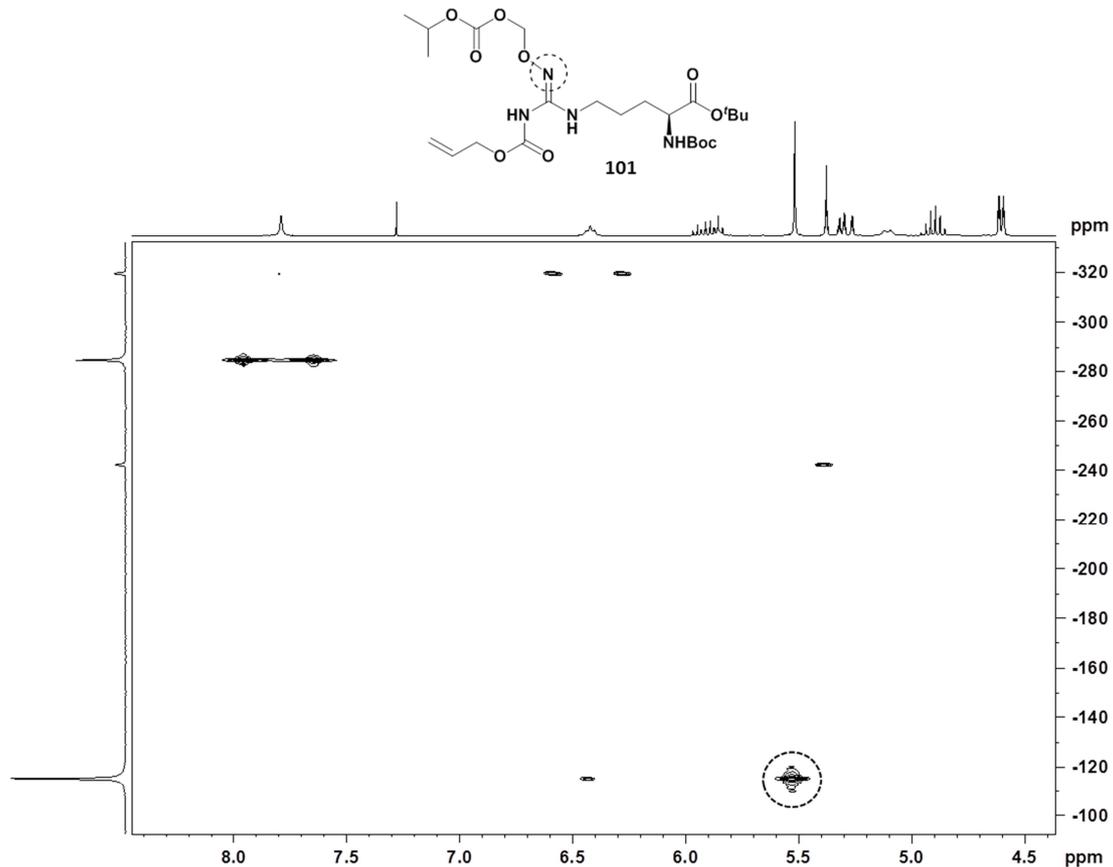


Abbildung 4-6: ^{15}N -HMBC der Verbindung **101** in CDCl_3 . Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf die Nitromethan-Skala. Markiert ist die Kopplung des Oxim-Stickstoffs mit den Protonen der acetalischen Methylengruppe.

Bisher wurden zur Aufklärung der Tautomerie und Isomerie nur Verbindungen mit Carbamatstruktur NMR-spektroskopisch untersucht. Deshalb sollte die Frage nach dem tatsächlich vorliegenden Tautomer auch an einer carbamatfreien Struktur gezeigt werden. Diese Messungen gestalteten sich zunächst schwierig, da das ^{15}N -Isotop eine natürliche Häufigkeit von lediglich 0,37 % aufweist und neben den indirekten ^{15}N -HSQC-Messungen und -HMBC-Messungen auch direkte Messungen des ^{15}N -Kerns durchgeführt werden sollten, für die große Probenmengen benötigt wurden (0,5-0,6 M). Zudem war das Signal des Oxim-Stickstoffs bei den ^{15}N -Messungen der *O*-glycosidischen Verbindungen schwierig detektierbar. Schließlich gelang ein ^{15}N -INEPT-Experiment mit der carbamatfreien Verbindung **73** in $\text{DMSO}-d_6$ (**Abbildung 4-7**). In Kombination mit den zweidimensionalen HSQC- und HMBC-Messungen konnte eine eindeutige Zuordnung der Stickstoffe erfolgen. Der Stickstoff der NH_2 -Gruppe konnte im INEPT-Spektrum leicht identifiziert werden, da sich die Kopplungskonstante der NH_2 -Gruppe mit $2 \times 80\text{-}90$ Hz deutlich von der Kopplungskonstante der NH -Gruppen unterschied. Anhand der chemischen

Verschiebungen der Stickstoffe 1-3 und der Tatsache, dass nicht-protonentragende Stickstoffe bei INEPT-Experimenten nicht sichtbar waren, lag auch diese Struktur oximartig vor. ^1H - ^1H -NOESY-Messungen an carbamatfreien Verbindungen und den finalen Prodrugs tendierten ebenfalls zum Vorliegen einer *E*-Isomerie an der Oxim-Doppelbindung, auch wenn die eindeutige Auswertung aufgrund stark verbreiterter NH-Signale weitaus schwieriger war. Da alle carbamatfreien Vorstufen und die finalen NOHA-Prodrugs in Form disubstituierter Guanidine vorliegen, kann im Gegensatz zu den noch carbamatgeschützten Verbindungen von einer *E*-Isomerie gesprochen werden.

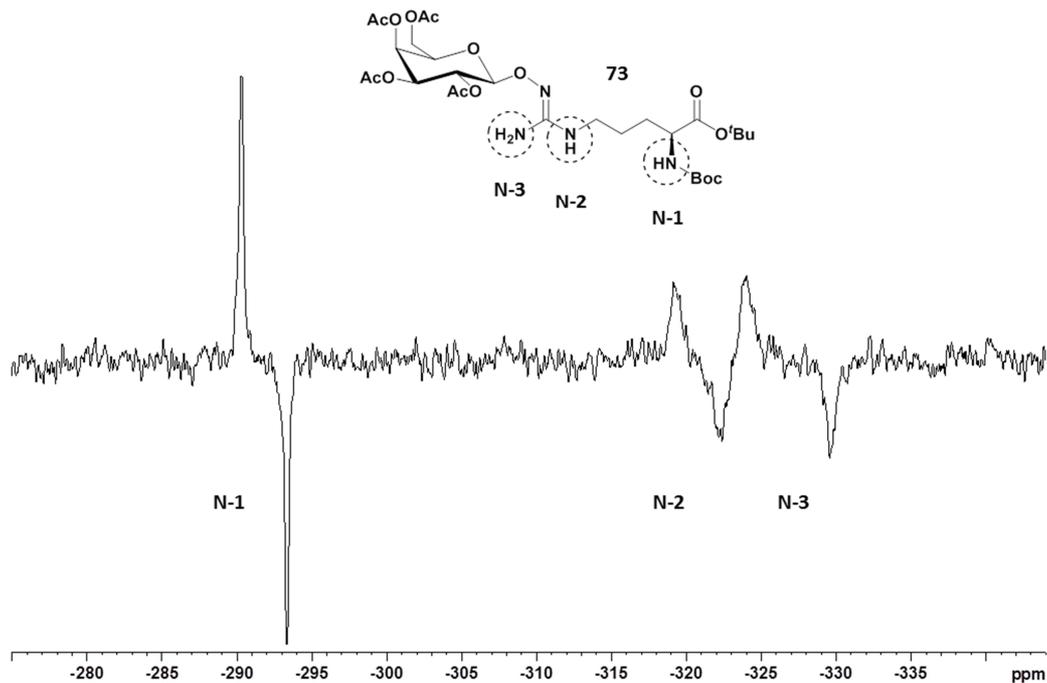


Abbildung 4-7: ^{15}N -INEPT-Experiment der Verbindung **73** in $\text{DMSO-}d_6$. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf die Nitromethan-Skala.

4.4 Zusammenfassung

Durch den Einsatz moderner NMR-Techniken war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, interessante strukturelle wie auch stereochemische Eigenschaften der synthetisierten NO-Modulatoren aufzuklären. Durch die quantitativen ^{35}Cl -NMR-Messungen konnte bewiesen werden, dass sowohl die L-Argininderivate als auch die weniger basischen NOHA-Prodrugs als zweifach-protonierte Dihydrochloridsalze vorlagen. Diese Methode stellte zu den klassischen Techniken zur Chlorid-Quantifizierung wie Titration, Kolorimetrie, Coulometrie oder Ionenchromatografie eine effiziente Alternative mit hohem Maß an Linearität und Richtigkeit dar.

Zucker sind aus NMR-spektroskopischer Sicht interessante und gleichermaßen anspruchsvolle Verbindungen. In diesem Kapitel wurde mit der α/β -Anomerisierung nur ein kleiner Teil der spektroskopischen Vielseitigkeit dieser Naturstoffe beleuchtet. Zuckerprotonen zeigen komplexe Multiplizitäten, hervorgerufen durch die vielen Kopplungen, die in diesem Ringsystem möglich sind. Durch ^1H - ^1H -COSY- und ^1H - ^1H -NOESY-Messungen war die eindeutige Zuordnung der Protonen in den

Monosaccharidresten möglich. Über $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC und $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMBC-Messungen konnten auch die sechs Zuckerkohlenstoffe exakt zugeordnet werden.

An ausgewählten NOHA-Prodrugs und deren Vorstufen konnte durch ^1H - ^1H -NOESY- und verschiedene ^{15}N -Messungen neue Erkenntnisse über deren *E/Z*-Isomerie gewonnen werden. Die heteronuklearen ^{15}N -INEPT- und ^{15}N -HMBC-Messungen zeigen eindeutig, dass die *N*-Hydroxy-L-arginin-Prodrugs in oximartiger Struktur vorlagen. Die an der CN-Doppelbindung mögliche *E/Z*-Isomerie konnte durch ^1H - ^1H -NOESY-Messungen genauer untersucht werden. Die Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass die *trans*-ständige Ausrichtung der *O*-acetalischen Prodrug-Gruppen zur Aminosäure am wahrscheinlichsten war. Deshalb wurde in dieser Arbeit eine einheitliche Schreibweise gewählt, indem die Prodrug-Vorstufen mit Carbamatstruktur als *Z*-Isomere und die carbamatfreien Prodrugs als *E*-Isomere dargestellt wurden.

5 BESTIMMUNG DER ENANTIOMERENREINHEIT AUSGEWÄHLTER AMINO-SÄUREDERIVATE

5.1 Einleitung

Die Prüfung auf Enantiomerenreinheit ist bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe unerlässlich, um deren pharmakologische Wirksamkeit und Unbedenklichkeit zu belegen. Das im Jahre 1957 von der Firma Grünenthal zugelassene Schlafmittel Contergan® mit dem Wirkstoff Thalidomid erlangte in diesem Zusammenhang traurige Aufmerksamkeit. Aufgrund der besonders guten Verträglichkeit wurde das Glutarimidderivat Thalidomid besonders bei schwangeren Frauen eingesetzt, was sich einige Jahre später als eine der tragischsten Fälle in der Geschichte der Arzneimittelenwicklung herausstellte.²²⁵ Die teratogene Wirkung des *S*(-)-Enantiomers im racemisch eingesetzten Thalidomids führte zu schweren embryonalen Missbildungen und Fehlgeburten, wohingegen die gewünschte sedative Wirkung ausschließlich auf das *R*(+)-Enantiomer zurückzuführen war.^{226,227} Bei vielen chiralen Arzneistoffen ist heutzutage bekannt, dass ein Enantiomer biologisch inaktiv ist oder eine reduzierte Wirksamkeit aufweist (Distomer), wohingegen das andere Enantiomer aktiv ist (Eutomer). Bereits bei der Arzneistoffentwicklung ist es von großer Bedeutung enantiomerenreine Verbindungen einzusetzen, um beispielsweise IC_{50} - oder K_i -Werte korrekt zu bestimmen. Bei Enzymen wie der NOS, DDAH und Arginase ist es bekannt, dass sie eine hohe Substratspezifität hinsichtlich der natürlich vorkommenden L-Aminosäuren aufweisen.^{228,229}

Um enantiomerenreine Wirkstoffe zu gewinnen gibt es u. a. die Möglichkeit der enantioselektiven Synthese, des Einsatzes enantiomerenreiner Edukte oder der Trennung racemischer Verbindungen mittels chromatografischer Methoden. Für die stereochemische Charakterisierung einer Verbindung können am einfachsten chiroptische Methoden, wie z. B. die Polarimetrie, angewendet werden. Die Bestimmung der spezifischen Drehung mittels Polarimetrie liefert allerdings keine Informationen darüber, in welchem Verhältnis die einzelnen Enantiomere zueinander vorliegen. Besonders bei neuen, literaturunbekannten Verbindungen sind spezifische Drehwerte alleine nicht aussagekräftig genug, um die optische Reinheit einer Substanz zu beweisen. Mit chromatografischen und spektroskopischen Methoden (v.a. GC und HPLC) ist es hingegen unter Verwendung verschiedener chiraler Selektoren möglich, beide Enantiomere einer racemischen Verbindung zu trennen und zu quantifizieren. Eine konventionelle Methode zur Bestimmung der optischen Reinheit ist heutzutage die HPLC-Analytik. Dabei wird der chirale Selektor entweder der mobilen Phase zugesetzt oder er liegt auf der stationären Phase gebunden vor.²³⁰ Mit Hilfe dieser Technik lassen sich mittlerweile viele chirale Stoffklassen untersuchen, unterstützt durch die Vielzahl an kommerziell erhältlichen chiralen Selektoren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine stereoselektiven Synthesen oder präparative chromatografische Trennungen von racemischen Verbindungen durchgeführt. Für alle Synthesen wurden kommerziell erhältliche L-Aminosäuren und deren Derivate eingesetzt und durch geeignete Reaktionsbedingungen das Racemisierungsrisiko minimiert. Die Stoffklasse der Aminosäuren ist hinsichtlich stark saurer oder basischer Reaktionsbedingungen und der dadurch bedingten Racemisierung kritisch zu betrachten,

besonders bei erhöhten Temperaturen.^{231,232} Da bei der Darstellung des N^{δ} -Methylarginins **1** und -ornithins **2** (Kapitel 3.1) eine möglichst hohe Enantiomerenreinheit angestrebt wurde, war eine Bestimmung der Enantiomerenreinheit von großer Bedeutung.

5.2 Ergebnisse und Diskussion

5.2.1 Methodenentwicklung

In früheren Untersuchungen wurden von TÖPKER und SCHADE verschiedene chromatografische Methoden zur Untersuchung der Enantiomerenreinheit N^{δ} -methylierten Arginins und dessen Derivate beschrieben.^{159,233} SCHADE konnte durch den Einsatz einer Crownpak Cr(+)-Säule unter Verwendung eines stark sauren Fließmittels (HClO_4 in *Aqua bidest.*, pH 1,5) und bei niedrigen Temperaturen die Enantiomere verschiedener N^{δ} -methylierter Argininderivate trennen.¹³³ Diese stationäre Phase verwendet einen chiralen, an Kieselgel adsorbierten Kronenether für die Unterscheidung von Aminosäure-Enantiomere und findet in der Praxis eine breite Anwendung. Mithilfe dieser chiralen Kronenether können nahezu alle natürlichen Aminosäuren in ihre Enantiomere getrennt werden, aber auch primäre Amine, wenn die Aminogruppe nahe beim Chiralitätszentrum liegt.²³⁴ So konnte auch die Enantiomerenreinheit verschiedener N^{ω} -substituierter L-Argininderivate auf diese Weise bewiesen werden.¹⁵⁹ Eigene Versuche, diese Analytik für die N^{δ} -methylierten Verbindungen **1** und **2** zu reproduzieren, waren nicht erfolgreich. Ein Defekt der stationären Phase erschien wahrscheinlich, da bereits keine Trennung von D- und L-Arginin erzielt werden konnte und alle untersuchten Aminosäuren nahezu dieselbe Retentionszeit aufwiesen. Da aber der Beweis für die Darstellung der N^{δ} -methylierten Aminosäuren **1** und **2** in enantiomerenreiner Form ein erklärtes Ziel dieser Arbeit darstellte, musste eine alternative Analytik entwickelt werden.

5.2.2 Ligandenaustauschchromatografie mittels HPLC

Eine besonders für die Trennung von α -Aminosäure-Enantiomere geeignete Form der Flüssigchromatografie ist die Ligandenaustauschchromatografie (LAC) mit einem chiralen Eluenten aus L-Prolin und Kupfer(II)-acetat als Komplexbildner. Der Vorteil dieser in Anlehnung an GIL-AV *et al.* beschriebenen Analytik ist, dass als stationäre Phase eine konventionelle RP-18-Säule verwendet werden kann.²³⁵ Das Prinzip der Trennung besteht in der Bildung diastereomerer Komplexe (**Abbildung 5-1**) von Kupferionen mit L-Prolin und den optischen Antipoden der Aminosäure, deren Stabilität durch die Anordnung des stereogenen Kohlenstoffatoms der Aminosäure bestimmt wird. Diese unterschiedlich polaren Komplexe bilden letztendlich unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der unpolaren C-18-Phase aus.²³⁵⁻²³⁷

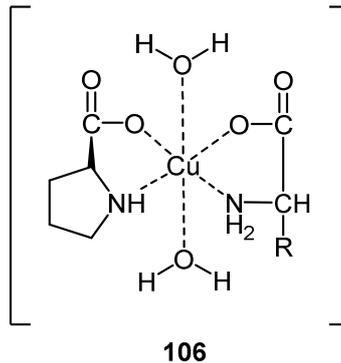


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung des Chelatkomplexes von Kupferionen mit einer α -Aminosäure und L-Prolin nach Gil-Av *et al.*²³⁵

Problematisch bei der Untersuchung der Aminosäuren ist die Detektion, da alle L-Argininderivate kein chromophores System aufweisen. Eine Vorsäulenderivatisierung scheidet bei der LAC aus, da eine unsubstituierte α -Aminosäurefunktion grundlegende Voraussetzung für die Komplexbildung ist. TÖPKER hatte bereits eine Nachsäulenderivatisierung zur Detektion von **1** beschrieben, bei der *o*-Phthaldialdehyd (*o*-PA) eingesetzt wurde. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass das zugesetzte L-Prolin als sekundäres Amin nicht mit dem *o*-PA Reagenz reagiert. Diese Methode konnte allerdings nicht direkt übertragen werden, da nach wenigen Injektionen bereits ein starker Basisliniendrift und Druckanstieg im HPLC-System zu beobachten war. Die Ursache dafür bestand in der Inkompatibilität des alkalischen Derivatisierungsreagenz (pH 9,5) mit den Cu^{2+} -Ionen des Fließmittels. Das Ausfallen von $\text{Cu}(\text{OH})_2$ konnte erst durch den Zusatz von EDTA (3 mM) zum Derivatisierungsreagenz verhindert werden.

Durch die Injektion verschiedener D- und L-Arginin-Lösungen sollte die Spezifität der Methode überprüft werden. Die Chromatogramme zeigten zwar keine basisliniengetretennten Peaks, dennoch konnten die Signale von D-Arginin (11,0 min \pm 0,1 min) und L-Arginin (12,4 min \pm 0,1 min, R = 1,2) deutlich unterschieden werden (**Abbildung 5-2**).

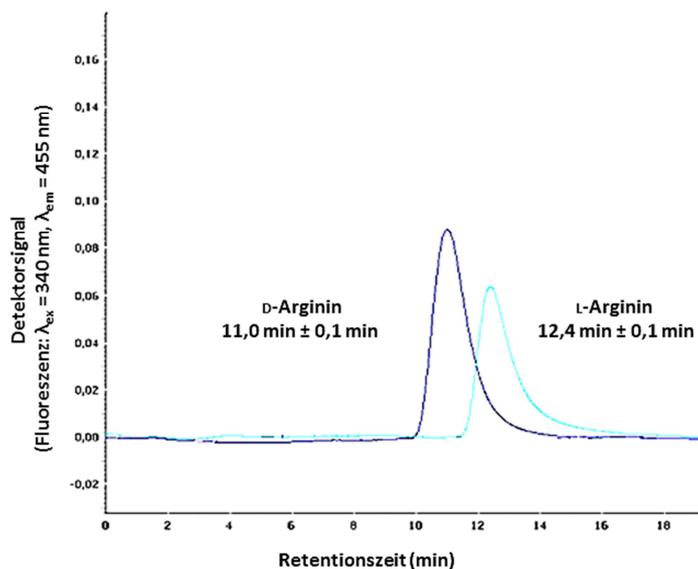


Abbildung 5-2: Repräsentatives Chromatogramm von D-Arginin (blau) und L-Arginin (türkis) auf einer VDS Optilab Nucleosil 100 C-18 Säule; Fließmittel: 17 mM L-Prolin, 8 mM Kupfer(II)-acetat in *Aqua bidest.*, pH 4,5; Flussrate 0,5 mL/min; Detektion: Fluoreszenzmessung, *o*-PA-Nachsäulenderivatisierung ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$).

Auch racemisches N^{δ} -Methylarginin konnte in seine optischen Antipoden getrennt werden (**Abbildung 5-3**, blaues Chromatogramm). Das D-Enantiomer des N^{δ} -Methylarginins eluierte zuerst (10,7 min ± 0,2 min), gefolgt von dem L-Enantiomer (12,9 min ± 0,2 min, $R = 1,4$).

Die Einspritzung einer Lösung des in dieser Arbeit synthetisierten N^{δ} -Methyl-L-arginins **1** (Kapitel 3.1) lieferte einen einzigen Peak, dessen Retentionszeit mit der des L-Enantiomers des racemischen N^{δ} -Methylarginins und des natürlichen L-Arginins übereinstimmt (**Abbildung 5-3**, türkises Chromatogramm). Ein Peak für ein D-Enantiomer, und somit ein Indiz für Racemisierung, konnte nicht nachgewiesen werden. Um eine Quantifizierung bezüglich der Enantiomerenreinheit durchzuführen, wurde die Nachweisgrenze für das D-Enantiomer von **1** als mögliche Verunreinigung bestimmt. Dazu wurde eine 10 mM Lösung der racemischen Verbindung **1** soweit verdünnt, bis kein Peak mehr mit einem Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) von mindestens 3:1 detektierbar war. Somit konnte eine Nachweisgrenze von 50 μM für das D-Enantiomer von **1** festgelegt werden. Daraus ergibt sich eine Enantiomerenreinheit für N^{δ} -Methyl-L-arginin **1** von $\geq 99 \%$ ee. Die Reproduzierbarkeit der Methode konnte durch den Vergleich der Peakflächen von drei aufeinanderfolgenden Einspritzungen für beide Enantiomere mit einer relativen Standardabweichung von weniger als 1,2 % belegt werden.

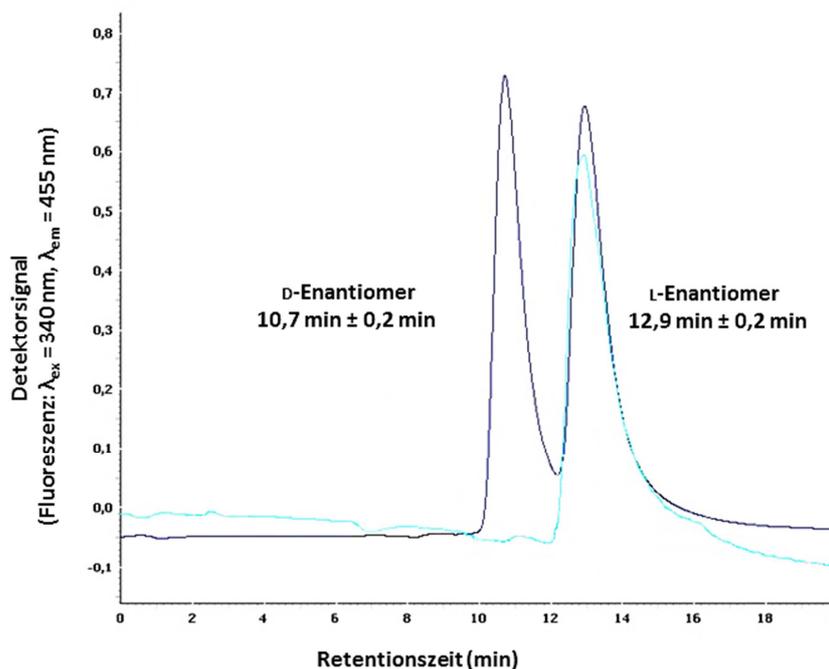


Abbildung 5-3: Repräsentatives Chromatogramm von racemischem N^δ -Methylarginin (blau) und optisch reinem N^δ -Methyl-L-arginin (türkis) auf einer VDS Optilab Nucleosil 100 C-18 Säule; Fließmittel: 17 mM L-Prolin, 8 mM Kupfer(II)-acetat in *Aqua bidest.*, pH 4,5; Flussrate 0,5 mL/min; Detektion: Fluoreszenzmessung, *o*-PA-Nachsäulenderivatisierung ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$).

Der Versuch, die kommerziell erworbenen Enantiomere D- und L-Ornithin mit der gleichen analytischen Methode zu trennen, war nicht erfolgreich. Bei allen Messungen konnte lediglich ein Peak mit identischer Retentionszeit detektiert werden. Da allerdings das N^δ -Methyl-L-ornithin **2** aus der gleichen Vorstufe **33** dargestellt wurde wie das enantiomerenreine N^δ -Methyl-L-arginin **1** und die finale Deprotektion unter den gleichen Bedingungen ablief (Kapitel 3.1), konnte für das N^δ -Methyl-L-ornithin **2** ebenfalls eine Enantiomerenreinheit von $\geq 99\% ee$ festgelegt werden. Die Ergebnisse der polarimetrischen Untersuchungen von **1** und **2** unterstützen diese Festlegung (Kapitel 5.2.3).

5.2.3 Polarimetrie

Nachdem die Ergebnisse der LAC-Analytik zeigten, dass das N^δ -Methyl-L-arginin **1** eine optische Reinheit von $\geq 99\% ee$ aufwies, sollte zur vollständigen Charakterisierung der spezifische Drehwert bestimmt werden. Außerdem konnte der Vergleich der spezifischen Drehwerte des N^δ -Methyl-L-ornithins **2** mit dem des optisch reinen N^δ -Methyl-L-arginins **1** eine Aussage über dessen Enantiomerenreinheit liefern. Da für in Wasser gemessene Drehwerte von **1** und **2** keine Literaturwerte existierten, wurden für die Beurteilung der Messwerte ebenfalls die spezifischen Drehwerte von kommerziell erworbenem D- und L-Arginin bestimmt.

Tabelle 5-1: Spezifische Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ von N^δ -Methyl-L-arginin **1**, -ornithin **2** und Arginin.

| Verbindung | $[\alpha]_D^{20}$ (°) |
|------------|-----------------------|
| 1 | + 11,0 |
| 2 | + 11,5 |
| L-Arg | + 10,5 |
| D-Arg | - 10,5 |

Alle Proben wurden 2 %ig in *Aqua bidest.* vermessen.

Die ermittelten spezifischen Drehwerte von **1** und **2** waren nahezu identisch. Ebenso korrelierten sie mit den Werten der kommerziell erworbenen Arginin-Enantiomere. Daraus ließ sich ableiten, dass das N^δ -Methyl-L-ornithin **2** eine mindestens ebenso hohe optische Reinheit aufwies, wie das N^δ -Methyl-L-arginin **1**.

5.3 Zusammenfassung

Für die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen N^δ -Methyl-L-arginin **1** und N^δ -Methyl-L-ornithin **2** konnte ein analytisches System zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit etabliert werden.

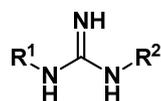
Beide Verbindungen liegen in hoher optischer Reinheit von $\geq 99\%$ ee vor, was den abschließenden Rückschluss zulässt, dass während der unter Kapitel 3.1 beschriebenen neu entwickelten Synthese keine nennenswerte Racemisierung der enantiomerenreinen Edukte eintrat. Damit konnte auch die höchste bisher in der Literatur beschriebene Enantiomerenreinheit für die Verbindungen **1** und **2** erzielt werden.¹³³ Die etablierte Analytik mittels Ligandenaustauschchromatografie ermöglichte es, sowohl die Enantiomere des Arginins als auch die des racemischen N^δ -Methylarginins zu unterscheiden und mit einer relativen Standardabweichung von weniger als 1,2 % reproduzierbare Ergebnisse zu generieren. Durch den Zusatz von EDTA zum Nachsäulenderivatisierungsreagenz war es möglich, die Robustheit des Systems deutlich zu erhöhen.

Durch die polarimetrischen Untersuchungen sollte die Charakterisierung beider Verbindungen **1** und **2** ergänzt werden mit dem Ergebnis nahezu identischer spezifischer Drehwerte. Diese Tatsache ist auch plausibel, da die strukturellen Unterschiede der Verbindungen **1** und **2** erst am Stickstoffatom an der δ -Position auftreten und somit weit vom Stereozentrum entfernt sind. Die Messungen der optischen Drehung beider kommerziell erworbenen Enantiomere des Arginins lieferten ähnliche Ergebnisse, was diese Annahme unterstützt, da der strukturelle Unterschied zu **1** lediglich in einer Methylgruppe besteht und somit wenig Einfluss auf den stereochemischen Charakter der Verbindung hat.

6 UNTERSUCHUNGEN ZUR (Co)KRISTALLISATION DER HUMANEN DDAH-1

6.1 Einleitung

Die Struktur-Wirkungsbeziehungen von Amidin- und Guanidin-basierten Inhibitoren der hDDAH-1 wurden im Arbeitskreis CLEMENT bereits weitreichend untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Veränderungen bestimmter struktureller Elemente dieser Verbindungen die Wirkung entweder enorm steigerten oder zu einem fast vollständigen Wirkverlust führten. Auffällig erschien, dass die bereits literaturbekannten Inhibitoren **7** und **8** beide potente Hemmstoffe der hDDAH-1, Arginase und NOS darstellten, obwohl es sich bei L-257 (**8**) um ein N^{ω} -Methoxyethyl-substituiertes Argininderivat und bei V-NIO (**7**) hingegen um ein Amidinderivat handelte.

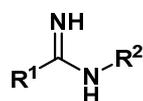


| Verbindung | R ¹ | R ² | hDDAH-1 K _i (μM) | Arginase Hemmung bei 1 mM (%) | nNOS Hemmung bei 1 mM (%) | eNOS | iNOS |
|------------------------------------|----------------|----------------|--------------------------------|--|---------------------------------|---------------|---------------|
| 8 (L-257) ¹⁴⁵ | | | 13 ± 2 | 16 ± 9 | 12 ± 8 | 10 ± 5 | 0 ± 13 |
| 9/10 (AbMEG) | | | 18 ± 6 | 7 ± 6 | 0 ± 8 | 13 ± 5 | 0 ± 13 |
| 107 | | | 489 ± 16 | n. b. | 5 ± 4 | 13 ± 4 | 2 ± 6 |
| 108 | | | 2815 ± 946 | n. b. | 0 ± 8 | 0 ± 4 | 21 ± 4 |
| 109 | | | 59 ± 3 | n. b. | n. b. | n. b. | n. b. |

Tabelle 6-1: Hemmdaten ausgewählter Guanidin-basierter Inhibitoren der hDDAH-1. Fett hervorgehoben sind die Daten der Leitstrukturen **8** (L-257)¹⁴⁵ und **9/10** (AbMEG). Alle Verbindungen wurden mit Ausnahme von **8** im Arbeitskreis CLEMENT von SCHADE, KOTTHAUS und LUNK synthetisiert und *in vitro* getestet. n. b. = nicht bestimmt.^{146,136,238}

Inspiziert von den beiden Leitstrukturen **7** und **8** wurde von SCHADE, KOTTHAUS und LUNK in systematischen Untersuchungen eine große Substanzbibliothek verschiedenster Amidin- und Guanidin-basierter Inhibitoren der hDDAH-1, Arginase und NOS synthetisiert und im Anschluss *in vitro* auf deren Wirksamkeit und Selektivität getestet.^{136,146,238} Ausgewählte Beispiele sind in **Tabelle 6-1** und **Tabelle 6-2**

gezeigt. Bei den Guanidinderivaten stellte sich heraus, dass durch die Substitution des N^{ω} -Stickstoffs mit einer Methoxyethyl- oder einer ähnlich großen Butenylfunktion (**109**) besonders potente Inhibitoren hervorgingen. Bei Argininderivaten konnte beobachtet werden, dass die Verkürzung der N^{ω} -Substituenten um ein Kohlenstoffatom im Vergleich zu L-257 (**8**) zu 4-7 fach höheren K_i -Werten führte. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Amidinderivaten gemacht, wo die Verkürzung oder die Verlängerung des Substituenten ebenfalls zu Affinitätsverlusten führte.²³⁹ Die Größe des N^{ω} -Substituenten schien also eine große Bedeutung hinsichtlich der Hemmung der hDDAH-1 zu haben. Am auffälligsten aber zeigte sich, dass sowohl eine intakte α -Aminosäurefunktion (L-257, **8**) als auch eine decarboxylierte Aminosäure (AbMEG, **9/10**) von der hDDAH-1 akzeptiert wurde, wohingegen das Enzym den Verlust der α -Aminogruppe (**107**) nicht tolerierte. Der vollständige Verlust der Aminosäurefunktion führte zu einer praktisch wirkungslosen Verbindung (**108**). Auch die höhere Selektivität von AbMEG für die hDDAH-1 gegenüber der Arginase und NOS erschien im Vergleich zu L-257 interessant.



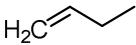
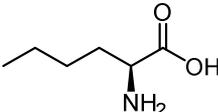
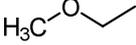
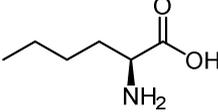
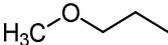
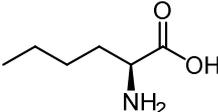
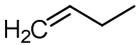
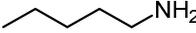
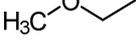
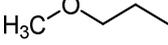
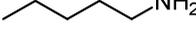
| Verbindung | R ¹ | R ² | hDDAH-1 K _i (μM) | Arginase Hemmung bei 1 mM (%) | nNOS Hemmung bei 1 mM (%) | eNOS | iNOS |
|------------------------------------|---|---|--------------------------------|--|---------------------------------|---------------|----------------|
| 7 (V-NIO) ²⁴⁰ |  |  | 2 ± 1 | 76 ± 10 | 100 ± 8 | 88 ± 3 | 100 ± 1 |
| 110 |  |  | 73 ± 6 | 22 ± 2 | 93 ± 2 | 89 ± 4 | 75 ± 5 |
| 111 |  |  | 9 ± 1 | 43 ± 1 | 65 ± 1 | 54 ± 18 | 50 ± 7 |
| 112 |  |  | 768 ± 4 | 6 ± 5 | 99 ± 1 | 56 ± 8 | 100 ± 1 |
| 113 |  |  | 983 ± 19 | 21 ± 2 | 78 ± 1 | 44 ± 19 | 42 ± 8 |
| 114 |  |  | 1446 ± 91 | 22 ± 2 | 19 ± 23 | 28 ± 6 | 16 ± 5 |

Tabelle 6-2: Hemmdaten ausgewählter Amidin-basierer Inhibitoren der hDDAH-1. Fett hervorgehoben sind die Daten der Leitstruktur **7** (V-NIO).²⁴⁰ Alle Verbindungen wurden mit Ausnahme von **7** im Arbeitskreis CLEMENT von SCHADE, KOTTHAUS und LUNK synthetisiert und *in vitro* getestet.^{238,136,146}

Bei den Amidin-basierten Inhibitoren wurde ein Verlust der α -Carboxylgruppe von der hDDAH-1 hingegen nicht toleriert (**Tabelle 6-2, 112-114**), was die vorsichtige Annahme erlaubte, dass neben dem

Methoxyethylrest oder einer Funktion ähnlicher Größe vor allem die Guanidinstruktur eine entscheidende Rolle für die Bindung an das Enzym spielte. Eine ungewünschte Eigenschaft aller Amidinbasierten Inhibitoren war das mangelhafte Selektivitätsprofil gegenüber der Arginase und NOS. Eine Inhibition aller Schlüsselenzyme des NO-Stoffwechsels war keineswegs gewünscht und hätte auch weitreichende Konsequenzen hinsichtlich auftretender Nebenwirkungen.

Um besser verstehen zu können, warum im Vergleich zu L-257 der Verlust der α -Carboxylgruppe bei dem Guanidinderivat AbMEG toleriert wurde, nicht aber bei seinem Amidinanalogen **114** und welche Rolle die Guanidinfunktion und darüber hinaus auch der Methoxyethylrest spielte, sollte eine Kristallstruktur der hDDAH-1 sowohl mit AbMEG als auch ohne den Inhibitor Aufschluss über diese strukturellen Phänomene bringen. Dazu sollte im Rahmen dieser Arbeit eine ausreichende Menge hDDAH-1 rekombinant hergestellt und über geeignete chromatografische Methoden gereinigt werden. Der Beweis für die katalytische Aktivität des Enzyms sollte über einen kolorimetrischen Aktivitätsassay erbracht werden. Die abschließende Herausforderung bestand in der (Co)Kristallisation der hDDAH-1 mit und ohne AbMEG.

6.2 Herstellung rekombinanter hDDAH-1 in *Escherichia coli*

Unter der rekombinanten Herstellung eines Proteins versteht man die Synthese eines Proteins in einem gentechnologisch veränderten Organismus.^{241,242} Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Expressionssystem für die hDDAH-1 *Escherichia coli* BL-21(DE3)pREP4 Zellen verwendet. Ein Teil des pREP4-Plasmids codiert für den *lacI*-Repressor, der im aktiven Zustand die Proteinbildung hemmt.²⁴³ Erst durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) wird der *lacI*-Repressor inaktiviert und die Transkription gestartet. Ein Vorteil dieser steuerbaren Genregulation ist, dass die Proteinbildung zugunsten der Ausbeute erst bei ausreichend hoher Zellzahl gestartet wird.

Dieses Expressionssystem hat sich bereits für die Herstellung rekombinanter hDDAH-1 etabliert.^{91,238,239,244} Bisher wurden die Zellen für die Proteinherstellung nur in Schüttelkulturen kultiviert, die eine Ausbeute von 1-3 mg Protein pro Liter Kultur lieferten (Kapitel 8.3.2.7.1). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Herstellung der hDDAH-1 in einem größeren Maßstab durch Einsatz eines Fermenters erfolgen (Kapitel 8.3.2.7.2). So konnte die Proteinausbeute in Folge optimierter Wachstumsbedingungen für die Zellen auf 8 mg Protein pro Liter Kultur erhöht werden. Ein Fermenter, auch als Bioreaktor bezeichnet, bietet gegenüber Schüttelkulturen den großen Vorteil, dass wichtige Voraussetzungen für das Zellwachstum wie Sauerstoffsättigung und pH-Wert während der Proteinbildung kontrolliert und reguliert werden können.

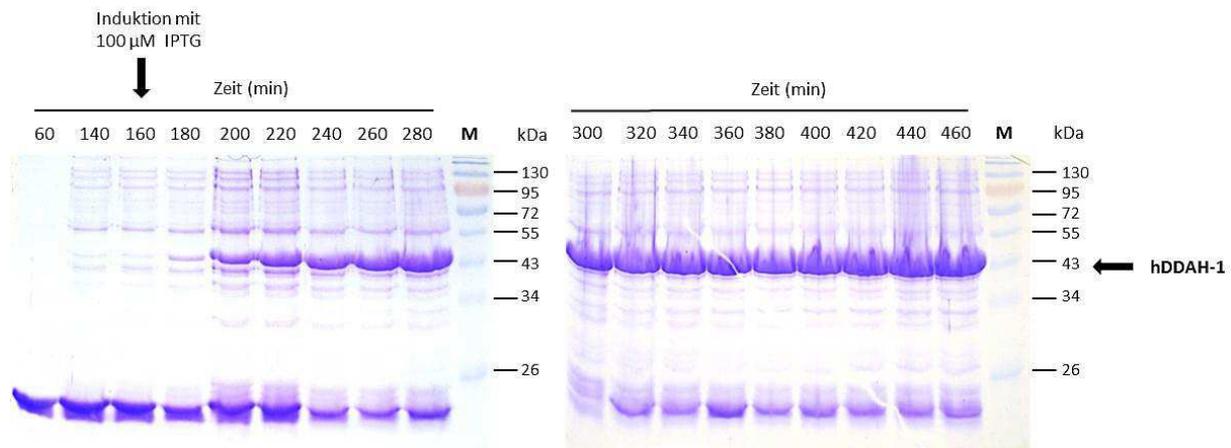


Abbildung 6-1: SDS-PAGE-Analyse der hDDAH-1 (32 kDa) Herstellung in einer Fermenterkultur (5 L). Aufgetragen wurden Zellysate mit einem Gesamtproteingehalt von durchschnittlich 11 µg/Spur.

In der **Abbildung 6-1** ist der Effekt der Induktion mit IPTG deutlich zu erkennen. Während vor der Induktion hauptsächlich *E. coli*-eigene Proteine gebildet wurden, konnte nach erfolgter Induktion eine vermehrte Bildung der hDDAH-1 beobachtet werden, die durch Western-Blot-Analyse verifiziert wurde. Die Zellernte erfolgte 5 h (30 °C) nach der Induktion. Eine längere Wachstumsdauer bei dieser Temperatur hätte zu keiner höheren Proteinausbeute geführt, da die *E. coli* Zellen nach dieser Zeit aus der stationären Phase in die Absterbephase übergegangen wären. Diese stationäre Wachstumsphase konnte anhand einer konstant bleibenden OD_{600} von 10,8-11,6 zwischen 400 und 460 min beobachtet werden.

6.3 Chromatografische Reinigung rekombinanter hDDAH-1

6.3.1 Affinitätschromatografie

Bei der Affinitätschromatografie handelt es sich um eine chromatografische Reinigungsmethode für Biomoleküle, die auf spezifischen und zugleich reversiblen Wechselwirkungen zwischen dem Molekül und einem matrixgebundenen Liganden basiert.²⁴⁵⁻²⁴⁷ Eine der vielfältigen Techniken der Affinitätschromatografie ist die Reinigung von Proteinen mit einem Polyhistidin-Tag (6×His-Tag) an matrixgebundener Ni^{2+} -Nitrilotriessigsäure (Ni^{2+} -NTA).^{248,249}

Die im Rahmen dieser Arbeit rekombinant hergestellte hDDAH-1 war durch einen *N*-terminalen 6×His-Tag (M_r hDDAH-1 mit 6×His-Tag = 32 kDa) ebenfalls der Affinitätschromatografie an Ni^{2+} -NTA zugänglich. Dafür wurden die *E. coli* Zellen zunächst mittels eines Hochdruck-Homogenisators (*French Press*) aufgeschlossen. Anschließend konnte die lösliche Proteinfraction durch mehrfache Zentrifugation von den Zelltrümmern getrennt werden (Kapitel 8.3.2.8). Durch Zugabe von Ni^{2+} -NTA-Agarose zu der löslichen Proteinfraction wurde die lösliche hDDAH-1 nach einer 24 stündigen Inkubation bei 4 °C quantitativ an die Ni^{2+} -NTA-Matrix gebunden werden.

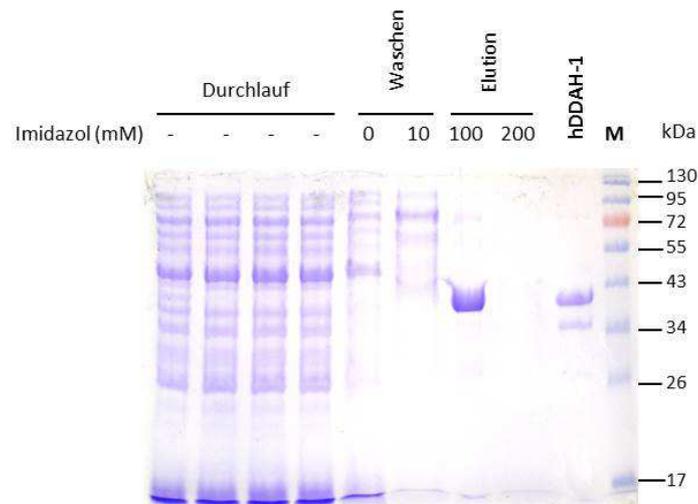


Abbildung 6-2: hDDAH-1 nach chromatografischer Reinigung an Ni^{2+} -NTA. Die Elution der hDDAH-1 erfolgte bei einer Imidazol-Konzentration von 100 mM. Gesamtproteingehalt Durchlauffraktionen: 14-17 $\mu\text{g}/\text{Spur}$; Waschfraktionen: 12 (0 mM) und 6 (10 mM) $\mu\text{g}/\text{Spur}$; Elutionsfraktionen: 5 (100 mM) und 3 (200 mM) $\mu\text{g}/\text{Spur}$; hDDAH-1-Kontrolle (mittels Western Blot-Analyse bestätigt): 0,5 $\mu\text{g}/\text{Spur}$.

In **Abbildung 6-2** ist eine SDS-Analyse der im Fermenter hergestellten und anschließend an Ni^{2+} -NTA gereinigter hDDAH-1 gezeigt. Die Elution erfolgte bei dieser chromatografischen Reinigung mit einem Imidazol-Stufengradienten (Kapitel 8.3.2.9.1). Die Elution der hDDAH-1 erfolgte bei einer Imidazol-Konzentration von 100 mM im Elutions-Puffer. Dabei zeigt das SDS-Gel bereits eine hohe Reinheit der hDDAH-1 an. Absolute Aussagen über die Reinheit von Proteinen mittels Coomassie-Brilliant-Blau- oder Silber-Färbung sind problematisch, da die Nachweisgrenzen für die verschiedenen Färbetechniken in der Literatur unterschiedlich angegeben werden und stark vom verwendeten Farbstoff abhängen. Zusätzlich werden die Massen z.T. pro Protein-Bande oder pro cm^2 angegeben. Allgemeine Richtwerte geben eine Nachweisgrenze für Coomassie-Brilliant-Blau von 0,1-0,5 $\mu\text{g}/\text{Proteinbande}$ an, für Silber-Färbungen sogar um den Faktor 100 kleiner.²⁵⁰⁻²⁵² Mittels BCA-Analyse konnte ein Proteingehalt der hDDAH-1-haltigen Fraktion von 1,4 mg/ml gemessen werden. Die Tasche des SDS-Gels (100 mM Imidazol-Stufe) wurde mit 5 μg Gesamtprotein geladen. Da auf dieser Spur nur eine schwache zusätzliche Proteinbande bei 80 kDa detektiert werden konnte entspräche dies einer Reinheit der hDDAH-1 von über 94 % bezogen auf eine durchschnittliche Nachweisgrenze von 0,3 $\mu\text{g}/\text{Proteinbande}$. Aber auch eine solche Angabe ist stark abhängig von der Menge an Gesamtprotein, mit der das Gel beladen wurde.

Die Anforderungen bezüglich der Reinheit von Proteinen zu Kristallisationszwecken sind hoch. Dabei existieren auch hier keine absoluten Angaben bezüglich der Reinheit eines Proteins für eine erfolgreiche Kristallisation. Erfahrungsgemäß ist eine Haupt-Bande auf einem Coomassie-gefärbten Gel ausreichend, um ein initiales Kristallisations-Screening zu starten. Zusätzliche Reinigungsschritte können dennoch erforderlich sein, um die Kristallbildung oder Qualität der Kristalle zu verbessern.²⁵³ Andere Angaben sehen die dynamische Lichtstreuung als zusätzliche notwendige Reinheitsprüfung für Proteine an, die störende Proteinaggregate erfassen kann und die Monodispersität der Proteinlösung anzeigt.²⁵⁴ Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit nach dem zweiten Reinigungsschritt mittels

Ionenaustauschchromatografie zusätzlich eine Silberfärbung der SDS-Gele erfolgen, durch die bereits minimale Verunreinigungen durch Fremdproteine detektiert werden konnten.

6.3.2 Ionenaustauschchromatografie

Bei der Ionenaustauschchromatografie (IEC) werden Biomoleküle anhand ihrer unterschiedlichen Oberflächenladungen getrennt. Dabei ist die Ladung eines Proteins von dessen isoelektrischem Punkt (IEP) und dem pH-Wert des umgebenen Mediums abhängig. Befindet sich ein Protein in einem Medium mit höherem pH-Wert als dem eigenen IEP, liegt es hauptsächlich anionisch vor und umgekehrt. Diese Eigenschaften werden bei der IEC zur Trennung von Proteinen eingesetzt.²⁵⁵

In der Literatur wurde bereits über eine erfolgreiche Reinigung der hDDAH-1 mittels Ionenaustauschchromatografie berichtet.²⁵⁶ Dabei wurde in einem neutralen Tris-Puffer bei pH 7,4 gearbeitet. Dies erschien sinnvoll, da zum einen dieser pH-Wert den physiologischen Bedingungen entspricht und zum anderen das Enzym einen theoretischen IEP von 5,53 aufweist, was den Einsatz eines Anionenaustauschers ermöglichte.

Zunächst sollte in eigenen Vorversuchen diese Technik übernommen werden. Für die Ionenaustauschchromatografie wurden HiTrap® Q FF-Säulen mit einem Säulenvolumen von 1 mL eingesetzt. Bei diesem Säulenmaterial handelte es sich um einen starken Anionenaustauscher der auf einer hochvernetzten Agarose-Matrix quartäre Trimethylammoniumgruppen trägt. Das Trennprinzip basierte darauf, dass die hDDAH-1 als negativ geladenes Protein an diese funktionellen Gruppen des Austauschers gebunden und anschließend mit einem NaCl-haltigen Puffer aus diesen Bindungen verdrängt wurde. Die Säulen sollten zunächst mit einer einfachen Einwegspritze und im Anschluss mit einem ÄKTA™ Purifier FPLC-System betrieben werden. Bei ersten Vorversuchen mit Einwegspritzen wurde die hDDAH-1 in einem PBS-Puffer pH 7,4 auf die IEX-Säulen aufgetragen (Kapitel 8.3.2.9.2). Die Elution erfolgte mit NaCl-Stufengradienten (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 1 und 1,5 M NaCl in Tris-HCl, pH 8,0) und die Eluate mittels SDS-PAGE analysiert. Um das SDS-Gel mit ausreichend Protein zu beladen, mussten die Eluate zunächst über Zentrifugation in Amicon Filter Units aufkonzentriert werden. Die SDS-Analyse zeigte allerdings, dass die hDDAH-1 nicht quantitativ an die Säule gebunden hatte und bereits ein großer Teil des Proteins im NaCl-freien Durchlauf wiedergefunden wurde. Problematisch beim Einsatz von Einwegspritzen für den Probenauftrag und die Elution ist die inkonstante Flussrate und schwankender Druck sowie der Eintrag von Luft in das System. Deshalb sollte ein weiterer Vorversuch an einem automatisierten ÄKTA™ Purifier FPLC-System durchgeführt werden. Hier herrschten während des Probenauftrags und der Elution eine konstante Flussrate und ein konstanter Druck. Da es sich um ein geschlossenes System handelte und die Puffer vor dem Einsatz entgast wurden, war auch die Gefahr durch Lufteintrag in das System minimiert.

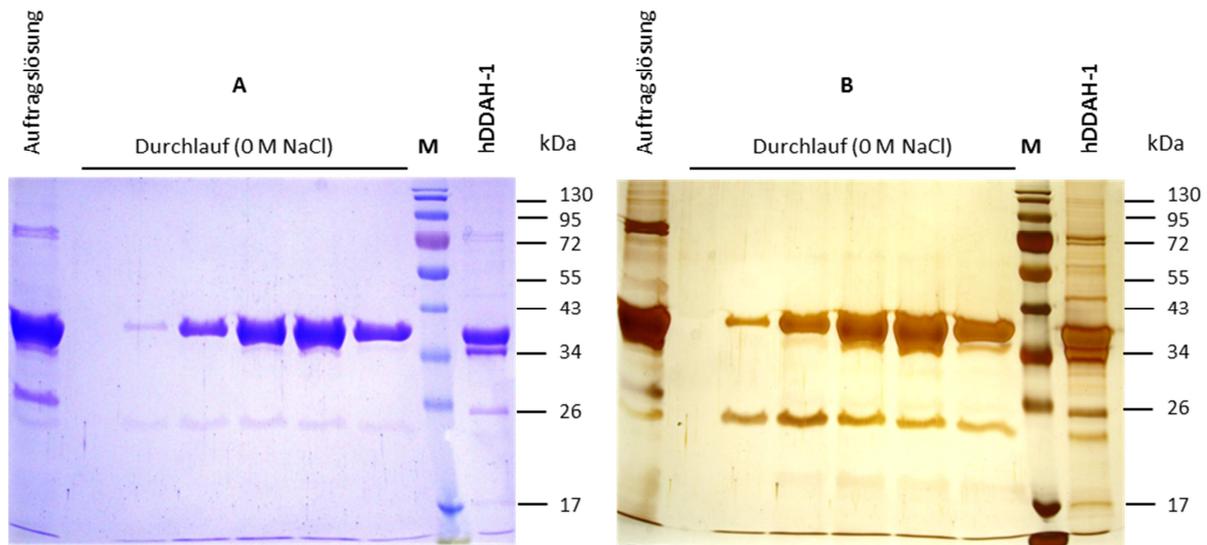


Abbildung 6-3: SDS-PAGE-Analyse der Vorversuche zur Ionenaustauschchromatografie der hDDAH-1 an einem ÄKTA™ Purifier FPLC-System. A) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel; B) Silber-gefärbtes SDS-Gel. Zur Kontrolle wurden die Auftragslösung und ein geblotteter hDDAH-1-Standard mit aufgetragen.

Aber auch bei dieser chromatografischen Reinigung konnte die hDDAH-1 nicht quantitativ an das Säulenmaterial gebunden werden. Die SDS-PAGE-Analyse (**Abbildung 6-3**) zeigte ebenfalls, dass große Mengen unreiner hDDAH-1 bereits im NaCl-freien Durchlauf wiedergefunden wurden. Als naheliegender Grund dafür erschien der NaCl-haltige PBS-Puffer, in dem das Protein auf die IEX-Säule aufgetragen wurde. Durch die hohe Anionenkonzentration im Puffer waren auf der Säule vermutlich die quartären Trimethylammoniumfunktionen bereits mit Anionen des Puffers gesättigt, sodass zwischen der hDDAH-1 und dem Austauscher keine ausreichenden Wechselwirkungen aufgebaut werden konnten. Zudem erwies sich der lineare NaCl-Gradient als wenig effizient, da bereits bei 0,15 M NaCl-Anteil Fremdproteine coeluierten. So konnten insgesamt lediglich drei Fraktionen hochreiner hDDAH-1 mit einer Gesamtproteinausbeute von 0,7 mg gewonnen werden, was bezogen auf die 3,2 mg vorgereinigter hDDAH-1 in der Auftragslösung einer Ausbeute von 22 % entsprach. Zudem limitierte das geringe Säulenvolumen von 1 mL die Trennleistung mit dem Resultat einer geringen Auflösung. Dennoch erschienen die Ergebnisse der Vorversuche als ausreichend, um die Ionenaustauschchromatografie zur Gewinnung hochreiner hDDAH-1 weiterhin einzusetzen.

Dazu mussten die zuvor angewendeten Methoden allerdings grundlegend optimiert werden. Zunächst wurden alle an Ni²⁺-NTA vorgereinigten hDDAH-1-Fractionen in einen salzärmeren Tris-HCl-Puffer pH 8,0 mit 10 % Glycerol- und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid-Zusatz (PMSF) zur Stabilisierung des gewonnenen Proteins überführt werden. Erste Vorversuche mittels manueller IEC auf HiTrap® Q FF-Säulen (1 mL) konnten anschließend zeigen, dass die hDDAH-1 quantitativ an die Säulenmatrix gebunden wurde. Bei der nachfolgenden Elution mittels Stufengradienten wurden bei einer NaCl-Konzentration von 0,1 M hochreine hDDAH-1-Fractionen erhalten. Erst ab einer NaCl Konzentration von 0,2 M eluierten Fremdproteine. Diese Bedingungen sollten auf die folgende IEC am FPLC-System übertragen werden. Da bei dieser Reinigung 45 mg Rohprotein eingesetzt wurde, mussten statt der 1 mL größere 5 mL HiTrap® Q FF-Säulen verwendet werden. Die maximale Bindungskapazität der Säulen ist

sehr stark von der Größe des Proteins abhängig. Säulen dieses Typs können beispielsweise laut Hersteller mit 15 mg Thyroglobulin mit einem M_r von 669 kDa oder mit 600 mg Humanalbumin mit einem M_r von 68 kDa beladen werden. Hinsichtlich der Dimension waren die 5 mL HiTrap® Q FF-Säulen für die Reinigung von 45 mg hDDAH-1 ($M_r = 32$ kDa) geeignet. Um das Protein quantitativ an das Austauschermaterial zu binden erwies sich als effektiv, die Flussrate beim Probenauftrag auf 1 mL/min zu reduzieren. Erst nach erfolgtem Probenauftrag wurde der Fluss auf 4 mL/min erhöht.

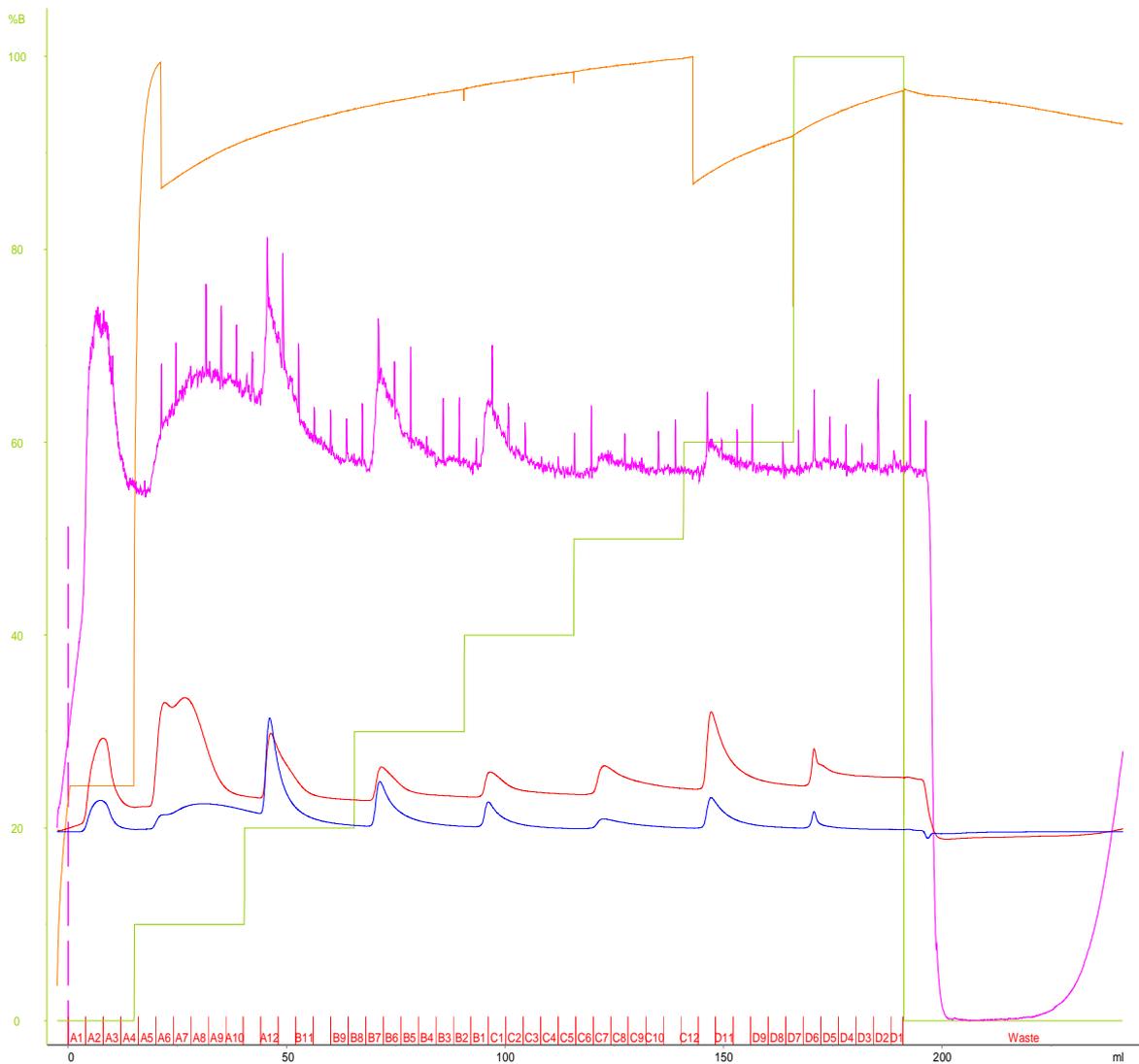


Abbildung 6-4: Repräsentatives Chromatogramm einer IEC mit einem ÄKTA™ Purifier FPLC-System auf einer HiTrap® Q FF-Säule 5 mL; grüne Linie: NaCl-Gradient, jede Stufe wurde mit 5 Säulenvolumina gefahren; rote Linie: Absorption bei 254 nm; blaue Linie: Absorption bei 280 nm; rosa Linie: Absorption bei 215 nm; orange Linie: Flussrate; Ordinate: NaCl-Konzentration (%); Abzisse: gefördertes Volumen (mL), rot: Fraktionen.

In **Abbildung 6-4** ist das chromatografische Profil der hDDAH-1 über ein ÄKTA™ Purifier FPLC-System gezeigt. Der zweimalige Abfall der Flussrate war durch die hohe Viskosität des Puffers bei 8 °C zu erklären. Die anschließende SDS-PAGE-Analyse bestätigte, dass das Umpuffern, die Verwendung großvolumiger Säulen und der langsamere Proteinauftrag im Vergleich zu den Vorversuchen deutlich zum Reinigungserfolg beigetragen haben (**Abbildung 6-5**).

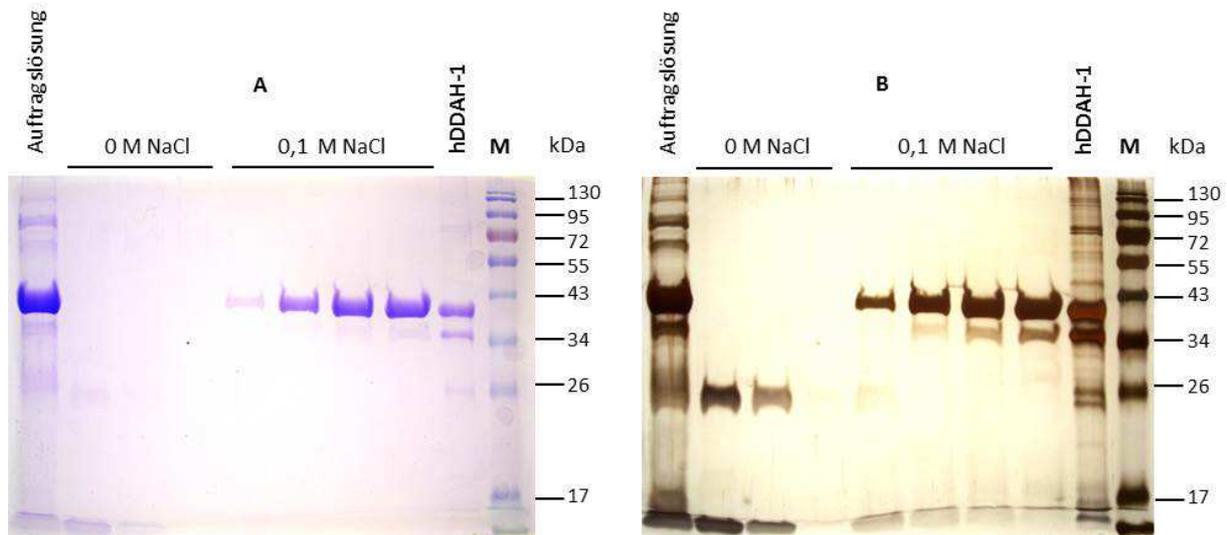


Abbildung 6-5: SDS-PAGE-Analyse der hDDAH-1 nach IEC-Chromatografie über ein Äkta™ Purifier FPLC-System auf HiTrap® Q FF-Säulen 5 mL. A: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel; B: Silber-gefärbtes SDS-Gel. Zur Kontrolle wurden die Auftragslösung und ein hDDAH-1-Standard (verifiziert mittels Western-Blot-Analyse) mit aufgetragen.

In den NaCl-freien Waschfraktionen konnte keine hDDAH-1 nachgewiesen werden, d. h. es waren keine Proteinverluste beim Laden der Säule zu beobachten. Außerdem konnte durch den Stufengradienten die hDDAH-1 ohne coeluerende Fremdproteine isoliert werden. In der Silberfärbung ist der Reinigungserfolg der IEC besonders im Vergleich zu der an Ni²⁺-NTA vorgereinigten Auftragslösung und hDDAH-1-Kontrolle zu sehen. Die Gesamtausbeute hochreiner hDDAH-1 lag bei 31,2 mg. Das entspricht, bezogen auf das eingesetzte Gesamtprotein, einer Ausbeute von 69 %. Diese nach IEC isolierte, hochreine hDDAH-1 wurde im Verlauf dieser Arbeit für alle weiteren Aktivitätsassays und (Co)Kristallisationsuntersuchungen eingesetzt.

In zukünftigen Arbeiten könnte die Effizienz der IEC-Methode noch weiter optimiert werden, indem der Gradient bei 0,1 M NaCl über mehr als 5 Säulenvolumina gefahren wird, da auch in den Fraktionen mit höherer NaCl-Konzentration deutlich hDDAH-1 nachgewiesen werden konnte. Allerdings nicht mehr in der Reinheit, die als Anforderung an diese Arbeit gestellt wurde.

In **Abbildung 6-6** ist die Western-Blot- und SDS-PAGE-Analyse der hDDAH-1 vor und nach der IEC gezeigt. Mittels Western-Blot-Analyse sollte die Identität der rekombinant hergestellten und zweifach chromatografisch gereinigten hDDAH-1 bestätigt werden. Auffällig ist dabei die Proteinbande unterhalb der hDDAH-1-Bande bei etwa 34 kDa. Es konnte beobachtet werden, dass die Intensität dieser zusätzlichen Bande stark von den Expressionsbedingungen abhing. Bei der Proteinherstellung in kleinen Schüttelkulturen war diese Proteinbande auf den SDS-Gelen wesentlich intensiver als bei der

Großherstellung im Fermenter, wo diese Bande nur sehr schwach oder garnicht zu beobachten war. Es zeigte sich, dass die Intensität dieser Bande nach der IEC wesentlich schwächer war, als nach der ersten Reinigung an Ni^{2+} -NTA. Das bedeutet, dass dieses unbekannte Protein eine hohe Affinität zu Ni^{2+} -NTA besitzt und möglicherweise ebenfalls über einen *His-Tag* verfügt, aber gleichzeitig eine andere Oberflächenladung als die hDDAH-1 aufweist. Das Auftreten dieser zusätzlichen Proteinbande ist bereits aus vorangegangenen Arbeiten bekannt, allerdings wurde die Identität dieses Proteins noch nicht aufgeklärt.^{238,244} Es könnte sich dabei um eine unvollständige hDDAH-1 handeln, da sie unter optimierten und kontrollierten Expressionsbedingungen (Fermenter) deutlich schwächer auftritt. Besonders bei hoher Zelldichte geraten Zellen unter Stress und können das gewünschte Protein nicht mehr korrekt herstellen. Auch ein schwer abtrennbares *E. coli*-eigenes Protein, welches ebenfalls mit dem hDDAH-1-Antikörper nachgewiesen werden kann, wäre eine denkbare Erklärung. Ein Wechsel des Expressionssystems (z. B. Hefe oder zellfreie Herstellung) könnte für die Aufklärung dieser Frage hilfreich sein. Eine genauere Aussage über die Identität dieses unbekanntes Proteins könnte allerdings erst nach einer Sequenzierung gemacht werden. Zudem fällt bei den SDS-PAGE-Analysen eine Diskrepanz zwischen dem theoretischen Molekulargewicht der hDDAH-1 von 32 kDa und dem beobachteten Molekulargewicht von etwa 36 kDa auf. Ein naheliegender Grund dafür wäre eine differente Faltung des Proteins infolge der denaturierenden SDS-Analysen mit Hitze-denaturierter hDDAH-1 (Kapitel 8.3.2.12). Durch die intensive Hitzebehandlung kann sich die Faltung des Proteins verändern, sodass der Widerstand für das Protein im Gel größer und es somit stärker zurückgehalten wird. Über dieses anomale Migrationsverhalten rekombinant hergestellter hDDAH-1 bei der SDS-PAGE-Analyse wurde bereits in der Literatur berichtet.²⁵⁷ Die Durchführung einer nativen, nicht-denaturierenden Gelelektrophorese könnte Aufschluss über dieses anomale Migrationsverhalten der hDDAH-1 geben. Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Aktivitäts- und Kristallisationsuntersuchungen konnten allerdings sowohl die Identität als auch die Funktionalität der rekombinant hergestellten hDDAH-1 eindeutig nachweisen.

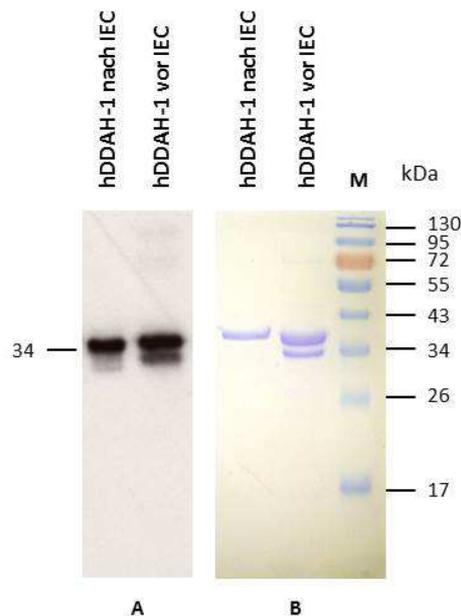


Abbildung 6-6: A) Western-Blot-Analyse und B) SDS-PAGE-Analyse der hDDAH-1 vor und nach der IEC. Für den Western-Blot wurde das Gel mit jeweils 2 μg Gesamtprotein geladen. Die Detektion der hDDAH-1 erfolgte mit dem Anti-DDAH-1 Antikörper (1:50000) und Anti-Kaninchen Antikörper (1:10000).

6.4 Kolorimetrische Aktivitätsassays

Die Reinheit und Identität der rekombinant hergestellten hDDAH-1 konnte bereits über SDS-PAGE- und Western-Blot-Analyse bestätigt werden, was allerdings keine Aussage über die katalytische Aktivität des Enzyms erlaubte. Bei der Entwicklung geeigneter Aktivitätsassays mussten deren chemische Bedingungen an das Aktivitätsmaximum der hDDAH-1 angepasst werden, das bei einem pH-Wert von 8,5 beschrieben wird.^{256,258} Es wurden bereits zwei zuverlässige Techniken etabliert, um die Aktivität der hDDAH-1 zu bestimmen. Beide Methoden detektierten das beim hydrolytischen Abbau von ADMA und NMMA gebildete Citrullin. Über HPLC lässt sich das Citrullin nicht ohne weiteres bestimmen, da es nicht über ein Chromophor verfügt und einer klassischen UV-Detektion somit nicht zugänglich ist. Daher hat sich eine HPLC-Methode mittels Vorsäulenderivatisierung durch Behandlung mit *o*-PA bewährt. Die anschließende Detektion erfolgte über Fluoreszenzmessung.^{238,239}

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine kolorimetrische Technik unter Verwendung von 96-Well Platten zur Detektion von Citrullin eingesetzt (Kapitel 8.3.2.14). Dieser Plattenreader-Assay wurde von KNIPP und VASÁK erstmals beschrieben und von KOTTHAUS *et al.* und ALTMANN *et al.* modifiziert.^{91,239,259} Der Citrullin-Nachweis basiert auf einer von FEARON beschriebenen Reaktion.²⁶⁰ Dabei reagiert L-Citrullin mit Diacetylmonoxim in Gegenwart von starken Säuren in einer Kondensationsreaktion zu Glycolurilen. Diese bilden in der Hitze in Gegenwart von Fe^{3+} -Ionen einen lichtempfindlichen Farbstoff unbekannter Struktur.²⁶¹ Das bei der Kondensationsreaktion entstehende und die Farbstoff-Bildung störende Hydroxylamin konnte durch Zugabe von Thiosemicarbazid reduziert werden.²⁵⁹ Der gebildete Farbstoff wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 540,5 nm detektiert.

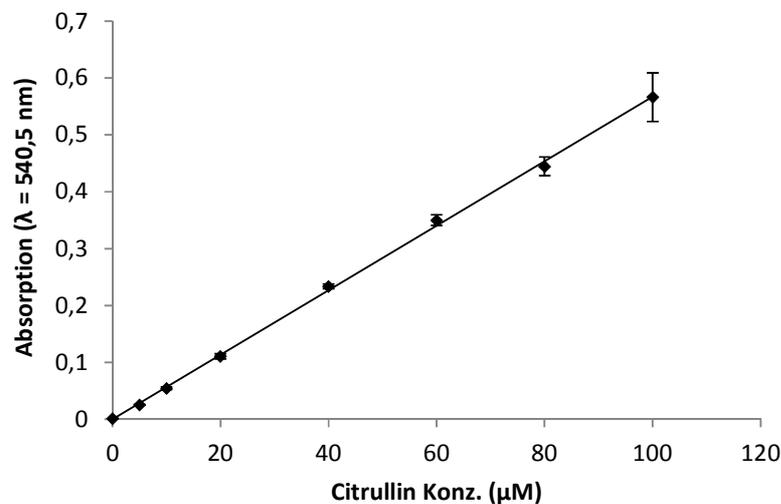


Abbildung 6-7: Beispiel einer Kalibrierung des kolorimetrischen Plattenreader-Assays mit L-Citrullin. Die ermittelten Absorptionen sind MW \pm SD von Dreifachbestimmungen ($R^2 = 0,9992$).

In der Regel konnten für die Kalibrierungen der Aktivitätsassays eine Richtigkeit mit Wiederfindungsraten für L-Citrullin zwischen 90 und 105 % ermittelt werden (**Abbildung 6-7**). So war es möglich, für die rekombinant hergestellte hDDAH-1 nach IEC eine Aktivität von $173,1 \pm 7,8 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ zu ermitteln. Diese Berechnung erfolgte basierend auf $3 \mu\text{g}$ eingesetztem Protein in einem Volumen von $150 \mu\text{L}$ und einer Inkubationszeit von 30 min. Die gemessene Aktivität korrelierte mit den Angaben vorangegangener Arbeiten.^{238,244} Im Rahmen dieser Arbeit sollten keine kinetischen Messungen hinsichtlich der katalytischen Aktivität der hDDAH-1 durchgeführt werden. Ziel der Aktivitätsassays war der Beweis für die katalytische Aktivität der rekombinant hergestellten und zweifach chromatografisch gereinigten hDDAH-1 hinsichtlich anschließender Kristallisations- und Cokristallisationsscreenings.

6.5 Kristallisations- und Cokristallisationsuntersuchungen

Da in der heutigen Zeit häufig Details zur Funktion eines Proteins über dessen dreidimensionale Struktur bestimmt werden, spielt die Proteinkristallografie eine entscheidende Rolle für das Verständnis dieser komplexen Biomoleküle. Ausgehend von der Auswahl eines Target-Proteins über die Klonierung und rekombinante Herstellung des Proteins stellt die Reinigung der Proteine im Großmaßstab eine besondere Herausforderung dar. Selbst wenn große Mengen eines hochreinen löslichen Proteins vorhanden sind, ist die Bildung eines geeigneten Proteinkristalls keineswegs garantiert. Daher ist die Kristallisation eines Proteins nach wie vor ein komplexer und multiparametrischer Prozess.^{262,263} In der Regel werden in Kristallisationsscreenings tausende verschiedene Bedingungen für die Kristallbildung parallel getestet. Diese Variabilität reicht von verschiedensten Puffersystemen über den Einfluss von Temperatur und Proteinkonzentration bis hin zu der Kristallisationstechnik. Dabei ist eine technische Ausstattung, die Screenings im Hochdurchsatz-Verfahren ermöglicht von entscheidendem Vorteil.^{262,264–266}

Die zentrale Aufgabe vor Beginn eines Kristallisationsscreenings ist die Herstellung hochreinen Proteins im Großmaßstab von mehreren Milligramm (25-100 mg).²⁶⁶ Die Problematik bezüglich der Proteinreinheit wurde bereits in Kapitel 6.3.1 erwähnt. Generell steigert die Reinheit eines Proteins den Erfolg des Kristallisationsscreenings. Allerdings ist es problematisch exakte Aussagen hinsichtlich der Proteinreinheit zu treffen. In der umfangreichen Literatur bezüglich der Kristallisation von Proteinen sind Richtwerte zu finden, die eine Reinheit von 90-95 % auf einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel als ausreichend für ein initiales Screening voraussetzen.^{253,267,268} In anderen Untersuchungen wird eine Proteinreinheit von 95-99 % für die Optimierung der Kristallisationsbedingungen gefordert.²⁶⁸ Aus diesem Grunde sollten in eigenen Untersuchungen, wie bereits beschrieben, höchste Ansprüche an die Reinheit der hergestellten hDDAH-1 gestellt werden.

Für die Kristallisation von Proteinen existiert eine Vielzahl von verschiedenen Techniken. Dabei reicht das Repertoire von Methoden der Dampfdiffusion über Dialyse und *Microfluides* bis hin zum *Microbatch*-Verfahren, bei dem eine wässrige Proteinlösung in Öl dispergiert wird.²⁶⁹⁻²⁷¹ Die Beschreibung jeder Kristallisationstechnik im Detail würde allerdings den Rahmen dieser Arbeit übersteigen.

Die Methode der Dampfdiffusion ist eine häufig eingesetzte und effiziente Technik für die Kristallisation von Proteinen.^{268,262} Das grundlegende Prinzip der Dampfdiffusion ist eine Gleichgewichtseinstellung zwischen einem Reservoir, dem ein Präzipitationsreagenz beigelegt wurde und einem proteinhaltigen Tropfen, der sich zu gleichen Teilen aus der Protein- und Reservoirlösung zusammensetzt. Dabei gehen Wassermoleküle aus der Proteinlösung mit geringerer Konzentration an Präzipitant dem Konzentrationsgefälle folgend in das Reservoir mit höherer Konzentration an Präzipitant über bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Das Kristallwachstum beginnt, wenn sich in dem Tropfen ein übersättigter Zustand bildet (Nukleationspunkt).

Um die Ergebnisse der langjährigen Untersuchungen des Arbeitskreises zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen verschiedenster Amidin- und Guanidin-basierter Inhibitoren der hDDAH-1 auf struktureller Ebene besser verstehen zu können, sollte die hDDAH-1 im Rahmen dieser Arbeit zunächst ohne Ligand und anschließend in Anwesenheit von AbMEG **9** (TFA-Salz) und **10** (HCl-Salz) kristallisiert werden. Die Kristallisationsexperimente wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Ingrid Vetter am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund durchgeführt.

6.5.1 Kristallisation der hDDAH-1

Die hDDAH-1 konnte bereits in der Vergangenheit von mehreren Arbeitsgruppen erfolgreich kristallisiert werden. Dabei handelte es sich um Kristallisations- und Cokristallisationsexperimente mit verschiedenen Liganden und Inhibitoren.^{258,272,257,273} In eigenen Untersuchungen sollte zunächst das Apoenzym kristallisiert und mit den Angaben in der Literatur verglichen werden.

Für die Kristallisation der hDDAH-1 ohne Ligand (apohDDAH-1) wurde das Protein in verschiedenen Konzentrationen. Das initiale Screening erfolgte auf *JCSG Core I-IV Suites*. Jede Kavität simulierte spezielle Kristallisationsbedingungen, die aus Erfahrungen von über einer halben Million erfolgreicher Kristallisationsexperimente am *Joint Centre for Structural Genomics* (JCSG) hervorgegangen sind.²⁷⁴ Die Tropfen, mit denen die Platten beladen wurden bestanden zu gleichen Teilen aus der Proteinlösung und dem Reservoir mit entsprechendem Präzipitans. Um den Einfluss der Temperatur auf die Kristallisation

der hDDAH-1 zu untersuchen, wurden Platten bei 4 °C und bei 20 °C angesetzt. Insgesamt konnten 2305 verschiedene Kristallisationsbedingungen parallel getestet werden.

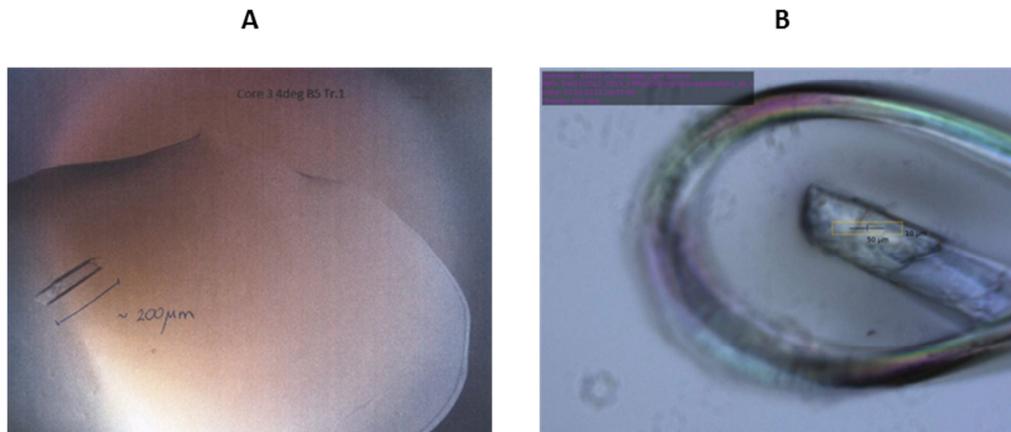


Abbildung 6-8: Ergebnisse des Kristallisationsscreenings der hDDAH-1 ohne Ligand. A) JCSG Core III B5 mit 200 µm großem Einzelkristall der hDDAH-1. B) hDDAH-1 Kristall in einer Cryoloop mit Markierung für die Strukturaufklärung durch das Swiss Light Source.

Das Screening mit der apohDDAH-1 brachte nach 21 Tagen einen 200 µm großen Proteinkristall mit für die Strukturaufklärung geeigneter Diffraction hervor (**Abbildung 6-8**). Die Strukturaufklärung erfolgte durch Röntgenstrahlung des Swiss Light Source des Paul Scherrer Instituts (Villigen, CH). Diese Strahlungsquelle lieferte intensive, monochromatische Röntgenstrahlung mit variabler Wellenlänge und einer Energie von 2,4 GeV. Über eine Beamline wurde die Strahlung auf den Kristall geleitet, der ein charakteristisches Diffraktogramm mit einer Auflösung von 2,7 Å erzeugte. Aus diesem Diffraktogramm ließen sich computergestützt die Elektronendichtekarte des Kristalls, welche Aufschluss über die Anordnung der Atome im Proteinkristall gab, ableiten (Kapitel 6.5.2). Die Ergebnisse der Kristallisation korrelieren mit den Angaben in der Literatur zu vorangegangenen Kristallisationsexperimenten mit der hDDAH-1, wonach ebenfalls Diffraktogramme mit Auflösungen zwischen 2,4 und 2,5 Å erzielt werden konnten.^{257,272}

6.5.2 Cokristallisation der hDDAH-1 mit AbMEG

Für die Cokristallisationsuntersuchungen wurde die hDDAH-1 in einer Konzentration von 15,7 mg/mL eingesetzt. Das Screening erfolgte ebenfalls auf JCSG Core I-IV Suites bei einer Temperatur von 4 °C. Um den Einfluss verschiedener Salzformen des AbMEG auf die Cokristallisation zu untersuchen, wurde der Inhibitor sowohl als Dihydrochloridsalz **10** als auch als Bistrifluoracetatsalz **9** in Konzentrationen von 1 mM und 5 mM eingesetzt. Insgesamt konnten 1152 verschiedene Kristallisationsbedingungen parallel getestet werden.

Das Cokristallisationsscreening ergab insgesamt vier Cokristalle mit geeigneter Diffraction für die anschließende Strukturaufklärung. Die Strukturaufklärung aller vier Cokristalle erfolgte durch die Synchrotronstrahlung des PETRA III des Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg. Diese 2304 Meter lange Strahlungsquelle liefert eine Energie von bis zu 6 GeV. Die von der Speicherring-Röntgenstrahlungsquelle PETRA III abgegebene Strahlung ist stärker und gebündelter als bei allen

anderen Speicherringen auf der Welt. So konnten bei der Strukturaufklärung der Cokristalle Auflösungen von 1,8, 1,8, 1,9 und 2,1 Å erreicht werden. Ab einer Auflösung ab etwa 3 Å lassen sich Seitenketten von Aminosäuren zuordnen. Bei einer Auflösung von 1,9 Å lassen sich die Positionen einzelner Atome mit einer Genauigkeit von $\pm 0,2$ Å bestimmen. Auf diese Weise war es möglich die Struktur der hDDAH-1 und ganz besonders das katalytische Zentrum mit AbMEG genauestens zu untersuchen.

In **Abbildung 6-9** ist die Struktur der hDDAH-1 mit AbMEG **10** gezeigt. In der Überlagerung der Elektronendichtekarten des Apoenzyms mit der des AbMEG-gebundenen Enzyms ist deutlich eine Konformationsänderung der hDDAH-1 am Arginin an Position 144 zu erkennen. Eine solche Konformationsänderung eines Enzyms, die erst durch die Bindung des Liganden zu Stande kommt, nennt man *induced fit*.²⁷⁵ In derselben Abbildung ist unter **B** ein Cartoon der hDDAH-1 mit AbMEG gezeigt, in dem die vielen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Guanidinfunktion und den Aminosäuren Asp-126 und Asp-78 des Enzyms dargestellt sind. Auch das terminale primäre Amin des AbMEG ist in der Lage Wasserstoffbrückenbindungen mit drei Aminosäuren auszubilden. Dadurch wird der sonst eher lipophile 4-Aminobutyl-Rest des Inhibitors in der Bindetasche der hDDAH-1 fixiert. Das polare Arg-144 wird vermutlich durch genau diese Lipophilie der Kohlenstoffkette aus dem katalytischen Zentrum verdrängt, wodurch der *induced fit* zu Stande kommt.

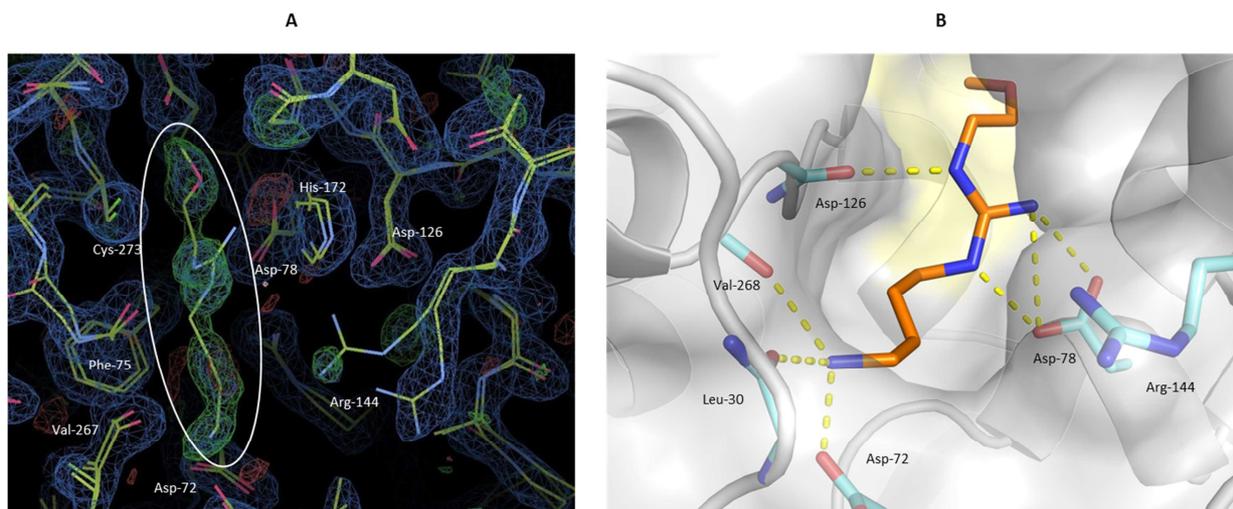


Abbildung 6-9: A) Elektronendichtekarte der apohDDAH-1 überlagert mit der der hDDAH-1 mit AbMEG **10** (weiß umrandete Struktur). Beschriftet sind die Aminosäuren des katalytischen Zentrums, die an der Bindung beteiligt sind. Blaue Atome: Stickstoff; rote Atome: Sauerstoff; grüne Atome: Schwefel (Cys-273); gelbe Atome: Kohlenstoff; rote Bereiche zeigen Wassermoleküle, blaue Bereiche das Proteingerüst, grüne Bereiche sind variabel wie z.B. der des AbMEGs. B) Struktur-Cartoon der hDDAH-1 mit AbMEG (mittels PyMol erstellt). Gelb-gestrichelte Linien zeigen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen AbMEG und den Aminosäuren des Proteins.

In **Abbildung 6-10** sind Elektronendichtekarten gezeigt, in denen zusätzlich die Karte der hDDAH-1 mit L-257 überlagert wurde. Hier wird besonders deutlich, dass L-257 über die α -Carboxylgruppe Wasserstoffbrücken zum Arg-144 ausbildet und dadurch die Konformationsänderung zu Stande kommt. Die gleiche Konformationsänderung am Arg-144 durch AbMEG hingegen beweist eindeutig, dass diese strukturelle Veränderung nicht durch das Vorhandensein der α -Carboxylgruppe hervorgerufen wird sondern vielmehr durch die starken Wechselwirkungen des Enzyms mit dem 4-Aminobutylrest und der

Guanidinfunktion. Interessant ist die Bedeutung der Methoxyethylfunktion: Bei der Betrachtung der Elektronendichtekarten fällt auf, dass sich um diese Funktion keine Aminosäuren befinden, die Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Sauerstoff ausbilden könnten. Wasserstoffbrückenbindungen wären allerdings nur eine mögliche Interaktion. Aus energetischer Sicht könnten weitere Faktoren wie der Entropie-Effekt hier eine Rolle spielen. Auch die geringe Größe der Bindetasche ist von Bedeutung, die aus sterischer Sicht keine großvolumigen N^ω -Substituenten zulässt. So ist auch zu erklären, dass nicht die chemische Natur der Methoxyethylfunktion entscheidend ist, sondern vielmehr dessen Größe. Dies erklärt auch, warum eine Verbindung wie **109** mit Butenylrest an N^ω -Position ebenfalls eine gute Hemmung zeigt. Zusammen mit den Daten verschiedener Amidinanaloga (**110-114**) zeigt sich, dass der Verlust der α -Carboxylgruppe nur durch die Guanidinfunktion in Kombination mit einem N^ω -Substituenten geeigneter Größe toleriert wird, der N^ω -Substituent alleine nicht ausreicht, um die hohe Affinität zum Enzym aufrechtzuerhalten (**Tabelle 6-2**). Die besondere Eigenschaft der hDDAH-1 solche strukturellen Veränderungen eines Liganden zu tolerieren, steht in scharfem Kontrast zu anderen Enzymen des NO-Stoffwechsels wie der NOS und Arginase, was die Basis höchster Selektivität liefert.

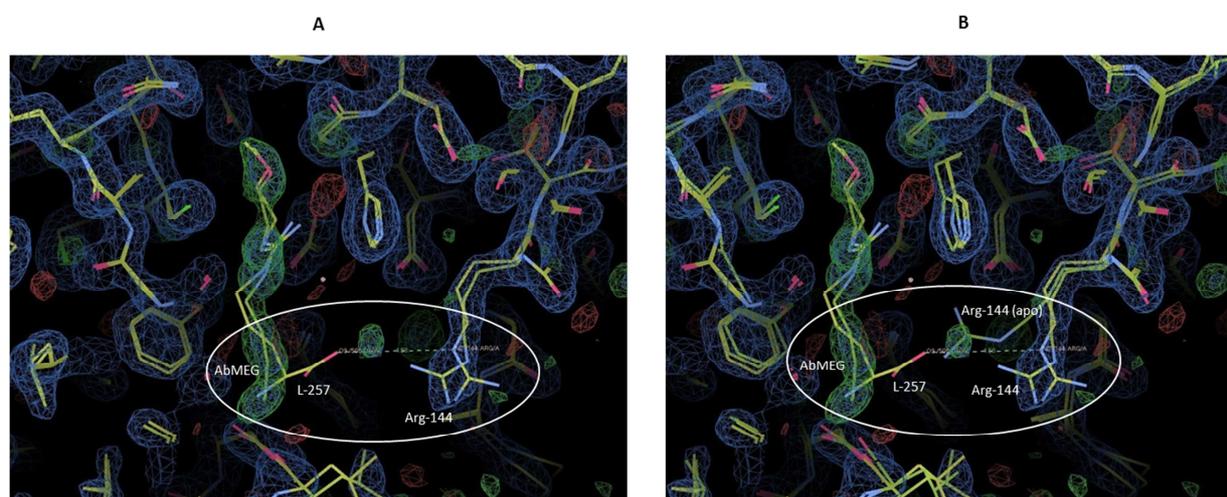


Abbildung 6-10: A) Elektronendichtekarte der hDDAH-1 mit AbMEG überlagert mit der Elektronendichtekarte der hDDAH-1 mit L-257 (MURRAY-RUST *et al.*).²⁷³ Weiß markiert ist die (Nicht-)Interaktion der Inhibitoren mit Arg-144. B) Elektronendichtekarte der apohDDAH-1 überlagert mit der der hDDAH-1 mit AbMEG und mit der Elektronendichtekarte der hDDAH-1 mit L-257 (MURRAY-RUST *et al.*).²⁷³ Weiß markiert ist die (Nicht-)Interaktion der Inhibitoren mit Arg-144 im Vergleich zu Arg-144 der apohDDAH-1.

Obwohl sich sowohl beim Einsatz des Dihydrochloridsalzes **10** als auch beim Einsatz des Bistrifluoracetatsalzes **9** Cokristalle der hDDAH-1 bildeten, war nur die Diffraktion an den Cokristallen mit 5 mM **10** für eine Strukturaufklärung geeignet.

6.6 Klonierung einer hDDAH-1 Mutante

Die Struktur-Wirkungsbeziehungen von AbMEG und L-257 durch eine Mutante der hDDAH-1 weiter zu untersuchen, wurde von Experimenten von NANDI *et al.* aus der Arbeitsgruppe LEIPER inspiriert.¹⁴⁷ Diese Autoren beschrieben, dass L-257 ein selektiver Hemmstoff der hDDAH-1 sei und die hDDAH-2 nicht

beeinflussen würde. Verantwortlich für diese Selektivität sei der sterische Anspruch des Methoxyethylrestes von L-257. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen den Positionen 121 und 144 der hDDAH-1 und den analogen Positionen 118 und 141 der hDDAH-2 zeigte, dass dieser Bereich hoch konserviert ist. Eine Ausnahme bildet Glycin an Position 129 der hDDAH-1, welches in der Sequenz der hDDAH-2 an analoger Position ein Threonin ist. In der Kristallstruktur der hDDAH-1 mit L-257²⁵⁷ und auch in der eigenen Kristallstruktur mit AbMEG konnte in der Tat eine Annäherung des Methoxyethylrestes an das Gly-129 beobachtet werden. NANDI *et al.* postulierten, dass die Seitenkette des Threonins an dieser Stelle eine sterische Blockade darstellte und der Methoxyethylrest aus diesem Grund nicht mehr in diese schmale Bindetasche passte.

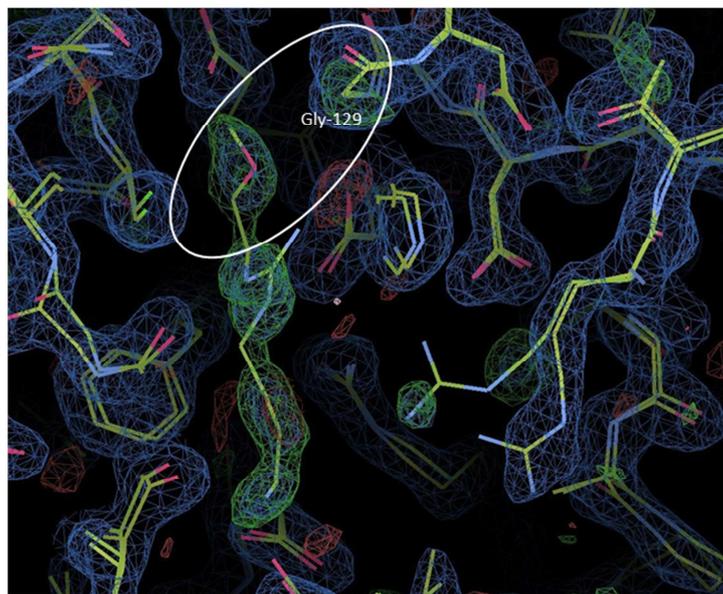


Abbildung 6-11: Elektronendichtekarte der apohDDAH-1 überlagert mit der der hDDAH-1 mit AbMEG **10**. Der weiß markierte Bereich zeigt die Nähe des Methoxyethylrestes zum Glycin an Position 129

NANDI *et al.* zeigten *ex vivo* durch den Vergleich der hDDAH-1/-2-Expression in Makrophagen und Aorta, dass die hDDAH-1 nur in der Aorta exprimiert war, wohingegen die hDDAH-2 auch in Makrophagen lokalisiert war. Durch Behandlung dieser Gewebe mit L-257 konnte demonstriert werden, dass durch steigende ADMA-Spiegel die NO-Produktion in den Aortageweben stark reduziert wurde, wohingegen diese in Makrophagen durch den Inhibitor nicht beeinträchtigt wurde.¹⁴⁷ Es wäre von großer therapeutischer Bedeutung gewesen, diese Isoformenselektivität auch für das AbMEG zu beweisen. Dazu sollte im Rahmen dieser Arbeit eine hDDAH-1 Mutante, bei der sich an der Position 129 statt eines Glycins ein Threonin befindet (hDDAH-1_G129T), kloniert und anschließend rekombinant in *E. coli* hergestellt werden. Dazu musste zunächst über eine Mutagenese-PCR ein neues Konstrukt mit dem Basenaustausch erzeugt werden (Kapitel 8.3). Bei dieser PCR diente das Konstrukt pQE30_hDDAH-1 als Template. Über Primer, welche die Sequenz für die Mutation beinhalteten, konnte das neue Konstrukt aufgebaut werden. Mithilfe einer DNA-Sequenzierung konnte die Mutation im neuen Konstrukt pQE30_hDDAH-1_G129T nachgewiesen werden. Auch die anschließende Überexpression des Proteins in *E. coli* und Reinigung an Ni²⁺-NTA war erfolgreich. Über die bereits etablierte IEC konnte analog zu der

Reinigung der rekombinanten hDDAH-1 auch die mutierte hDDAH-1_G129T in hoher Reinheit erhalten werden.

In folgenden Aktivitätsassays sollte zunächst die Umsetzung der Substrate ADMA, NMMA und des alternativen Substrats SMTC durch die hDDAH-1_G129T gezeigt werden. Allerdings war in keiner der durchgeführten Aktivitätsuntersuchungen eine Umsetzung zu L-Citrullin zu beobachten. Auch durch unterschiedliche Puffersysteme konnte keine Aktivität dieser Mutante detektiert werden (**Abbildung 6-12**). Da für die Mutante bereits keine Umsetzung der natürlichen Substrate nachgewiesen werden konnte, musste auch auf weitere Untersuchungen mit AbMEG verzichtet werden.

Interessant erschien in diesem Zusammenhang, dass bereits der Austausch einer Aminosäure an dieser Engstelle des aktiven Zentrums zu einem vollständigen Aktivitätsverlust führte. In vorangegangenen Arbeiten des Arbeitskreises konnte die hDDAH-2 zwar erfolgreich rekombinant hergestellt werden, aber in keiner der Untersuchungen wurde eine Umsetzung von ADMA, NMMA oder SMTC durch dieses Enzym nachgewiesen.^{244,238,257} Da sowohl die hDDAH-2 als auch die hDDAH-1_G129T in diesem Bereich des katalytischen Zentrums beide das sterisch anspruchsvollere Threonin aufweisen, unterstützten die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen mit der hDDAH-1_G129T diese kontrovers diskutierte Meinung, dass die hDDAH-2 die *N*^w-methylierten Arginine ADMA und NMMA nicht zu L-Citrullin umsetzt.

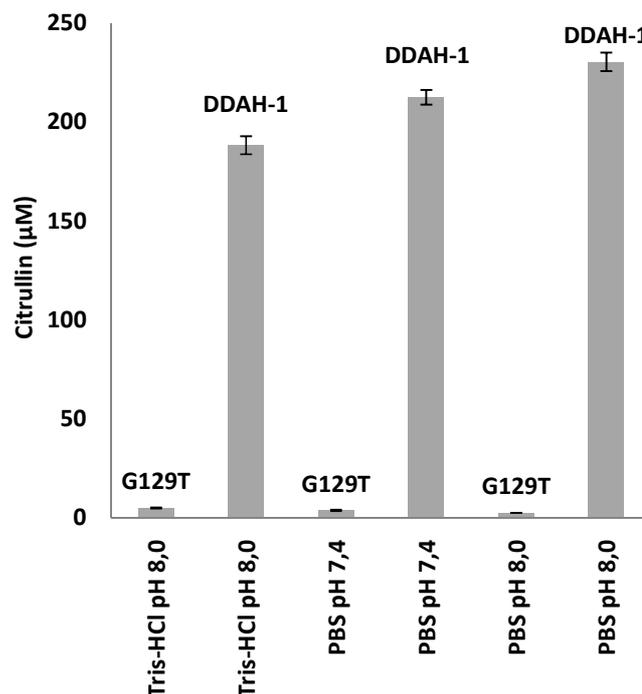


Abbildung 6-12: Ergebnisse der Aktivitätsuntersuchungen der hDDAH-1_G129T in verschiedenen Puffersystemen. Jedem Puffer waren 8 mM ADMA zugesetzt. PBS = *Phosphate Buffered Saline*. Die gemessenen Citrullin-Konzentrationen sind MW \pm SD von Dreifachbestimmungen.

6.7 Zusammenfassung und Ausblick

Um die Ergebnisse der intensiven Untersuchungen zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen verschiedener Inhibitoren der hDDAH-1 besser verstehen zu können, war ein Ziel dieser Arbeit die Kristallisation der hDDAH-1 und anschließender Cokristallisation mit AbMEG als Bistrifluoracetatsalz **9** und als Dihydrochloridsalz **10** (die Darstellung der Verbindung **10** ist in Kapitel 8.1.2.3 beschrieben). Dazu musste zunächst die hDDAH-1 durch Einsatz eines Fermenters in großer Menge rekombinant hergestellt werden. Die Reinigung des Proteins verlief über Affinitätschromatografie an Ni²⁺-NTA mit anschließender Ionenaustauschchromatografie auf einer starken Anionenaustauschersäule. So konnte das Protein in einer hohen Reinheit isoliert werden, die für ein Kristallisationscreening erforderlich war. In einem kolorimetrischen Aktivitätsassay wurde zusätzlich die katalytische Aktivität des rekombinant hergestellten Enzyms nachgewiesen. Damit waren alle funktionellen Voraussetzungen für ein initiales Kristallisationscreening mit der hDDAH-1 gegeben. Durch ein Screening im Hochdurchsatz-Verfahren konnten für das Apoenzym 2305 und für die Cokristallisation mit AbMEG 1152 verschiedene Kristallisationsbedingungen parallel getestet werden. Insgesamt lieferte das Screening einen Proteinkristall der apohDDAH-1, dessen Struktur mit einer Auflösung von 2,7 Å aufgeklärt werden konnte. Das Cokristallisationscreening brachte sogar vier Proteinkristalle der hDDAH-1 mit dem Dihydrochloridsalz von AbMEG hervor, dessen Strukturen mit exzellenten Auflösungen von 1,8-2,1 Å aufgeklärt werden konnten.

Durch rationales Design, Synthese sowie biochemische Charakterisierung verschiedenster Amidin- und Guanidin-basierter Inhibitoren der hDDAH-1 in vorangegangenen Arbeiten konnten im Rahmen dieser Arbeit mithilfe der Ergebnisse der (Co)Kristallisationsuntersuchungen die Schlüsselstrukturen ermittelt werden, die Voraussetzung für eine hohe Affinität waren und zugleich die gewünschte Selektivität gegenüber der NOS und Arginase lieferten. Die Auswertung dieser Untersuchungen lieferte den Beweis, dass die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und AbMEGs Guanidinstruktur in Kombination mit dem Methoxyethylrest am N^ω-Stickstoff durch einen *induced fit* den Verlust der α-Carboxylgruppe kompensierten

In zukünftigen Arbeiten sollten auf der Basis dieser Ergebnisse zusätzliche strukturelle Modifikationen an AbMEG erfolgen, die die Affinität und Selektivität des Inhibitors weiter steigern könnten. Durch die in der Kristallstruktur ersichtliche Bedeutung der 4-Aminobutylfunktion wären die Einführung einer terminalen Amidin- oder Guanidinfunktion interessante Optionen, da diese mehr Interaktionen zum Protein ausbilden könnten als eine einzelne Aminogruppe. Diese strukturellen Modifikationen könnten durch neuere Erkenntnisse gestützt werden, wonach AbMEG möglicherweise in einer alternativen Orientierung an das katalytische Zentrum der hDDAH-1 bindet. Diese Erkenntnis sollte in zukünftigen Arbeiten durch die Synthese und Cokristallisation eines Schwefel-Analogons von AbMEG geklärt werden, da Schwefelatome in Elektronendichtekarten präziser lokalisierbar sind als Sauerstoffatome. Da es sich bei AbMEG um ein stark basisches Guanidin handelt, welches unter physiologischen Bedingungen größtenteils protoniert vorliegt, sollte auch bei dieser Verbindung über geeignete Prodrugstrategien nachgedacht werden, die den Arzneistoffcharakter des AbMEGs verbessern. LUNK konnte bereits ein N^ω-Hydroxy- und N^ω-Methoxy-Prodrug von AbMEG synthetisieren.¹³⁶ Die Veresterung der α-Carbonsäure wäre eine zusätzliche Option.

Durch die Herstellung einer hDDAH-1_G129T Mutante konnte ein interessanter Einblick über die Empfindlichkeit der katalytischen Aktivität des Proteins gewonnen werden. Durch den Austausch eines Glycins an Position 129 durch ein Threonin sollte primär die Isoformenselektivität des AbMEG gegenüber der hDDAH-2 nachgewiesen werden. Stattdessen beobachtete man den vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität. Diese Beobachtungen korrelierten mit den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten im Arbeitskreis, die alle zu dem Fazit kamen, dass die hDDAH-2 die Umsetzung der N^{ω} -methylierten Arginine ADMA und NMMA zu L-Citrullin nicht katalysiert. Bisher konnte lediglich die Arbeitsgruppe von LEIPER diese Umsetzung beobachten. Hier wäre in zukünftigen Untersuchungen eine Mutante der hDDAH-2 interessant, die an analoger Position statt des Threonins ein Glycin aufweist. Diese Mutation könnte Aufschluss geben, ob die sterische Blockade der Bindetasche durch die Seitenkette des Threonins tatsächlich die Ursache für die fehlende katalytische Aktivität ist.

7 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Aufgrund der Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Funktionen von Stickstoffmonoxid ist die strikte Regulation endogener NO-Spiegel von großer Bedeutung. Gerät diese NO-Regulation außer Kontrolle, können damit diverse ernsthafte Erkrankungen assoziiert sein. Eine solche Dysregulation kann sowohl mit erhöhter als auch mit erniedrigter NO-Verfügbarkeit einhergehen. Daher ist es eine große Herausforderung neue Arzneistoffe zu entwickeln, die gezielt in diesen streng regulierten Stoffwechsel eingreifen, um nur bestimmte NO-abhängige Effekte zu beeinflussen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung neuer Modulatoren des NO-generierenden Systems auf der Basis physiologischer Substrate und im Verständnis deren Wirkmechanismen an den entsprechenden Zielstrukturen. Die Entwicklung aller Verbindungen verlief in Anlehnung an das natürliche L-Arginin, der zentralen Aminosäure des NO-Stoffwechsels, und seiner Metaboliten mit dem Ziel folgender chemischer Modifikationen:

- eine gezielte Monomethylierung der N^{δ} -Position des L-Arginins und L-Ornithins
- Prodrugs des N^{ω} -Hydroxy-L-arginins durch O-Konjugation der Hydroxyguanidinfunktion mit verschiedenen acetalischen Gruppen

Die N^{ω} -methylierten-L-Arginine NMMA und ADMA sind gründlich untersuchte endogene Substrate der DDAH und gleichzeitig kompetitive Inhibitoren der NO-Synthasen. Das natürliche Vorkommen des N^{δ} -Methyl-L-arginins war für lange Zeit nur in Hefezellen bekannt, bis es in jüngsten Untersuchungen erstmals im Menschen nachgewiesen werden konnte.⁷³ Die (patho)physiologische Funktion dieses posttranslational modifizierten L-Arginins ist noch weitestgehend unbekannt, wird aber sicher eine zentrale Rolle in zukünftigen Untersuchungen des L-Arginin-Metabolismus spielen.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit eine gemeinsame Synthese für enantiomerenreines N^{δ} -Methyl-L-arginin und dessen potentiellen Metaboliten N^{δ} -Methyl-L-ornithin entwickelt werden. Die hohe optische Reinheit beider Verbindungen ist von großer Bedeutung, da zukünftige biologische Untersuchungen aufgrund der hohen Substratspezifität der NOS, Arginase und DDAH auf das Vorhandensein der natürlichen L-Aminosäuren angewiesen sein werden. Durch den Einsatz enantiomerenreinen Ausgangsmaterials und eines geeigneten Schutzgruppenkonzeptes konnte das Racemisierungsrisiko auf ein Minimum reduziert werden. Dazu wurde eine 2-Nitrophenylsulfonamid-Schutzgruppe eingeführt, die einerseits die selektive Monomethylierung der N^{δ} -Position ermöglichte und andererseits unter schonenden Bedingungen mit Thiophenol abgespalten werden konnte. Aus der in sieben Stufen erhaltenen universellen Vorstufe **33** konnten beide N^{δ} -methylierten Aminosäuren **1** und **2** dargestellt werden. Das direkte Entschützen von **33** mit Chlorwasserstoff unter absolutierten Bedingungen lieferte **2** in einer Gesamtausbeute von 21 %. Die Guanidierung von **33** mit Di-Boc-Thioharnstoff **16** und EDCI an Stelle des toxischen und weniger effizienten $HgCl_2$ lieferte das vollgeschützte N^{δ} -Methyl-L-arginin **34**, aus dem nach analoger Deprotektion das N^{δ} -Methyl-L-arginin **1** als Dihydrochloridsalz in einer Gesamtausbeute von 20 % erhalten werden konnte.

Die Enantiomerenreinheit wurde flüssigchromatografisch mittels Ligandenaustauschchromatografie bestimmt. So konnte für *N*^δ-Methyl-L-arginin **1** ein Enantiomerenüberschuss von über 99 % ermittelt werden. Die nahezu identischen Drehwerte beider Aminosäuren lieferten den Beweis für die optische Reinheit von **2**.

Mit der Entwicklung neuartiger Prodrugs des *N*^ω-Hydroxy-L-arginins wurde zudem eine neue potentielle Strategie zur Behandlung unterschiedlicher kardiovaskulärer Erkrankungen verfolgt. Es gelang im Rahmen dieser Arbeit eine Serie verschieden substituierter und carbamatfreier *O*-Galactosyl- und *O*-Glucosyl-Prodrugs von NOHA zu synthetisieren. Dabei wurde eine bewährte Strategie zum Aufbau von Guanidinen durch Umsetzung von Carbamoylthioharnstoffen mit den entsprechenden Hydroxylaminen und EDCI als Kopplungsreagenz eingesetzt.¹⁰⁵ Das Ziel carbamatfreier Verbindungen war nur durch ein neuartiges orthogonales Schutzgruppenkonzept umsetzbar, das zunächst an einfachen Modellverbindungen etabliert werden konnte. Entscheidend bei der Auswahl geeigneter Schutzgruppen waren dessen Abspaltungsbedingungen, die kompatibel mit dem Substitutionsprofil der Prodrugs sein mussten. Es zeigte sich, dass eine Alloc-geschützte Modellverbindung **67** Pd(0)-katalysiert und mit Dimedon als Allylgruppenakzeptor zu der ersten carbamatfreien Verbindung **54** entschützt werden konnte. Dieses Konzept ist anschließend erfolgreich auf die Synthese der geplanten Prodrugs übertragen worden. Die ersten carbamatfreien *O*-glycosidischen Prodrug-Vorstufen **73** und **82** sowie **89** und **90** konnten analog zu der Modellverbindung durch Alloc-Abspaltung dargestellt werden. Die finale Deprotektion der α -Aminosäure gelang mit Chlorwasserstoff unter absolutierten Bedingungen. Auf diese Weise konnten die Galactosyl- und Glucosyl-Prodrugs **75** und **92** als Dihydrochloridsalze isoliert werden. Um die vollständig entschützten Verbindungen **76** und **94** zu erhalten, wurden die Acetylgruppen der Zucker durch Umesterung abgespalten. Durch Veresterung von **73** und **89** mit Ethanol konnten die ersten deacetylierten Ethylester-Prodrugs **74** und **91** synthetisiert werden. Für die Ethylester-Prodrugs mit peracetyliertem Zucker **83** und **93** konnte eine alternative Synthesestrategie etabliert werden, in der zunächst einfach Boc-geschütztes Ornithin **3** mit Ethanol zu **77** verestert und anschließend mithilfe des neuen Schutzgruppenkonzeptes in weiteren vier Stufen zu den Prodrugs **83** und **93** umgesetzt wurde. Die breite Anwendbarkeit dieser effizienten Synthese zeigte sich schlussendlich in der Darstellung des ersten Prodrugs mit offener, nicht-zyklischer Acetalstruktur **103**. Für die Einführung dieser offen-acetalischen Prodrug-Gruppe war es erstmals gelungen ein dafür benötigtes Hydroxylamin **98** synthetisch zugänglich zu machen.

In der gleichzeitig angefertigten Arbeit von GUDD konnte mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen bewiesen werden, dass das Galactosyl-Prodrug **83** etwa 75 % des Effektes von NOHA erzielte und alle vier Glucosyl-Prodrugs Stickstoffmonoxid sogar in gleichem Maße freisetzten wie NOHA. Somit wurde gezeigt, dass diese Prodrugs in zellulären Systemen bioaktiviert wurden.²¹¹ Des Weiteren wurde *in vitro* beobachtet, dass β -Glucosidasen im Gegensatz zu β -Galactosidasen weitaus weniger substratspezifisch waren und auch peracetylierte Zucker-Prodrugs akzeptierten. Aufgrund dieser Ergebnisse wären die Verbindungen der Glucoseserie in zukünftigen Arbeiten die Prodrugs der Wahl für weiterführende präklinische *proof-of-concept* Studien. Generell kann keines der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Prodrugs mehr NO freisetzen als NOHA selbst. Auch eine stärkere zelluläre Aufnahme zu erzielen, als die durch Aminosäuretransporter, ist schwierig. Daher war es ein optimales Resultat, dass die Glucosyl-Prodrugs ähnlich gut in Zellen aufgenommen wurden wie NOHA, unabhängig davon, ob der Zucker geschützt oder ungeschützt war oder die α -Carbonsäure frei oder verestert vorlag.²⁷⁶

Ebenfalls wäre in künftigen Arbeiten die biochemische Charakterisierung des offen-acetalischen Prodrugs **103** sinnvoll, dessen Prodrugkonzept sich bereits erfolgreich beim zugelassenen Tenofoviridisoproxil durchsetzte. Auch könnte die Entwicklung eines α -Ethylesters oder einer höher substituierten Acetal- oder Ketalstruktur von **103** in Zukunft Gegenstand weiterer Arbeiten darstellen.

Die Hemmung der hDDAH stellt eine wertvolle pharmakologische Strategie zur Senkung pathophysiologischer NO-Spiegel dar. Über die indirekte Inhibition der NO-Synthasen durch den reduzierten Abbau endogenen ADMA's und NMMA's ergibt sich eine mögliche neue Option zur Intervention bei Erkrankungen wie der Migräne oder dem septischen Schock.

Dazu wurden im Arbeitskreis CLEMENT bereits eine Vielzahl strukturell unterschiedlichster Inhibitoren synthetisiert und an den Enzymen hDDAH, NOSs und Arginase hinsichtlich ihrer Hemmpotenz und ihres Selektivitätsprofils untersucht. Hierdurch konnten wichtige Erkenntnisse über die Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen den Enzymen und den Inhibitoren gewonnen werden. Durch die Entwicklung von AbMEG gelang es, den derzeit selektivsten und zugleich potenten Hemmstoff der hDDAH-1 zu entwickeln.¹⁴⁶ Dabei zeigte sich, dass der Verlust der α -Carboxylgruppe beim AbMEG im Gegensatz zu anderen Inhibitoren von der hDDAH-1 toleriert wurde, nicht aber von der Arginase und NOS. Zudem war auffallend, dass die Größe des N^{ω} -Substituenten eine entscheidende Rolle für die Affinität zur hDDAH-1 spielte. Mithilfe dieser Ergebnisse konnten zwar die für die Bindung an die hDDAH-1 wichtigen Strukturelemente herausgearbeitet werden, nicht aber welche Mechanismen für diese Bindung an das Enzym verantwortlich waren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit der Cokristallisation von AbMEG mit der hDDAH-1 der abschließende Beweis erbracht werden, warum AbMEG ein so hochpotenter Hemmstoff der hDDAH-1 darstellt und welchen Einfluss seine funktionellen Gruppen auf die Bindung an das katalytische Zentrum des Enzyms haben. Durch die rekombinante Herstellung der hDDAH-1 im Fermenter konnte eine für die (Co)Kristallisationsscreenings ausreichende Menge Rohprotein gewonnen werden. In der anschließenden chromatografischen Reinigung des Proteins etablierte sich eine Kombination aus manueller Affinitätschromatografie an Ni^{2+} -NTA mit darauffolgender FPLC-gestützten Ionenaustauschchromatografie an einem starken Anionenaustauscher. Durch Optimierung der IEC von einfachen manuellen Vorversuchen hin zu einer effizienten FPLC-Methode konnten 31,2 mg hochreiner hDDAH-1 erhalten werden, was bezogen auf das eingesetzte Rohprotein einer Gesamtausbeute von 69 % entsprach. Die hohe Reinheit der hDDAH-1 wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie- und Silber-Färbung demonstriert. Die Identität der rekombinant hergestellten hDDAH-1 konnte mittels Western-Blot-Analyse und die katalytische Aktivität des Enzyms in kolorimetrischen Plattenreader-Assays bestätigt werden. Die in der Arbeitsgruppe VETTER durchgeführten (Co)Kristallisationsuntersuchungen lieferten (Co)Kristalle, dessen Strukturen mit Auflösungen von 1,8 -2,7 Å aufgeklärt werden konnten.

Durch diese effizienten Kristallisationsscreenings mit anschließend hochpräziser Strukturaufklärung war es möglich, genaue Erkenntnisse über AbMEG's Bindemodus im katalytischen Zentrum der hDDAH-1 zu gewinnen. Die abschließende Auswertung der (Co)Kristallisationsuntersuchungen lieferte den Beweis, dass die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und AbMEG's Guanidinstruktur in Kombination mit dem Methoxyethylrest am N^{ω} -Stickstoff durch einen *induced fit* den Verlust der α -Carboxylgruppe kompensierten.

In zukünftigen Arbeiten könnten weitere Inhibitoren auf Basis von AbMEG entwickelt werden, die ein möglicherweise noch besseres Selektivitätsprofil gegenüber der NOS und Arginase aufweisen. Auch das Ergebnis, dass eine hDDAH-1G129T Mutante keine weitere Umsetzung von ADMA und NMMA katalysiert, sollte Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten sein. Hierbei wäre ein Vergleich mit einer Rückmutation oder einer rekombinant hergestellten hDDAH-2 Mutante mit einem Glycinrest anstelle des natürlichen Threoninrestes an analoger Position von großem Wert hinsichtlich der Untersuchung der katalytischen Aktivität beider Isoenzyme.

8 EXPERIMENTELLER TEIL

8.1 Synthesen

8.1.1 Geräte und Materialien

Dünnschichtchromatografie:

DC-Fertigplatten: Polygram SIL G/UV₂₅₄ 0,2 mm Kieselgel der Fa. Macherey-Nagel, Düren. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm (Fluoreszenzlöschung). Verbindungen, die auf diese Weise nicht detektierbar waren, wurden mit folgenden Sprühreagenzien behandelt:

Reagenz A: Ninhydrin-Sprühreagenz

300 mg Ninhydrin, 95 mL *i*-Propanol, 5 mL Eisessig

Reagenz B: unspezifisches Oxidanz

0,2 % (m/v) Ce(SO₄)₂, 5 % (m/v) konz. H₂SO₄, 5 % (m/v), (NH₄)₂Mo₃O₇ in EtOH

Reagenz C: Ehrlichs Reagenz

1 % (m/v) 4-(*N,N*-Dimethylamino)benzaldehyd in konz. HCl/Methanol 1 : 1

Elementaranalysen:

CHNS-Analysator, HEKAtech GmbH, Institut für Anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

NMR-Spektroskopie:

Kernresonanzspektrometer Bruker *Avance* III, 300, Bruker Topspin 2.1 Software, 298 K

¹H-NMR: Messfrequenz = 300,13 MHz

¹³C-NMR: Messfrequenz = 75,47 MHz

¹⁵N-NMR: Messfrequenz = 30,42 MHz

³⁵Cl-NMR: Messfrequenz = 29,42 MHz

Interne Standards: Tetramethylsilan (TMS). Sind keine internen Standards angegeben, beziehen sich die chemischen Verschiebungen auf das Signal des verwendeten Lösungsmittels.

Externe Standards: Bei ¹H-NMR Messungen in D₂O erfolgte die Auswertung bezogen auf den externen Standard Natrium-3-(trimethylsilyl)propan-1-sulfonat (TPS). Bei ¹⁵N-NMR Messungen erfolgte die Auswertung bezogen auf den externen Standard Nitromethan (0,2 %) in DMSO-*d*₆ bzw. CDCl₃

($\delta/\text{ppm} = 381.6$). Bei ^{35}Cl -NMR Messungen erfolgte die Auswertung bezogen auf den externen Standard NaCl in D_2O ($\delta/\text{ppm} = 0$).

Zur Charakterisierung der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet:

s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett eines Dubletts, ddd = Dublett eines Dubletts eines Dubletts, t = Triplett, ddt = Dublett eines Dubletts eines Triplets, dt = Dublett eines Triplets, td = Triplett eines Dubletts, q = Quartett, m = Multiplett, J = Kopplungskonstante in Hz, br = verbreitertes Signal, Ar = Aromat, pseudo = Signal, dessen äußere Erscheinung von der eigentlichen Multiplizität abweicht.

Die Auswertung der Signale erfolgte gemäß den Regeln für Spektren 1. Ordnung.

Massenspektrometrie:

Bruker Esquire~LC, Elektrosprayionisierung (ESI), im positiven Modus oder Bruker amaZon SL-LC, Elektrosprayionisierung (ESI), im positiven Modus unter Verwendung einer Agilent Zorbax Eclipse XDB-C8-Säule, $125 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$.

Elution: Eluent A: 10 % Acetonitril, 90 % 0,1 %ige Essigsäure;

Eluent B: 95 % Acetonitril, 5 % 0,1 %ige Essigsäure.

Gradient: 0-1 min (100 % A), 1-10 min (0-90 % B), 10-12,9 min (90 % B), 12,9-13 min (90-0 % B);
Flussrate: 1,5 mL/min.

Hochauflösende Massenspektrometrie:

Alle Spektren wurden mit einem Bruker APEX III FT-ICR Massenspektrometer mit einem 7.05 T Magneten (Bruker Daltronics, Bremen) am Institut für Physikalische Chemie der Christian-Albrechts-Universität in Kiel aufgenommen. Die Proben wurden in Ethanol gelöst und mit einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol, Wasser und Ameisensäure (49,9/49,9/0,2) auf eine Konzentration von ca. 100 pmol / μL verdünnt. Mit Hilfe einer ESI-Quelle wurden die Proben in die Gasphase gebracht und konnten in das Massenspektrometer eingebracht werden. In den Spektren ist jeweils nicht die Masse der neutralen Verbindung zu sehen, sondern immer das $[\text{M} + \text{H}]^+$ als Quasimolekülion.

Schmelzpunkte:

Schmelzpunktapparatur Stuart Scientific SMP3. Die Angabe der Schmelzpunkte erfolgt unkorrigiert.

Infrarotspektroskopie:

Alle Spektren wurden mit einem Shimadzu IRAffinity-1S FTIR Spektrometer mit MIRacle 10 Single Reflection ATR Accessory aufgenommen. Es werden für die entsprechende Verbindung charakteristische Banden in cm^{-1} angegeben. Eine Unterscheidung zwischen Valenz- und Deformationsschwingungen erfolgte nicht.

Präparative Chromatografie:

Die säulenchromatografische Aufreinigung der Syntheseprodukte erfolgte über Kieselgel G_{60} , 0,063-0,2 mm der Fa. Macherey-Nagel, Düren. Die Säulenchromatografie auf Umkehrphasen erfolgte auf Kieselgel 60 silanisiert (0,063-0,2 mm) der Fa. Merck, Darmstadt.

Die Flashchromatografie wurde mit der Anlage CombiFlash® Rf 200i (Teledyne Isco) unter Verwendung von Interchim PF-30SIHO-JP/12G-, PF-30SIHO-JP/40G-Säulen (0,03 mm) oder PF-15SIHP/12G-Säulen durchgeführt. Die Flashchromatografie auf Umkehrphasen erfolgte auf RP-18 RediSep®-Säulen (43 g).

Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Acros, Alfa-Aesar/Lancaster, Fluka, Sigma-Aldrich, Merck, Roth, TCI-Europe und VWR kommerziell erworben und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. EDCI und geschützte Aminosäuren wurden von der Fa. Bachem bezogen.

Methanol für die Chromatografie in HPLC-Qualität wurde von der Fa. J.T. Baker, Griesheim, bezogen.

Diethylether wurde über Natrium-benzophenonketyl absolutiert und direkt eingesetzt. Trockenes Acetonitril wurde erhalten, indem kommerziell erhältliches Acetonitril in HPLC-Qualität mindestens 24 h über ausgeglühtem Molekularsieb getrocknet und anschließend direkt eingesetzt wurde. Trockener Ethanol wurde durch Erhitzen mit Natriumdraht und anschließendem Refluxieren mit Phthalsäurediethylester gewonnen. Beim Einsatz feuchtigkeitsempfindlicher Verbindungen wurden alle verwendeten Glasgeräte ofengetrocknet und die Apparaturen mit Stickstoff oder Argon gespült.

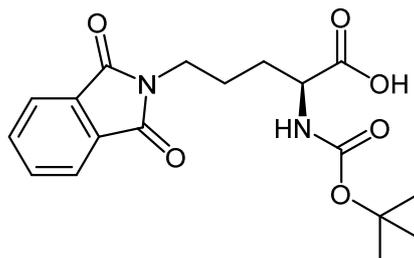
8.1.2 Synthesevorschriften

8.1.2.1 Synthese der N^{δ} -methylierten L-Argininderivate

8.1.2.1.1 N^{δ} -Methyl-L-arginin

N^{α} -(*tert*-Butyloxycarbonyl)- N^{δ} -phthalimido-L-ornithin (**24**)

Synthesevorschrift in Anlehnung an SASAKI *et al.*:¹⁶⁸



Es werden 1,94 g (8,4 mmol) N^{α} -(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-ornithin **3** und 2,22 g (15,0 mmol) Phthalsäureanhydrid **23** in 20 mL Chloroform suspendiert und anschließend mit 150 mL Tetrachlorethylen versetzt. Der Ansatz wird zunächst zwei Stunden bei 60 °C und anschließend weitere sechs Stunden bei 100 °C gerührt (DC-Kontrolle). Die Lösung wird im Vakuum bis zur Trockne einkonzentriert und weiter mittels Flashchromatografie aufgereinigt (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol, 0-5 %).

Ausbeute: 1,9 g (61 %) eines weißen, kristallinen Feststoffs

Schmelzpunkt: 126 °C

DC: $R_f = 0,54$ (Dichlormethan/Methanol, 9:1; Reagenz A, UV)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 1.43$ (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.65-2.00 (m, 4 H, β , γ - CH_2), 3.72 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2 H, δ - CH_2), 4.14-4.37 (m, 1 H, α -CH), 5.16 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, NH), 7.68-7.75 (m, 2 H, ArH), 7.80-7.86 (m, 2 H, ArH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 24.8$ (γ - CH_2), 28.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.8 (β - CH_2), 37.4 (δ - CH_2), 53.0 (α -CH), 80.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 123.3 (2 \times ArCH), 132.0 (2 \times ArC), 134.0 (2 \times ArCH), 155.6 (CO-Boc), 168.4 (2 \times CO-Pht), 176.5 (COOH).

IR (ATR):

$\text{cm}^{-1} = 2976, 1771, 1697, 1514, 1396, 1366, 1159, 1047, 718.$

MS (ESI):

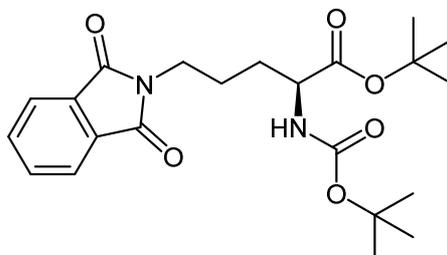
$m/z = 725 [2 \times M + \text{H}]^+$, 625 $[2 \times M - \text{C}_4\text{H}_8 - \text{CO}_2 + \text{H}]^+$, 363 $[M + \text{H}]^+$, 263 $[M - \text{C}_4\text{H}_8 - \text{CO}_2 + \text{H}]^+$.

Elementaranalyse $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_6$ (362.38):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 59.66 | H 6.12 | N 7.73, |
| gefunden: | C 59.21 | H 6.15 | N 7.58. |

***N*^α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*^δ-phthalimido-L-ornithin-*tert*-butylester (26)**

Synthesevorschrift in Anlehnung an MOALI *et al.*:¹⁶⁹



1,87 g (5,2 mmol) *N*^α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*^δ-phthalimido-L-ornithin **24**, 1,17 g (5,2 mmol, 1 eq.) BTEAC, 27 mL (239 mmol, 46 eq.) *tert*-Butylbromid **25** und 19 g K₂CO₃ (135 mmol, 26 eq.) werden in 40 mL DMAC gegeben und fünf Stunden bei 55 °C unter Rückflusskühlung erhitzt. Der Ansatz wird auf Raumtemperatur abgekühlt und der Rückflusskühler mit Ethylacetat gespült. Die Salze werden abfiltriert und dreimal mit jeweils 25 mL Ethylacetat gewaschen. Anschließend wird das Filtrat dreimal mit jeweils 20 mL Wasser gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen mit 25 mL Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Flashchromatografie aufgereinigt (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-20 %).

Ausbeute: 2,0 g (93 %) eines farblosen Öls

DC: $R_f = 0,48$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 2:1; Reagenz A, UV)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 1.43 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.45 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.62-1.91 (m, 4 H, β , γ -CH₂), 3.71 (t, ³*J* = 6.9 Hz, 2 H, δ -CH₂), 4.14-4.27 (m, 1 H, α -CH), 5.06 (d, ³*J* = 8.3 Hz, 1 H, NH), 7.68-7.75 (m, 2 H, ArH), 7.81-7.88 (m, 2 H, ArH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 24.5 (γ -CH₂), 28.0 (C(CH₃)₃), 28.3 (C(CH₃)₃), 30.3 (β -CH₂), 37.6 (δ -CH₂), 53.6 (α -CH), 79.7, 80.3 (2 × C(CH₃)₃), 123.3 (2 × ArCH), 132.1 (2 × ArC), 133.9 (2 × ArCH), 155.3 (CO-Boc), 168.3 (2 × CO-Pht), 171.6 (COO^tBu).

IR (ATR):

cm⁻¹ = 3399, 2978, 1771, 1740, 1694, 1508, 1393, 1150, 718.

MS (ESI):

$m/z = 419 [M + H]^+$, 319 [$M - C_4H_8 - CO_2 + H]^+$, 263 [$M - 2 \times C_4H_8 - CO_2 + H]^+$.

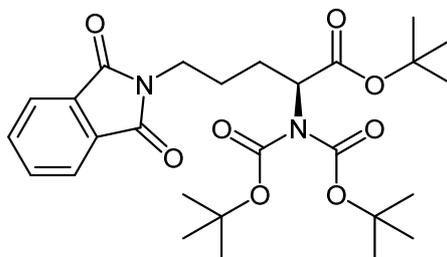
Elementaranalyse C₂₂H₃₀N₂O₆ (418.49):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 63.14 | H 7.23 | N 6.69, |
| gefunden: | C 62.70 | H 7.56 | N 7.12. |

Die analytischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur überein [MOALI *et al.*].¹⁶⁹

***N*^α,*N*^α-Bis-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*^δ-phthalimido-L-ornithin-*tert*-butylester (27)**

Synthesevorschrift in Anlehnung an LUNK:¹³⁶



2,0 g (4,8 mmol) der Verbindung **26** werden in 25 mL trockenem Acetonitril gelöst. Zu dieser Lösung werden 61 mg (0,5 mmol) DMAP und 10,9 g (48 mmol, 10 eq.) Di-*tert*-Butyldicarbonat gegeben. Der Ansatz wird 24–48 Stunden unter Argon-Atmosphäre gerührt, bis die DC eine vollständige Umsetzung anzeigt. Anschließend wird die Lösung mit 25 mL Dichlormethan verdünnt, mit jeweils 25 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird das ölige Rohprodukt mittels Flashchromatografie weiter aufgereinigt (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0–20 %).

Ausbeute: 1,9 g (77 %) eines klaren, farblosen Öls

DC: $R_f = 0,56$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 2:1; Reagenz A, UV)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 1.43 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.49 (2 × s, 18 H, C(CH₃)₃), 1.68–1.79 (m, 2 H, γ -CH₂), 1.83–1.97 (m, 1 H, β -CH₂), 2.04–2.16 (m, 1 H, β -CH₂), 3.72 (m, 2 H, δ -CH₂), 4.78 (dd, ³*J* = 9.3, 5.1 Hz, 1 H, α -CH), 7.69–7.73 (m, 2 H, ArH), 7.82–7.84 (m, 2 H, ArH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 25.6 (γ -CH₂), 26.5 (β -CH₂), 27.9 (C(CH₃)₃), 28.0 (2 × C(CH₃)₃), 37.5 (δ -CH₂), 58.4 (α -CH), 81.3 (C(CH₃)₃), 82.9 (2 × C(CH₃)₃), 123.2 (2 × ArCH), 132.2 (2 × ArC), 133.8 (2 × ArCH), 152.4 (2 × CO-Boc), 168.3 (2 × CO-Pht), 169.6 (CO^tBu).

IR (ATR):

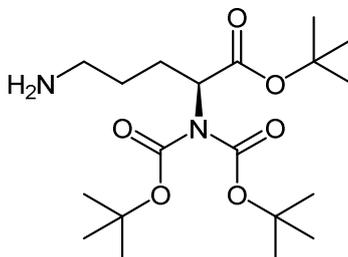
cm⁻¹ = 2978, 1773, 1736, 1711, 1366, 1126, 1026, 719.

MS (ESI):

$m/z = 541 [M + Na]^+$, $419 [M - C_4H_8 - CO_2 + H]^+$, $319 [M - 2 \times C_4H_8 - 2 \times CO_2 + H]^+$, $263 [M - 3 \times C_4H_8 - 2 \times CO_2 + H]^+$.

Elementaranalyse C₂₇H₃₈N₂O₈ (518.61):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 62.53 | H 7.39 | N 5.40, |
| gefunden: | C 62.00 | H 7.34 | N 5.49. |

***N*^α,*N*^α-Bis-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-ornithin-*tert*-butylester (**28**)**

1,88 g (3,6 mmol) des vollgeschützten Ornithins **27** werden in einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol (1:1) gelöst. Zu dieser Lösung werden 2,7 mL (54 mmol, 15 eq.) Hydrazinhydrat (98+ %) gegeben und der Ansatz 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das ausgefallene Phthalhydrazid abfiltriert und die Reaktion durch die Zugabe von 30 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung gequenched. Die organische Phase wird separiert und die wässrige Phase dreimal mit jeweils 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 30 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Verbindung **28** war an dieser Stelle bereits DC-rein und wurde ohne weitere Aufreinigung für weitere Reaktionen eingesetzt.

Ausbeute: 1,27 g (90 %) eines farblosen Öls

DC: $R_f = 0,37$ (Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 25 %ig_(aq), 85:15:5; Reagenz A)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 1.21 (br s, 2 H, NH₂), 1.45 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.51 (2 × s, 18 H, C(CH₃)₃), 1.40-1.56 (m, 2 H, γ -CH₂), 1.80-1.94 (m, 1 H, β -CH₂), 2.03-2.15 (m, 1 H, β -CH₂), 2.64-2.79 (m, 2 H, δ -CH₂), 4.72 (dd, ³J = 9.6, 5.2 Hz, 1 H, α -CH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 26.6 (γ -CH₂), 28.0 (C(CH₃)₃), 28.1 (2 × C(CH₃)₃), 30.7 (β -CH₂), 42.0 (δ -CH₂), 58.8 (α -CH), 81.2 (C(CH₃)₃), 82.7 (2 × C(CH₃)₃), 152.5 (2 × CO-Boc), 169.9 (COO^tBu).

MS (ESI):

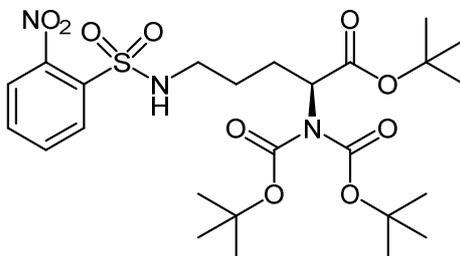
$m/z = 777 [2 \times M + H]^+$, 389 $[M + H]^+$, 289 $[M - C_4H_8 - CO_2 + H]^+$.

Elementaranalyse C₁₉H₃₆N₂O₆ (388.51):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 58.74 | H 9.34 | N 7.21, |
| gefunden: | C 58.49 | H 9.61 | N 6.91. |

***N*^α,*N*^α-Bis-(*tert*-butyloxycarbonyl)-*N*^δ-(2-nitrophenylsulfonyl)-L-ornithin-*tert*-butylester (30)**

Synthesevorschrift in Anlehnung an FUKUYAMA *et al.*:¹⁶⁴



1,27 g (3,3 mmol) des geschützten Ornithins **28** und 0,95 g (4,3 mmol, 1,3 eq.) 2-Nitrophenylsulfonylchlorid **29** werden in 60 mL trockenem Dichlormethan gelöst und der Ansatz auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von 589 µL (4,3 mmol, 1,3 eq.) Triethylamin wird der Reaktionsansatz zunächst 30 Minuten bei 0 °C und anschließend weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das gelblich-ölige Rohprodukt mittels Flashchromatografie aufgereinigt (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-25 %).

Ausbeute: 1,46 g (78 %) eines klaren farblosen Öls

DC: $R_f = 0,69$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; Reagenz A, UV)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /(ppm) = 1.43 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.49 (2 × s, 18 H, C(CH₃)₃), 1.54-1.67 (m, 2 H, γ -CH₂), 1.78-1.91 (m, 1 H, β -CH₂), 2.02-2.14 (m, 1 H, β -CH₂), 3.12 (q, ³J = 6.7 Hz, 2 H, δ -CH₂), 4.63 (dd, ³J = 9.0, 5.5 Hz, 1 H, α -CH), 5.35 (t, ³J = 6.2 Hz, 1 H, NH) 7.69-7.77 (m, 2 H, ArH), 7.82-7.89 (m, 1 H, ArH), 8.10-8.16 (m, 1 H, ArH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ /(ppm) = 26.5 (γ -CH₂), 26.8 (β -CH₂), 27.9 (C(CH₃)₃), 28.0 (2 × C(CH₃)₃), 43.5 (δ -CH₂), 58.2 (α -CH), 81.5 (C(CH₃)₃), 83.0 (2 × C(CH₃)₃), 125.4, 131.1, 132.8, 133.5 (ArCH), 133.8 (ArC-S), 148.1 (ArC-N), 152.5 (2 × CO-Boc), 169.4 (COO^tBu).

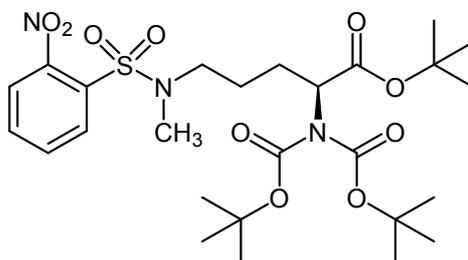
IR (ATR):

cm⁻¹ = 2978, 1734, 1697, 1554, 1366, 1155, 1130, 851.

MS (ESI):

$m/z = 596 [M + Na]^+$, $362 [M - 3 \times C_4H_8 - CO_2 + H]^+$, $318 [M - 3 \times C_4H_8 - 2 \times CO_2 + H]^+$.

Die Bestimmung der Reinheit mittels Elementaranalyse wurde an der monomethylierten Verbindung **31** durchgeführt.

***N*^α,*N*^α-Bis-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*^δ-methyl-*N*^δ-(2-nitrophenylsulfonyl)-L-ornithin-*tert*-butylester (31)**

Zu einer Lösung aus 1,45 g (2,5 mmol) der Verbindung **30** in 15 mL DMF werden 1,05 g (7,6 mmol, 3 eq.) K_2CO_3 und 475 μ L (7,6 mmol, 3 eq.) Methyljodid gegeben und der Ansatz sechs Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 10 mL 10%iger_(aq) Ammoniaklösung gequenched. Die wässrige, ammoniakalkalische Phase wird dreimal mit jeweils 10 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 20 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und schließlich über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird entfernt und das ölige Rohprodukt mittels Flashchromatografie weiter aufgearbeitet (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-30 %).

Ausbeute: 1,22 g (82 %) eines klaren farblosen Öls

DC: $R_f = 0,67$ (Toluol/Ethylacetat, 7:3; Reagenz A, UV)

 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$):

δ /ppm = 1.44 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$), 1.50 (2 \times s, 18 H, $C(CH_3)_3$), 1.58-1.74 (m, 2 H, γ - CH_2), 1.79-1.92 (m, 1 H, β - CH_2), 2.02-2.14 (m, 1 H, β - CH_2), 2.89 (s, 3 H, N- CH_3), 3.11-3.34 (m, 2 H, δ - CH_2), 4.70 (dd, $^3J = 9.1, 5.5$ Hz, 1 H, α -CH), 7.57-7.63 (m, 1 H, ArH), 7.63-7.71 (m, 2 H, ArH), 7.95-8.01 (m, 1 H, ArH).

 ^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$):

δ /ppm = 24.8 (γ - CH_2), 26.4 (β - CH_2), 27.9 ($C(CH_3)_3$), 28.0 (2 \times $C(CH_3)_3$), 34.4 (N- CH_3), 49.7 (δ - CH_2), 58.3 (α -CH), 81.4 ($C(CH_3)_3$), 83.0 (2 \times $C(CH_3)_3$), 124.0, 130.9, 131.5, 133.4 (ArCH), 132.5 (ArC-S), 148.0 (ArC-N), 152.5 (2 \times CO-Boc), 169.5 (COO^tBu).

MS (ESI):

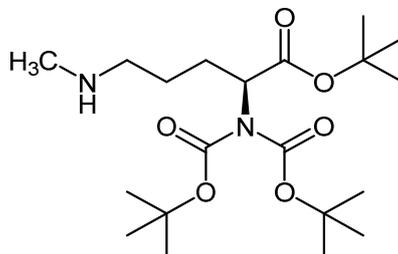
$m/z = 610 [M + Na]^+$, $388 [M - 2 \times C_4H_8 - 2 \times CO_2 + H]^+$, $376 [M - 3 \times C_4H_8 - CO_2 + H]^+$, $332 [M - 3 \times C_4H_8 - 2 \times CO_2 + H]^+$.

Elementaranalyse $C_{26}H_{41}N_3O_{10}S \cdot 0.4 H_2O$ (594.90):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 52.49 | H 7.08 | N 7.06, |
| gefunden: | C 52.74 | H 7.67 | N 6.85. |

***N*^α,*N*^α-Bis-(*tert*-butyloxycarbonyl)-*N*^δ-methyl-L-ornithin-*tert*-butylester (33)**

Synthesevorschrift in Anlehnung an BOWMAN und COGHLAN:¹⁶⁵



Zur Entschützung der 2-NBS-Schutzgruppe werden 1,21 g (2,1 mmol) Verbindung **31**, 0,85 g (6,2 mmol, 3 eq.) K₂CO₃ und 509 µL (4,1 mmol, 2 eq.) Thiophenol **32** in 15 mL DMF gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der orange-braune Ansatz mit 10 mL 10 %iger_(aq) Ammoniaklösung versetzt und dreimal mit jeweils 10 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden nochmal mit jeweils 10 mL Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und schließlich über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird zunächst eingeeengt und im Ölpumpenvakuum restlos entfernt. Die weitere Aufreinigung erfolgt flashchromatografisch (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol, 0-30 %).

Ausbeute: 737 mg (89 %) eines klaren farblosen Öls

DC: $R_f = 0,52$ (Dichlormethan/Methanol/Ammoniak 25 %ig_(aq), 85:15:5; Reagenz A)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 1.44 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.50 (2 × s, 18 H, C(CH₃)₃), 1.53-1.66 (m, 2 H, γ -CH₂), 1.82-1.94 (m, 1 H, β -CH₂), 2.04-2.16 (m, 1 H, β -CH₂), 2.46 (s, 3 H, N-CH₃), 2.61-2.70 (m, 2 H, δ -CH₂), 2.97 (br s, 1 H, NH), 4.72 (dd, ³J = 9.5, 5.3 Hz, 1 H, α -CH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 26.0 (γ -CH₂), 26.9 (β -CH₂), 27.9 (C(CH₃)₃), 28.0 (2 × C(CH₃)₃), 35.8 (N-CH₃), 51.1 (δ -CH₂), 58.7 (α -CH), 81.2 (C(CH₃)₃), 82.8 (2 × C(CH₃)₃), 152.5 (2 × CO-Boc), 169.8 (COO^tBu).

IR (ATR):

cm⁻¹ = 2978, 1734, 1697, 1366, 1130, 849.

MS (ESI):

$m/z = 425 [M + Na]^+$, $303 [M - C_4H_8 - CO_2 + H]^+$.

Elementaranalyse C₂₀H₃₈N₂O₆ (402.53):

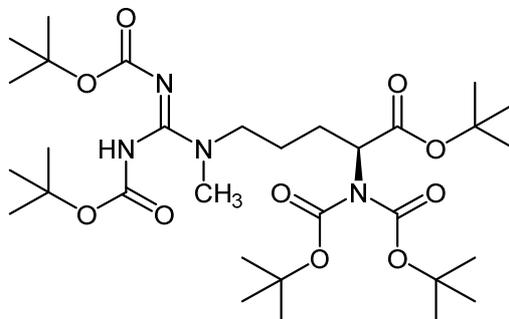
| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 59.68 | H 9.52 | N 6.96, |
| gefunden: | C 59.31 | H 9.89 | N 6.63. |

HRMS (ESI) für C₂₀H₃₈N₂O₆:

m/z berechnet für $[M + H]^+ = 403.2803$,

m/z gefunden für $[M + H]^+ = 403.2798$.

***N*^ω,*N*^{ω'}-Bis-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*^α,*N*^α-bis-(*tert*-butyloxycarbonyl)-*N*^δ-methyl-L-arginin-*tert*-butylester (34)**



Zu einer Lösung von 712 mg (1,8 mmol) des geschützten *N*^δ-Methyl-L-ornithins **33** in 20 mL trockenem Dichlormethan werden 588 mg (2,13 mmol, 1,2 eq.) *N,N*-Bis(*tert*-Butyloxycarbonyl)thioharnstoff **16** und 611 μL (3,6 mmol, 2 eq.) DIPEA gegeben. Nachdem der Ansatz 30 Minuten bei 0 °C gerührt wurde, werden 691 mg (3,6 mmol, 2 eq.) EDCI hinzugefügt und weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird im Vakuum eingeeengt und flashchromatografisch aufgereinigt (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-30 %).

Ausbeute: 1,1 g (98 %) eines klaren farblosen Öls

DC: $R_f = 0,51$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 2:1; Reagenz A, UV)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 1.45 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.48 (2 × s, 18 H, C(CH₃)₃), 1.51 (2 × s, 18 H, C(CH₃)₃), 1.60-1.74 (m, 2 H, γ-CH₂), 1.77-1.92 (m, 1 H, β-CH₂), 1.99-2.12 (m, 1 H, β-CH₂), 3.00 (s, 3 H, N-CH₃), 3.35-3.63 (m, 2 H, δ-CH₂), 4.72 (dd, ³J = 9.0, 5.4 Hz, 1 H, α-CH), 10.6 (br s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 24.3 (γ-CH₂), 26.6 (β-CH₂), 28.0 (C(CH₃)₃), 28.1 (2 × C(CH₃)₃), 28.2 (2 × C(CH₃)₃), 36.8 (N-CH₃), 50.6 (δ-CH₂), 58.5 (α-CH), 81.3 (C(CH₃)₃), 82.9 (4 × C(CH₃)₃), 152.5 (4 × CO-Boc), 155.8 (C=N), 169.6 (COO^tBu).

IR (ATR):

cm⁻¹ = 2978, 1740, 1699, 1608, 1366, 1231, 1047, 847.

MS (ESI):

$m/z = 645 [M + H]^+$.

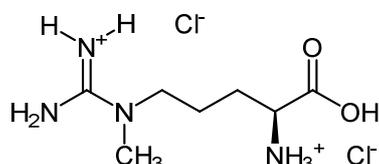
Elementaranalyse C₃₁H₅₆N₄O₁₀ (644.81):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 57.74 | H 8.75 | N 8.69, |
| gefunden: | C 57.72 | H 9.01 | N 8.60. |

HRMS (ESI) für C₃₁H₅₆N₄O₁₀:

m/z berechnet für $[M + H]^+ = 645.4069$,

m/z gefunden für $[M + H]^+ = 645.4072$.

***N*^δ-Methyl-L-arginin Dihydrochlorid (1)**

Das vollständig geschützte und gut getrocknete *N*^δ-Methyl-L-arginin **34** wird in 80 mL absolutem Diethylether unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst und 30 Minuten bei 0 °C gerührt. Anschließend wird für 45 Minuten vorsichtig trockener Chlorwasserstoff in die Lösung eingeleitet und weitere sechs Stunden bei 0 °C gerührt. Der Ansatz wird für 24 Stunden bei 4-6 °C gelagert, wobei das Produkt **1** präzipitiert. Der mit Chlorwasserstoff gesättigte Diethylether wird vorsichtig im Vakuum abgezogen und der resultierende weiße Feststoff weitere drei Stunden im Ölpumpenvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in 1-2 mL 2-fach destilliertem Wasser (*Aqua bidest.*) aufgenommen und über RP-18-Säulenchromatografie aufgereinigt (Eluent: *Aqua bidest.*, isokratisch). Ninhydrin-positive Fraktionen werden vereinigt und im Vakuum bei 30 °C auf ein Restvolumen von ca. 1 mL eingengt. Das restliche Wasser wird im Ölpumpenvakuum entfernt.

Ausbeute: 369 mg (84 %) eines feinen weißen Pulvers

Schmelzpunkt: 210 °C (Lit.: 210-212 °C DL-Verbindung)¹⁵⁶

DC: $R_f = 0,51$ (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig, 6:3:1; Reagenz A)

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = 11,0$ (c 2,00; Wasser)

¹H-NMR (300 MHz, D₂O, TPS):

δ /(ppm) = 1.62-2.02 (m, 4 H, β , γ -CH₂), 2.99 (s, 3 H, N-CH₃), 3.37 (t, ³J = 7.3 Hz, 2 H, δ -CH₂), 4.04 (t, ³J = 6.1 Hz, 1 H, α -CH).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O, TPS):

δ /ppm = 24.0 (γ -CH₂), 28.5 (β -CH₂), 37.7 (N-CH₃), 51.3 (δ -CH₂), 54.6 (α -CH), 158.3 (C=N), 173.8 (COOH).

³⁵Cl-NMR für C₇H₁₈Cl₂N₄O₂ (29 MHz, D₂O, NaCl):

Berechnet: Cl 27.15,

gefunden: Cl 24.66 (91 %).

IR (ATR):

cm⁻¹ = 3361, 3167, 2947, 1720, 1622, 1504, 1427, 1231, 752.

MS (ESI):

$m/z = 753 [4 \times M + H]^+$, $565 [3 \times M + H]^+$, $377 [2 \times M + H]^+$, $189 [M + H]^+$.

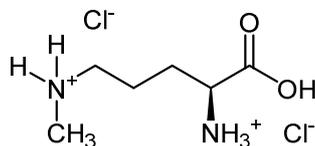
HRMS (ESI) für C₇H₁₆N₄O₂:

m/z berechnet für $[M + H]^+ = 189.1346$,

m/z gefunden für $[M + H]^+ = 189.1348$.

8.1.2.1.2 *N*^δ-Methyl-L-ornithin

N^δ-Methyl-L-ornithin (**2**)



Eine Lösung aus **33** in 80 mL absolutem Diethylether wird unter Stickstoff-Atmosphäre 30 Minuten bei 0 °C gerührt. Anschließend wird für 20 Minuten vorsichtig trockener Chlorwasserstoff in den Reaktionsansatz eingeleitet und weitere zwei Stunden bei 0 °C gerührt, wobei das Produkt **2** als feiner weißer Niederschlag präzipitiert. Der Ansatz wird für 24 Stunden bei 4-6 °C gelagert und anschließend der mit Chlorwasserstoff gesättigte Diethylether vorsichtig in Vakuum abgezogen. Der resultierende weiße Feststoff wird für weitere drei Stunden im Ölpumpenvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in 1-2 mL *Aqua bidest.* aufgenommen und über RP-18-Säulenchromatografie aufgereinigt (Eluent: *Aqua bidest.*, isokratisch). Ninhydrin-positive Fraktionen werden vereinigt und im Vakuum bei 30 °C auf ein Restvolumen von ca. 1 mL eingengt. Das restliche Wasser wird im Ölpumpenvakuum entfernt.

Ausbeute: 105 mg (89 %) eines weißen, stark hygroskopischen Feststoffes

Schmelzpunkt: Aufgrund der stark hygroskopischen Eigenschaften ist der Schmelzpunkt unter Normalbedingungen nicht bestimmbar

DC: $R_f = 0,37$ (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig, 6:3:1, Reagenz A)

Spezifische Drehung: $[\alpha]_D^{20} = 11,5$ (c 2,00; Wasser)

¹H-NMR (300 MHz, D₂O, TPS):

δ /ppm = 1.70-2.08 (m, 4 H, β , γ -CH₂), 2.69 (s, 3 H, N-CH₃), 3.06 (t, ³J = 7.5 Hz, 2 H, δ -CH₂), 4.02 (t, ³J = 6.1 Hz, 1 H, α -CH).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O, TPS):

δ /ppm = 23.3 (γ -CH₂), 28.7 (β -CH₂), 34.6 (N-CH₃), 49.7 (δ -CH₂), 54.4 (α -CH), 173.8 (COOH).

MS (ESI):

$m/z = 461 [3 \times M + Na]^+$, $293 [2 \times M + H]^+$, $147 [M + H]^+$.

HRMS (ESI) für C₆H₁₄N₂O₂:

m/z berechnet für $[M + H]^+ = 147.1128$,

m/z gefunden für $[M + H]^+ = 147.1127$.

N^δ-Methyl-L-ornithin (**2**) wurde in der Literatur bisher nur als Monohydrochlorid beschrieben.^{133,157} Daher handelt es sich beim Dihydrochlorid formal um eine neue Verbindung.

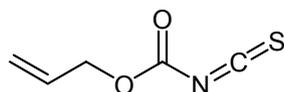
8.1.2.2 Synthese von *N*^ω-Hydroxy-L-arginin Prodrugs und analogen Modellverbindungen

8.1.2.2.1 Isothiocyanate

Allgemeine Synthesevorschrift in Anlehnung an MARTIN *et al.*¹⁸⁰

7,3 g (75 mmol) ofengetrocknetes und frisch gepulvertes Kaliumthiocyanat und 500 mg (5 Mol-%) 18-Krone-6 werden in 100 mL Tetrachlorethylen suspendiert. Zu dieser Lösung werden über eine Spritze 50 mmol des entsprechenden Säurechlorids gegeben und fünf Stunden bei 85-90 °C gerührt. Anschließend wird der Reaktionsansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und unter Eiskühlung werden 50 mL *n*-Hexan zugegeben. Der Ansatz wird über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die so gewonnenen gelben, öligen Isothiocyanate sind an dieser Stelle bereits zu ca. 90 % rein (¹H-NMR und DC) und werden aus Stabilitätsgründen ohne weitere Aufreinigung als 0,5 M Stammlösung in trockenem Dichlormethan für weitere Synthesen eingesetzt.

N-Allyloxycarbonylisothiocyanat (65)²⁰⁰



Nach 8.1.2.2.1 durch Einsatz von 5,3 mL (50 mmol) Chlorameisensäureallylester **64**

Ausbeute: 5,9 g (83 %) eines klaren, gelben Öls

DC: $R_f = 0,83$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1; Reagenz B, UV)

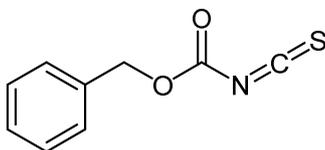
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 4.67 (ddd, ³*J* = 5.9, ⁴*J* = 1.5, 1.1 Hz, 2 H, CH₂=CH-CH₂), 5.34 (ddd, ²*J* = 2.5 Hz, ³*J*_{cis} = 10.4 Hz, ⁴*J* = 1.1 Hz, 1 H, CH₂=CH-CH₂), 5.40 (ddd, ²*J* = 3.0 Hz, ³*J*_{trans} = 17.1 Hz, ⁴*J* = 1.4 Hz, 1 H, CH₂=CH-CH₂), 5.93 (ddt, ³*J* = 17.2, 10.4, 5.7 Hz, 1 H, CH=CH₂).

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ /ppm = 69.4 (O-CH₂), 120.2 (CH=CH₂), 130.3 (CH=CH₂), 147.1 (N=C=S), 149.9 (C=O).

N-Benzylloxycarbonylisothiocyanat (56)



Nach 8.1.2.2.1 durch Einsatz von 2,5 mL (18 mmol) Chlorameisensäurebenzylester

Ausbeute: 3,0 g (86 %) eines klaren gelben Öls

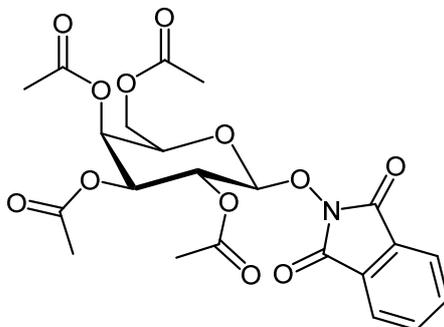
DC: $R_f = 0,30$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1; Reagenz B, UV)

Die analytischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur überein [MARTIN *et al.*]¹⁸⁰.

8.1.2.2.2 Hydroxylamine

N-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranos-1-yloxy)phthalimid (**70**)^{146,277,278}

Synthesevorschrift in Anlehnung an die Literatur:^{146,277,278}



3,7 g (9 mmol) 1-Brom-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranose **68**, 7,3 g (45 mmol) *N*-Hydroxyphthalimid **69** und 3,0 g (9 mmol) Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAHS) werden in 72 mL Dichlormethan gelöst und mit 72 mL 1 M NaOH-Lösung versetzt. Der Reaktionsansatz wird vier Stunden bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Anschließend wird die wässrige Phase abgetrennt und die organische Phase sechsmal mit 40 mL Wasser und dreimal mit 40 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die weitere Aufreinigung des orange-roten Rohproduktes erfolgt über Flashchromatografie (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-50 %;).

Ausbeute: 3,1 g (71 %) eines weißen, kristallinen Schaums (Lit.: 55 %²⁷⁸, 70 %¹⁴⁶, 80 %²⁷⁷)

Schmelzpunkt: 81 °C (in der Literatur werden keine Angaben über den Schmelzpunkt gemacht)

DC: $R_f = 0,54$ (Toluol/Ethylacetat, 1:1; Reagenz B, UV)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 2.00, 2.02, 2.20, 2.23 (4 \times s, 3 H, 4 \times COCH₃), 3.94 (ddd, ³*J* = 7.3, 6.9, 1.2 Hz, 1 H, 5'-CH), 4.18 (dd, ²*J* = 11.2, ³*J* = 6.5 Hz, 1 H, 6'a-CH₂), 4.24 (dd, ²*J* = 11.2, ³*J* = 7.3 Hz, 1 H, 6'b-CH₂), 5.01 (d, ³*J* = 8.3 Hz, 1 H, 1'-CH), 5.12 (dd, ³*J* = 10.4, 3.4 Hz, 1 H, 3'-CH₂), 5.43 (dd, ³*J* = 3.5, 1.2 Hz, 1 H, 4'-CH), 5.48 (dd, ³*J* = 10.4, 8.3 Hz, 1 H, 2'-CH), 7.78-7.82 (m, 2 H, ArH), 7.84-7.90 (m, 2 H, ArH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 20.6, 20.8, 20.9, (4 \times COCH₃), 60.8 (6'-CH₂), 66.4, 67.0, 70.7, 71.4 (4', 2', 5', 3'-CH), 106.4 (1'-CH), 123.9 (2 \times ArCH), 128.7 (2 \times ArC), 134.9 (2 \times ArCH), 162.7 (CO-Pht), 169.9, 170.1, 170.4 (4 \times COCH₃).

IR (ATR):

cm⁻¹ = 1740, 1217, 1188, 1082, 1031, 875, 700.

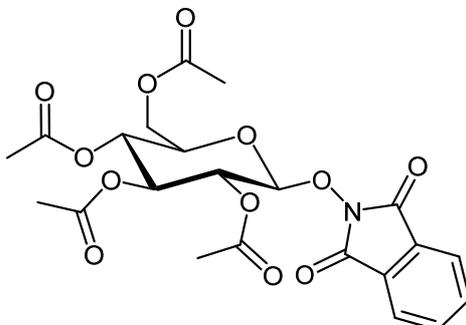
MS (ESI):

m/z = 516 [*M* + Na]⁺, 511 [*M* + NH₄]⁺, 331 [C₁₄H₁₉O₉]⁺.

Die analytischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur überein.^{146,277,278}

***N*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranos-1-yloxy)phthalimid (85)^{277,278}**

Synthesevorschrift in Anlehnung an die Literatur:^{277,278}



Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die analoge Verbindung **70** bereits beschrieben sind, mit 1-Brom-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranose **84** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 3,7 g, 9 mmol).

Ausbeute: 2,8 g (64 %) eines weißen kristallinen Feststoffs (Lit.: 71 %²⁷⁷, 55-60 %²⁷⁸)

Schmelzpunkt: 172 °C

DC: $R_f = 0,50$ (Toluol/Ethylacetat, 1:1; Reagenz B, UV)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆):

δ /ppm = 1.96, 1.98, 1.99, 2.11 (4 \times s, 3 H, 4 \times COCH₃), 3.95 (dd, ³*J* = 12.2, 2.7 Hz, 1 H, 6'a-CH₂), 4.05 (ddd, ²*J* = 12.2, ³*J* = 5.0, 2.7 Hz, 1 H, 5'-CH), 4.25 (dd, ²*J* = 12.2, ³*J* = 5.0 Hz, 1 H, 6'b-CH₂), 5.02 (pseudo t, ³*J* = 9.6 Hz, 1 H, 4'-CH), 5.06 (pseudo t, ³*J* = 9.6 Hz, 1 H, 2'-CH), 5.39 (pseudo t, ³*J* = 6.9 Hz, 1 H, 3'-CH), 5.42 (d, ³*J* = 8.3 Hz, 1 H, 1'-CH), 7.87-7.90 (m, 4 H, ArH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆):

δ /ppm = 20.3, 20.4, 20.5 (4 \times COCH₃), 61.5 (6'-CH₂), 67.8 (4'-CH), 69.3 (2'-CH), 71.0 (5'-CH), 71.6 (3'-CH), 104.3 (1'-CH), 123.5 (2 \times ArCH), 128.3 (2 \times ArC), 135.0 (2 \times ArCH), 169.2, 169.5, 169.9 (4 \times COCH₃).

IR (ATR):

cm⁻¹ = 1738, 1370, 1205, 1126, 1078, 1026, 876, 797.

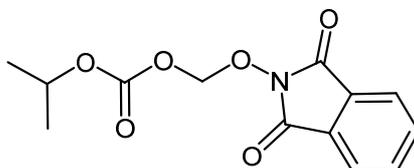
MS (ESI):

m/z = 516 [*M* + Na]⁺, 511 [*M* + NH₄]⁺, 331 [C₁₄H₁₉O₉]⁺.

Elementaranalyse C₂₂H₂₃NO₁₂ (493.42):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 53.55 | H 4.70 | N 2.84, |
| gefunden: | C 53.76 | H 5.29 | N 2.89. |

Die analytischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur überein.^{277,278}

***N*-(Isopropoxycarbonyloxymethoxy)phthalimid (97)**

1,63 g (10 mmol) *N*-Hydroxyphthalimid **69**, 2,68 mL (20 mmol) Chlormethylisopropylcarbonat **96**, 2,73 g (12 mmol) BTEAC und 2,1 mL (12 mmol) DIPEA werden in 50 mL DMF gelöst. Der Ansatz wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 40 mL Dichlormethan verdünnt und mit jeweils 40 mL Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum einkonzentriert. Reste an DMF werden im Ölpumpenvakuum entfernt. Das Rohprodukt wird flashchromatografisch aufgereinigt (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-30 %).

Ausbeute: 1,1 g (40 %) eines weißen, kristallinen Pulvers

Schmelzpunkt: 110 °C

DC: $R_f = 0,44$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 2:1; UV)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 1.37 (d, ³*J* = 6.2 Hz, 6 H, CH(CH₃)₂), 4.99 (sep, ³*J* = 6.2 Hz, 1 H, CH(CH₃)₂), 5.66 (s, 2 H, CH₂), 7.74-7.80 (m, 2 H, ArH), 7.83-7.89 (m, 2 H, ArH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 27.7 (CH(CH₃)₂), 73.6 (CH(CH₃)₂), 93.3 (CH₂), 123.9 (2 × ArCH), 129.0 (2 × ArC), 134.8 (2 × ArCH), 153.5 (OCOO), 163.1 (2 × CO-Pht).

IR (ATR):

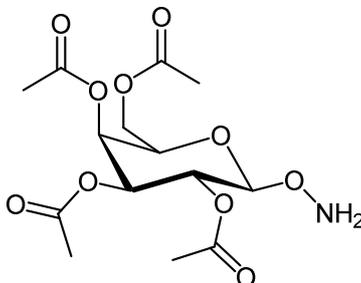
cm⁻¹ = 1749, 1724, 1258, 1184, 1134, 1083, 1010, 876, 793.

MS (ESI):

$m/z = 297 [M + NH_4]^+$, $280 [M + H]^+$, $176 [M - C_4H_7O_3]^+$, $146 [M - C_5H_9O_4]^+$.

Elementaranalyse C₁₃H₁₃NO₆ (297.25):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 55.92 | H 4.69 | N 5.02, |
| gefunden: | C 56.11 | H 5.21 | N 5.00. |

1-Aminooxy-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranose (45)Synthesevorschrift nach SCHADE:¹⁴⁶

2,97 g (6 mmol) des Phthalimid-geschützten Aminooxyzuckers **70** werden in 60 mL einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol im Verhältnis 1:1 gelöst. Anschließend werden zügig 945 μ L (18 mmol) Methylhydrazin zugegeben und 25 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird mit 40 mL gesättigter NaHCO_3 -Lösung abgebrochen und die wässrige Phase dreimal mit jeweils 60 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 60 mL gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach der Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum resultiert ein weißer kristalliner Schaum, der an dieser Stelle bereits DC-rein ist und ohne weitere Aufreinigung für weitere Synthesen eingesetzt wird.

Ausbeute: 2,1 g (96 %) eines weißen, kristallinen Schaums (Lit.: 67 %)¹⁴⁶

Schmelzpunkt: 50 °C (in der Literatur wurde die Verbindung als ölige Substanz beschrieben)¹⁴⁶

DC: $R_f = 0,39$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 3:1; Reagenz B)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 1.99, 2.06, 2.08, 2.16$ ($4 \times s, 3 \text{ H}, 4 \times \text{COCH}_3$), 3.98 (td, $^3J = 6.7, 1.2 \text{ Hz}, 1 \text{ H}, 5'\text{-CH}$), $4.12\text{-}4.23$ (m, 2 H, $6'\text{-CH}_2$), 4.69 (d, $^3J = 8.3 \text{ Hz}, 1 \text{ H}, 1'\text{-CH}$), 5.05 (dd, $^3J = 10.4, 3.5 \text{ Hz}, 1 \text{ H}, 3'\text{-CH}_2$), 5.26 (dd, $^3J = 10.4, 8.3 \text{ Hz}, 1 \text{ H}, 2'\text{-CH}$), 5.40 (dd, $^3J = 3.5, 1.1 \text{ Hz}, 1 \text{ H}, 4'\text{-CH}$), 5.83 (br s, 2 H, NH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

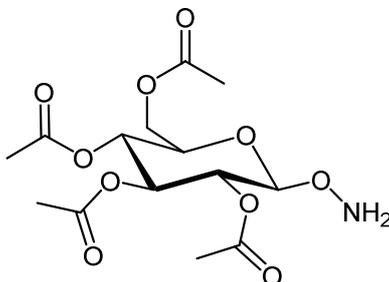
$\delta/\text{ppm} = 20.5, 20.6, 20.7, 20.8$, ($4 \times \text{COCH}_3$), 61.0 ($6'\text{-CH}_2$), 67.0 ($4'\text{-CH}$), 67.3 ($2'\text{-CH}$), 70.7 ($5'\text{-CH}$), 71.0 ($3'\text{-CH}$), 103.9 ($1'\text{-CH}$), $169.7, 170.1, 170.2, 170.4$ ($4 \times \text{COCH}_3$).

MS (ESI):

$m/z = 364 [M + H]^+, 331 [C_{14}H_{19}O_9]^+$.

Die analytischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur überein.¹⁴⁶

Bei **45** handelt es sich um eine literaturbekannte Vorstufe, die direkt für weitere Synthesen eingesetzt wurde. Daher wurde auf die Durchführung einer Elementaranalyse und/oder HRMS verzichtet.

1-Aminoxy-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranose (86)²⁷⁸

Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die analoge Verbindung **45** bereits beschrieben sind, mit **85** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 1,85 g, 3,8 mmol).

Ausbeute: 1,2 g (88 %) eines weißen kristallinen Feststoffs

Schmelzkunkt: 123 °C

DC: $R_f = 0,57$ (Toluol/Ethylacetat, 1:1; Reagenz B)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 2.01, 2.03, 2.07, 2.10 (4 × s, 3 H, 4 × COCH₃), 3.75 (ddd, ³J = 10.0, 4.5, 2.3 Hz, 1 H, 5'-CH), 4.17 (dd, ²J = 12.2, ³J = 2.4 Hz, 1 H, 6'a-CH₂), 4.30 (dd, ²J = 12.2, ³J = 4.5 Hz, 1 H, 6'b-CH₂), 4.72 (d, ³J = 8.3 Hz, 1 H, 1'-CH), 5.07 (dd, ³J = 9.5, 2.1 Hz, 1 H, 4'-CH), 5.10 (dd, ³J = 9.5, 3.4 Hz, 1 H, 2'-CH), 5.23 (pseudo t, ³J = 9.4 Hz, 1 H, 3'-CH), 5.84 (br s, 2 H, NH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 20.6, 20.7, 20.8 (4 × COCH₃), 61.8 (6'-CH₂), 68.2 (4'-CH), 69.6 (2'-CH), 71.8 (5'-CH), 72.9 (3'-CH), 103.4 (1'-CH), 169.4, 169.5, 170.2, 170.7 (4 × COCH₃).

IR (ATR):

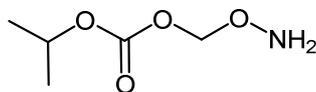
cm⁻¹ = 3310, 2968, 1739, 1600, 1367, 1217, 1032.

MS (ESI):

$m/z = 386 [M + Na]^+$, $364 [M + H]^+$, $331 [C_{14}H_{19}O_9]^+$.

Elementaranalyse C₁₄H₂₁NO₁₀(363.32):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 46.28 | H 5.83 | N 3.86, |
| gefunden: | C 46.85 | H 6.52 | N 4.13. |

Aminooxymethylisopropylcarbonat (98)

Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **45** bereits beschrieben sind, mit **97** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 837 mg, 3,0 mmol).

Ausbeute: 630 mg (70 %) eines klaren farblosen Öls

DC: $R_f = 0,49$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; Reagenz C)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 1.31$ (d, $^3J = 6.3$ Hz, 6 H, $\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 4.92 (sep, $^3J = 6.3$ Hz, 1 H, $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{C}\text{H}_3)_2$), 5.34 (s, 2 H, CH_2), 5.84 (br s, 2 H, NH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 21.7$ ($\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 72.6 ($\underline{\text{C}}\text{H}(\text{C}\text{H}_3)_2$), 95.2 (CH_2), 154.0 (OCOO).

MS (ESI):

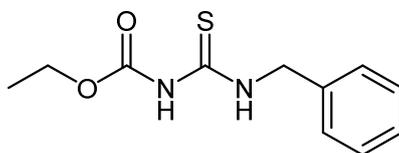
$m/z = 150$ [$M + \text{H}$] $^+$.

Bei **98** handelt es sich um eine nicht lagerstabile Vorstufe, die direkt für weitere Synthesen eingesetzt werden musste. Daher wurde auf die Durchführung einer Elementaranalyse und/oder HRMS verzichtet.

8.1.2.2.3 Benzylthioharnstoffe

Allgemeine Synthesevorschrift in Anlehnung an LINTON *et al.*:¹⁸³

Eine Lösung aus 871 μL (8 mmol) Benzylamin in 125 mL Dichlormethan wird auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung werden über einen Zeitraum von 30 Minuten 18 mL (9 mmol) des entsprechenden Isothiocyanats **43**, **56** oder **65** als 0,5 M Stammlösung in Dichlormethan tropfenweise zugegeben. Der Ansatz wird für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Vakuum auf ca. ein Drittel seines ursprünglichen Volumens eingengt. Zur Aufarbeitung wird die Lösung mit jeweils 20 ml 1 %iger HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung der Rohprodukte erfolgt über Flashchromatografie (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-20 %).

***N*-Ethylloxycarbonyl-*N'*-benzylthioharnstoff (50)¹⁸³**

Nach 8.1.2.2.3 durch Umsetzung von 424 μL (4 mmol) Benzylamin mit Isothiocyanat **43**

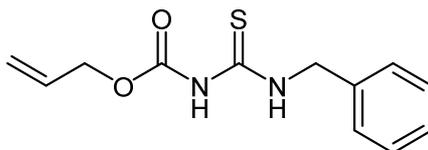
Ausbeute: 850 mg (89 %) eines weißen Pulvers

DC: $R_f = 0,41$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1; Reagenz B, UV)

MS (ESI):

$m/z = 239 [M + H]^+$, $91 [C_7H_7]^+$.

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur.^{105,146}

***N*-Allyloxycarbonyl-*N'*-benzylthioharnstoff (66)**

Nach 8.1.2.2.3 durch Umsetzung von 871 μL (8 mmol) Benzylamin mit Isothiocyanat **65**

Ausbeute: 1,74 g (86 %) eines weißen Feststoffs

DC: $R_f = 0,46$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1; Reagenz B, UV)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

$\delta/\text{ppm} = 4.63$ (ddd, $^3J = 5.8$, $^4J = 1.6$, 1.3 Hz, 2 H, CH₂=CH-CH₂), 4.86 (d, $^3J = 4.9$ Hz, 2 H, NH-CH₂), 5.29 (ddd, $^2J = 2.3$ Hz, $^3J_{cis} = 10.4$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, 1 H, CH₂=CH-CH₂), 5.35 (ddd, $^2J = 3.2$ Hz, $^3J_{trans} = 17.2$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1 H, CH₂=CH-CH₂), 5.93 (ddt, $^3J = 17.2$, 10.4 , 5.8 Hz, 1 H, CH=CH₂), 7.27 - 7.39 (m, 5 H, ArH), 8.32 (s, 1 H, NH-CH₂), 9.92 (s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

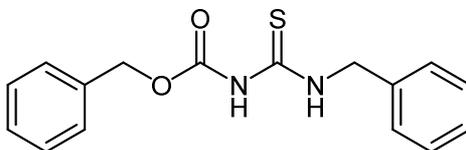
$\delta/\text{ppm} = 49.7$ (NH-CH₂), 67.0 (O-CH₂), 119.5 (CH=CH₂), 127.9 , 128.0 , 128.9 (ArCH), 130.8 (CH=CH₂), 136.2 (ArC), 152.4 (C=S), 179.4 (C=O).

MS (ESI):

$m/z = 273 [M + Na]^+$, $251 [M + H]^+$.

Elementaranalyse C₁₂H₁₄N₂O₂S (250.32):

| | | | | |
|------------|---------|--------|----------|---------|
| Berechnet: | C 57.58 | H 5.64 | N 11.19 | S 12.81 |
| gefunden: | C 57.72 | H 5.78 | N 11.05. | S 12.35 |

***N*-Benzyloxycarbonylcarboxyl-*N*'-benzylthioharnstoff (55)¹⁸⁰**

Nach 8.1.2.2.3 durch Umsetzung von 1,1 mL (10 mmol) Benzylamin mit Isothiocyanat **56**

Ausbeute: 2,91 g (97 %) eines weißen Pulvers

DC: $R_f = 0,57$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1; Reagenz B,UV)

MS (ESI):

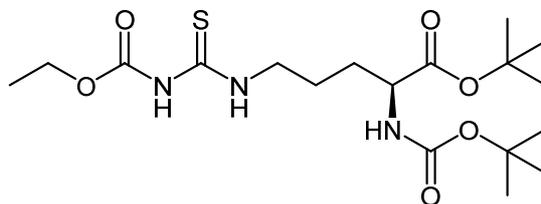
$m/z = 323 [M + Na]^+$, $301 [M + H]^+$, $91 [C_7H_7]^+$.

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen der Literatur [MARTIN *et al.*].¹⁸⁰

8.1.2.2.4 *N*^α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-thiocitrullin-*tert*-butylester

Allgemeine Vorschrift in Anlehnung an SCHADE *et al.*:^{105,159}

Es werden 2,3 g (7 mmol) *N*^α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-ornithin-*tert*-butylester Hydrochlorid **42** in 250 mL trockenem Dichlormethan gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung werden anschließend 20 mL (10 mmol) einer 0,5 M Stammlösung des entsprechenden Isothiocyanats **43**, **56** oder **65** in Dichlormethan tropfenweise über einen Zeitraum von 30 Minuten und 1,1 mL (8 mmol) Triethylamin gegeben. Das Reaktionsgemisch wird zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum auf ca. ein Drittel des ursprünglichen Volumens eingeengt. Diese einkonzentrierte Lösung wird mit jeweils 30 mL 1 %iger HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum werden die öligen Rohprodukte flashchromatografisch gereinigt (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-30 %).

***N*^α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*^ω-ethoxycarbonyl-L-thiocitrullin-*tert*-butylester (**44**)¹⁰⁵**

Nach 8.1.2.2.4 durch Umsetzung von 2,54 g (7,8 mmol) des geschützten Ornithins **42** mit Isothiocyanat **43**

Ausbeute: 2,65 g (81 %) eines farblosen Öls

DC: $R_f = 0,31$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1; Reagenz A)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 1.31 (t, ³J = 7.2 Hz, 3 H, CH₂-CH₃), 1.45, 1.47 (2 × s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.62-1.93 (m, 4 H, β, γ-CH₂), 3.67 (pseudo q, 2 H, δ-CH₂), 3.95-4.32 (m, 1 H, α-CH), 4.22 (q, ³J = 7.2 Hz, 2 H, CH₂-CH₃), 5.11 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, NH-Boc), 8.09 (br s, 1 H, NH), 9.66 (br s, 1H, NH-CH₂).

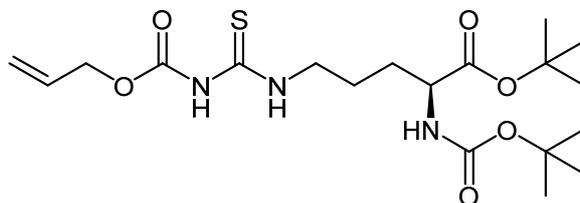
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 14.2 (CH₂-CH₃), 24.2 (γ-CH₂), 28.0, 28.3 (2 × C(CH₃)₃), 30.3 (β-CH₂), 45.1 (δ-CH₂), 53.5 (α-CH), 62.7 (CH₂-CH₃), 79.7, 82.2 (2 × C(CH₃)₃), 152.7 (CO-Eoc), 155.4 (CO-Boc), 171.5 (COO^tBu), 179.3 (C=S).

MS (ESI):

$m/z = 442 [M + Na]^+$, $420 [M + H]^+$, $364 [M - C_4H_8 + H]^+$, $308 [M - 2 \times C_4H_8 + H]^+$, $264 [M - 2 \times C_4H_8 - CO_2 + H]^+$.

Die analytischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur überein [SCHADE]¹⁰⁵.

***N*^α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*^ω-allyloxycarbonyl-L-thiocitrullin-*tert*-butylester (**71**)**

Nach 8.1.2.2.4 durch Umsetzung von 2,3 g (7 mmol) des geschützten Ornithins **42** mit Isothiocyanat **65**

Ausbeute: 2,85 g (94 %) eines klaren, farblosen Öls

DC: $R_f = 0,44$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 3:1; Reagenz A, UV)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

δ/ppm = 1.47, 1.50 (2 \times s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.65-1.76 (m, 4 H, β , γ - CH_2), 3.67 (pseudo q, 2 H, δ - CH_2), 4.14-4.27 (m, 1 H, α -CH), 4.65 (dt, 3J = 5.7, 1.4 Hz, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 5.10 (d, 3J = 7.9 Hz, 1 H, NH-Boc), 5.29-5.40 (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 5.90 (ddt, 3J = 17.2, 10.4, 5.7 Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 8.11 (br s, 1 H, NH), 9.66 (br s, 1 H, $\text{NH}-\text{CH}_2$).

 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

δ/ppm = 24.9 (γ - CH_2), 28.0, 28.3 (2 \times $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.3 (β - CH_2), 45.1 (δ - CH_2), 53.5 (α -CH), 67.0 (O- CH_2), 79.8, 82.2 (2 \times $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 119.5 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 130.9 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 152.4 (CO-Alloc), 155.3 (CO-Boc), 171.5 (CO^tBu), 179.2 (C=S).

IR (ATR):

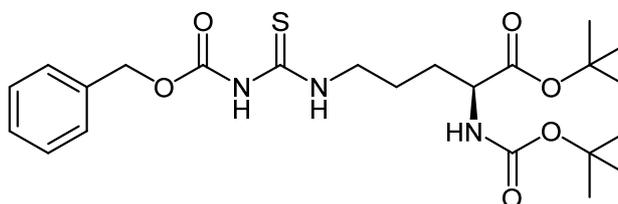
cm^{-1} = 3292, 2976, 1711, 1520, 1366, 1219, 1152, 1028, 773.

MS (ESI):

m/z = 454 [$M + \text{Na}$]⁺, 432 [$M + \text{H}$]⁺, 376 [$M - 2 \times \text{C}_4\text{H}_8 + \text{H}$]⁺, 276 [$M - 2 \times \text{C}_4\text{H}_8 - \text{CO}_2 + \text{H}$]⁺.

Elementaranalyse $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6\text{S} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (467.59):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 48.81 | H 7.98 | N 8.99, |
| gefunden: | C 49.03 | H 7.90 | N 8.59. |

 N^α -(*tert*-Butyloxycarbonyl)- N^ω -benzyloxycarbonyl-L-thiocitrullin-*tert*-butylester (115)^{105,159}

Nach 8.1.2.2.4 durch Umsetzung von 500 mg (1,5 mmol) des geschützten Ornithins **42** mit Isothiocyanat **56**

Ausbeute: 726 (98 %) eines klaren, hellgelben Öls

DC: R_f = 0,30 (Cyclohexan/Ethylacetat, 4:1; Reagenz A, UV)

 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

δ/ppm = 1.45, 1.47 (2 \times s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.63-1.93 (m, 4 H, β , γ - CH_2), 3.67 (pseudo q, 2 H, δ - CH_2), 4.11-4.27 (m, 1 H, α -CH), 5.10 (br d, 3J = 8.1 Hz, 1 H, NH-Boc), 5.17 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 7.30-7.43 (m, 5 H, ArH), 8.04 (br s, 1 H, NH), 9.65 (br s, 1 H, $\text{NH}-\text{CH}_2$).

MS (ESI):

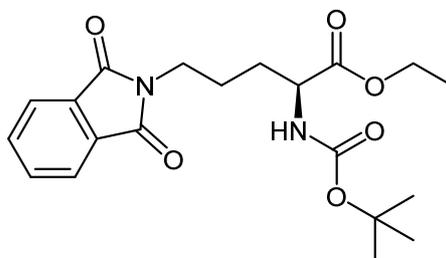
m/z = 482 [$M + \text{H}$]⁺, 370 [$M - 2 \times \text{C}_4\text{H}_8 + \text{H}$]⁺, 326 [$M - 2 \times \text{C}_4\text{H}_8 - \text{CO}_2 + \text{H}$]⁺.

Die analytischen Daten stimmen mit den Angaben in der Literatur überein [SCHADE *et al.*]^{105,159}

8.1.2.2.5 N^α -(*tert*-Butyloxycarbonyl)- N^ω -allyloxycarbonyl-L-thiocitrullin-ethylester

N^α -(*tert*-Butyloxycarbonyl)- N^δ -phthalimido-L-ornithin-ethylester (77)

Synthesevorschrift in Anlehnung an NEISES und STEGLICH:²⁰⁴



2,17 g (6 mmol) des Phthalimid-geschützten Ornithins **24** werden in 30 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Zu dem Reaktionsansatz werden 293 mg DMAP (2,4 mmol, 40 Mol-%), 1,8 mL (30 mmol) trockener Ethanol und 1,2 g (6,3 mmol) EDCI gegeben. Der Ansatz wird 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend zuerst mit 25 mL Dichlormethan verdünnt und danach mit jeweils 25 mL 1 %iger HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-30 %).

Ausbeute: 1,3 g (54 %) eines weißen Feststoffes

Schmelzpunkt: 82 °C

DC: $R_f = 0,40$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 2:1; Reagenz A, UV)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 1.26 (t, ³J = 7.2 Hz, 3 H, CH₂-CH₃), 1.43 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.62-1.94 (m, 4 H, β , γ -CH₂), 3.71 (t, ³J = 6.8 Hz, 2 H, δ -CH₂), 4.18 (q, ³J = 7.2 Hz, 2 H, CH₂-CH₃), 4.24-4.35 (m, 1 H, α -CH), 5.06 (br d, ³J = 8.1 Hz, 1 H, NH), 7.68-7.75 (m, 2 H, ArH), 7.81-7.87 (m, 2 H, ArH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

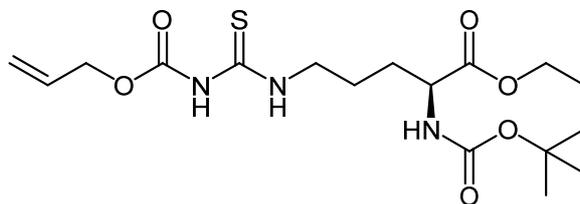
δ /ppm = 14.2 (CH₂-CH₃), 24.7 (γ -CH₂), 28.3 (C(CH₃)₃), 30.2 (β -CH₂), 37.5 (δ -CH₂), 53.2 (α -CH), 61.4 (CH₂-CH₃), 79.9 (C(CH₃)₃), 123.3 (2 × ArCH), 132.1 (2 × ArC), 134.0 (2 × ArCH), 155.4 (CO-Boc), 168.4 (2 × CO-Pht), 172.5 (COOEt).

MS (ESI):

$m/z = 413 [M + Na]^+$, $291 [M - C_4H_8 - CO_2 + H]^+$.

Elementaranalyse C₂₀H₂₆N₂O₆ (390.44):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 61.53 | H 6.71 | N 7.17, |
| gefunden: | C 61.73 | H 7.32 | N 6.94. |

***N*^α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*^ω-allyloxycarbonyl-L-thiocitrullin-ethylester (80)**

Zu einer Lösung von 541 mg (1,4 mmol) des geschützten Ornithins **77** in 20 mL einer Mischung aus Dichlormethan und Ethanol im Verhältnis 1:1 wird 1 mL (20 mmol, 15 eq.) Hydrazinhydrat (98+ %) hinzugefügt und der Ansatz zweieinhalb Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Ausgefallenes Phthalhydrazid wird abfiltriert und dreimal mit 5 mL Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wird mit 15 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung versetzt und 15 Sekunden geschüttelt. Die wässrige Phase wird zweimal mit 10 mL Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen einmal mit 15 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wird die Lösung über Na₂SO₄ getrocknet und bei 0 °C für 15 Minuten gerührt. Zu dieser vortemperierten Lösung wird über einen Zeitraum von 30 min 5 mL einer 0,5 M Lösung des Isothiocyanats **65** in Dichlormethan gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das ölige Rohprodukt flashchromatografisch aufgearbeitet (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-25 %).

Ausbeute: 224 mg (40 %) eines klaren Öls

DC: $R_f = 0,33$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 3:1; Reagenz A, UV)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 1.29 (t, ³J = 7.2 Hz, 3 H, CH₂CH₃), 1.45 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.63-1.96 (m, 4 H, β, γ-CH₂), 3.68 (pseudo q, 2 H, δ-CH₂), 4.21 (q, ³J = 7.2 Hz, 2 H, CH₂CH₃), 4.26-4.38 (m, 1 H, α-CH), 4.65 (ddd, ³J = 5.8, ⁴J = 1.7, 1.4 Hz, 2 H, CH₂=CH-CH₂), 5.10 (d, ³J = 8.1 Hz, 1 H, NH-Boc), 5.31 (ddd, ²J = 2.7, ³J_{cis} = 10.5, ⁴J = 1.2 Hz, 1 H, CH₂=CH-CH₂), 5.37 (ddd, ²J = 3.4, ³J_{trans} = 17.2, ⁴J = 1.4 Hz, 1 H, CH₂=CH-CH₂) 5.90 (ddt, ³J = 17.2, 10.5, 5.7 Hz, 1 H, CH=CH₂), 8.25 (br s, 1 H, NH), 9.67 (br s, 1 H, NH-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 14.2 (CH₂CH₃), 24.3 (γ-CH₂), 28.3 (C(CH₃)₃), 30. (β-CH₂), 45.0 (δ-CH₂), 53.1 (α-CH), 61.5 (CH₂CH₃), 67.0 (O-CH₂), 80.0 (2 × C(CH₃)₃), 119.5 (CH=CH₂), 130.9 (CH=CH₂), 152.5 (CO-Alloc), 155.4 (CO-Boc), 172.4 (COOEt), 179.2 (C=S).

IR (ATR):

cm⁻¹ = 3364, 3173, 2980, 1746, 1715, 1545, 1520, 1242, 1201, 1155, 1030, 671.

MS (ESI):

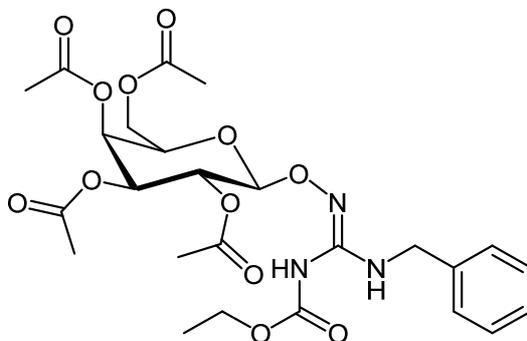
$m/z = 426 [M + Na]^+$, $404 [M + H]^+$, $348 [M - C_4H_8 + H]^+$, $304 [M - C_4H_8 - CO_2 + H]^+$.

Elementaranalyse C₁₇H₂₉N₃O₆S · 1.2 H₂O (425.12):

| | | | | |
|------------|---------|--------|--------|---------|
| Berechnet: | C 48.03 | H 7.45 | N 9.88 | S 7.54, |
| gefunden: | C 47.94 | H 6.60 | N 9.70 | S 7.56. |

8.1.2.2.6 Vorstufen der N^{ω} -(β -D-Galactosyloxy)-L-arginin Prodrugs und analoge Modellverbindungen *N*-Benzyl-*N'*-ethoxycarbonyl-*N''*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranos-1-yloxy)guanidin (**51**)^{105,146}

Synthesevorschrift nach SCHADE *et al.*:¹⁰⁵



Es werden 119 mg (0,5 mmol) des Thioharnstoffs **50**, 218 mg (0,6 mmol) der 1-Aminooxygalactose **45** und 105 μ L (0,6 mmol) DIPEA in 5 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Der Ansatz wird 30 Minuten bei 0 °C gerührt und anschließend werden 115 mg (0,6 mmol) EDCI zugegeben. Die Lösung wird weitere 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 10 mL Dichlormethan verdünnt. Der Reaktionsansatz wird mit jeweils 5 mL 1 %iger HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und die organische Phase anschließend über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das resultierende ölige Rohprodukt flashchromatografisch aufgearbeitet (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-40 %).

Ausbeute: 550 mg (88 %) eines weißen Pulvers

DC: $R_f = 0,46$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; Reagenz B, UV)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 1.31$ (t, $^3J = 7.2$ Hz, 3 H, CH_2CH_3), 2.00, 2.03, 2.07, 2.16 (4 \times s, 3 H, 4 \times COCH_3), 3.98 (td, $^3J = 6.7$, 1.2 Hz, 1 H, 5'-CH), 4.12-4.30 (m, 4 H, 6'- CH_2 , CH_2 -Ph), 4.90 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 1 H, 1'-CH), 5.08 (dd, $^3J = 10.4$, 3.5 Hz, 1 H, 3'- CH_2), 5.29 (dd, $^3J = 10.4$, 8.5 Hz, 1 H, 2'-CH), 5.41 (dd, $^3J = 3.4$, 1.1 Hz, 1 H, 4'-CH), 6.79 (br t, 1 H, NH-CH_2), 7.27-7.35 (m, 5 H, ArH), 7.72 (br s, 1 H, NH).

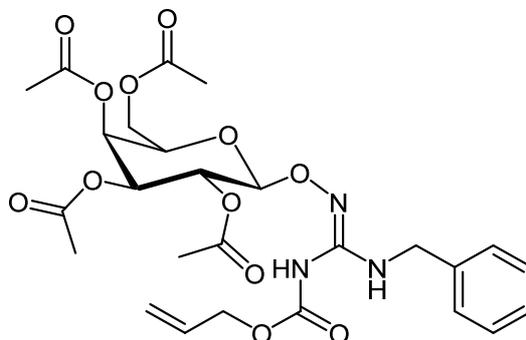
MS (ESI):

$m/z = 590$ [$M + \text{Na}$]⁺, 568 [$M + \text{H}$]⁺, 331 [$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_9$]⁺.

Elementaranalyse $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_{12}$ (567.55):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 52.91 | H 5.86 | N 7.40, |
| gefunden: | C 52.34 | H 6.31 | N 7.14. |

Die analytischen Daten entsprechen denen der Literatur.¹⁰⁵

***N*-Benzyl-*N'*-allyloxycarbonyl-*N''*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranos-1-yloxy)guanidin (**67**)**

250 mg (1 mmol) des Thioharnstoffs **66**, 399 mg (1,1 mmol) der peracetylierten 1-Aminooxygalactose **45** und 187 μ L (1,1 mmol) DIPEA werden in 10 mL trockenem Dichlormethan gelöst und 30 Minuten bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 211 mg (1,1 mmol) EDCI wird der Ansatz weitere 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Reaktionsansatz mit 10 mL Dichlormethan verdünnt und mit jeweils 10 mL 1 %iger HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die Lösung wird über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt über Flashchromatografie (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-45 %).

Ausbeute: 379 mg (65 %) eines weißen Feststoffs

DC: $R_f = 0,47$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; Reagenz B, UV)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 2.00, 2.03, 2.07, 2.16 (4 \times s, 3 H, 4 \times COCH₃), 3.98 (td, ³J = 6.8, 1.1 Hz, 1 H, 5'-CH), 4.13-4.30 (m, 4 H, 6'-CH₂, CH₂-Ph), 4.22 (dt, ³J = 5.7, 1.4 Hz, 2 H, O-CH₂), 4.90 (d, ³J = 8.3 Hz, 1 H, 1'-CH), 5.08 (dd, ³J = 10.6, 3.5 Hz, 1 H, 3'-CH₂), 5.23-5.43 (m, 4 H, CH₂=CH-CH₂, 2', 4'-CH), 5.92 (ddt, ³J = 17.2, 10.4, 5.8 Hz, 1 H, CH=CH₂), 6.75 (br t, ³J = 5.6, 1 H, NH-CH₂), 7.27-7.36 (m, 5 H, ArH), 7.81 (s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

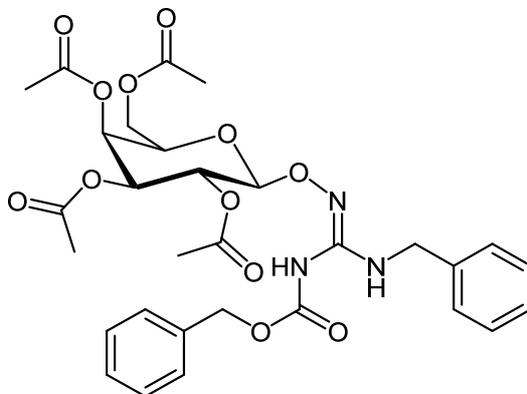
δ /ppm = 20.6, 20.7, 20.9, (4 \times COCH₃), 45.1 (NH-CH₂), 61.1 (6'-CH₂), 66.5 (O-CH₂), 66.9, 68.0, 70.6, 70.9 (4', 2', 5', 3'-CH), 102.6 (1'-CH), 118.9 (CH=CH₂), 127.4, 127.8, 128.6 (ArCH), 131.4 (CH=CH₂), 138.1 (ArC), 150.1 (C=N), 152.8 (C=O-Alloc), 170.1, 170.3, 170.4 (4 \times COCH₃).

MS (ESI):

$m/z = 602 [M + Na]^+$, $580 [M + H]^+$.

Elementaranalyse C₂₆H₃₃N₃O₁₂ · 0.8 H₂O (593.98):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 53.88 | H 5.74 | N 7.25, |
| gefunden: | C 53.55 | H 6.36 | N 7.65. |

***N*-Benzyl-*N'*-benzyloxycarbonyl-*N''*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranos-1-yloxy)guanidin (53)**

Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindungen **51** und **67** bereits beschrieben sind, mit **55** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 150 mg, 0,5 mmol).

Ausbeute: 195 mg (62 %) eines harzigen Öls

DC: $R_f = 0,57$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; Reagenz B, UV)

 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 1.99, 2.02, 2.03, 2.10$ ($4 \times s, 3 \text{ H}, 4 \times \text{COCH}_3$), 3.97 (td, $^3J = 6.8, 1.0 \text{ Hz}, 1 \text{ H}, 5'\text{-CH}$), $4.11\text{-}4.23$ (m, $2 \text{ H}, 6'\text{-CH}_2$), 4.27 (dd, $^3J = 5.4, 2.7 \text{ Hz}, 2 \text{ H}, \text{NH-CH}_2$), 4.89 (d, $^3J = 8.3 \text{ Hz}, 1 \text{ H}, 1'\text{-CH}$), 5.06 (dd, $^3J = 10.5, 3.4 \text{ Hz}, 1 \text{ H}, 3'\text{-CH}_2$), 5.16 (s, $2 \text{ H}, \text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.27 (dd, $^3J = 10.5, 8.3 \text{ Hz}, 1 \text{ H}, 2'\text{-CH}$), 5.40 (dd, $^3J = 3.4, 1.0 \text{ Hz}, 1 \text{ H}, 4'\text{-CH}$) 6.75 (br t, $^3J = 5.3, 1 \text{ H}, \text{NH-CH}_2$), $7.27\text{-}7.36$ (m, $5 \text{ H}, \text{ArH}$), 7.81 (s, $1 \text{ H}, \text{NH}$).

 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

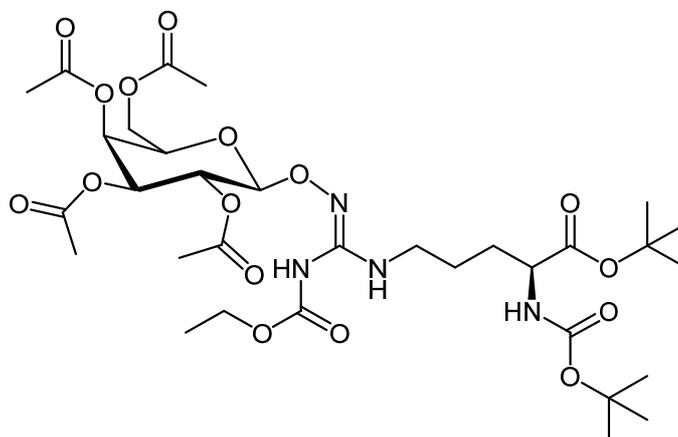
$\delta/\text{ppm} = 20.6, 20.7, 20.9$ ($4 \times \text{COCH}_3$), 45.1 (NH-CH_2), 61.0 ($6'\text{-CH}_2$), 66.9 ($4'\text{-CH}$), 67.7 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), $68.0, 70.6, 70.9$ ($2', 5', 3'\text{-CH}$), 102.6 ($1'\text{-CH}$), $127.4, 127.8, 128.3, 128.6, 128.7$ (ArCH), 135.1 (ArC-Cbz), 138.1 (ArC-Bn), 150.2 (C=N), 152.9 (C=O-Cbz), $170.1, 170.3, 170.4$ ($4 \times \text{COCH}_3$).

MS (ESI):

$m/z = 652 [M + \text{Na}]^+, 630 [M + \text{H}]^+$.

***N*^α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*^ω-ethoxycarbonyl-*N*^{ω'}-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin-*tert*-butylester (46)**

Synthesevorschrift nach SCHADE *et al.*:¹⁰⁵



377 mg (0,9 mmol) des Thioharnstoffs **44**, 363 mg (1,0 mmol) der 1-Aminooxygalactose **45** und 164 μ L (1,0 mmol) DIPEA werden in 10 mL trockenem Dichlormethan gelöst und 30 Minuten bei 0 °C gerührt. Es werden 192 mg (1,0 mmol) EDCI hinzugefügt und der Ansatz für 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wird mit 10 mL Dichlormethan verdünnt und mit jeweils 10 mL 1 %iger HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die anschließende Aufarbeitung erfolgt flashchromatografisch (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-50 %).

Ausbeute: 502 mg (75 %) eines weißen Pulvers.

DC: $R_f = 0,40$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; Reagenz A und B, UV)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 1.31 (t, ³J = 7.2 Hz, 3 H, CH₂CH₃), 1.44, 1.46 (2 × s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.54-1.88 (m, 4 H, β, γ-CH₂), 2.00, 2.04, 2.07, 2.16 (4 × s, 3 H, 4 × COCH₃), 3.05-3.18 (m, 2 H, δ-CH₂), 3.98 (td, ³J = 6.9, 1.0 Hz, 1 H, 5'-CH), 4.12-4.23 (m, 5 H, 6'-CH₂, α-CH, CH₂CH₃), 4.87 (d, ³J = 8.3 Hz, 1 H, 1'-CH), 5.02-5.11 (m, 2 H, 3'-CH, NH-Boc), 5.27 (dd, ³J = 10.4, 8.3 Hz, 1 H, 2'-CH), 5.41 (dd, ³J = 3.5, 1.0 Hz, 1 H, 4'-CH), 6.49 (br t, ³J = 5.1 Hz, 1 H, NH-CH₂), 7.67 (br s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

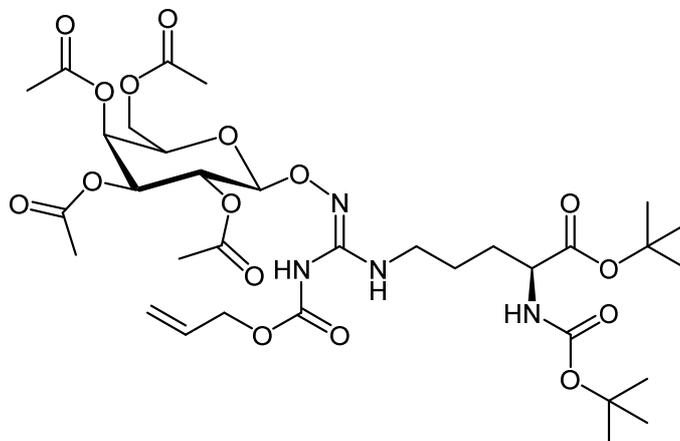
δ /ppm = 14.3 (CH₂CH₃), 20.6, 20.7, 20.9, (4 × COCH₃), 24.8 (γ-CH₂), 28.0, 28.3 (2 × C(CH₃)₃), 30.3 (β-CH₂), 40.5 (δ-CH₂), 53.7 (α-CH), 61.0 (6'-CH₂), 62.2 (CH₂CH₃), 66.9, 68.0, 70.5, 70.9 (4', 2', 5', 3'-CH), 79.7, 81.9 (2 × C(CH₃)₃), 102.5 (1'-CH), 150.4 (C=N), 153.1 (CO-Eoc), 155.4 (CO-Boc), 170.1, 170.3, 170.4 (4 × COCH₃), 171.7 (COO^tBu).

MS (ESI):

$m/z = 771 [M + Na]^+$, $749 [M + H]^+$.

Die analytischen Daten entsprechen denen der Literatur.¹⁰⁵

***N*^α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*^ω-allyloxycarbonyl-*N*^{ω'}-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin-*tert*-butylester (72)**



Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **46** bereits beschrieben sind, mit **71** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 1,3 g, 3 mmol). Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-30 %).

Ausbeute: 1,74 g (76 %) eines weißen Feststoffs.

Schmelzpunkt: 78 °C

DC: $R_f = 0,49$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; Reagenz A und B, UV)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 1.44, 1.47 (2 × s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.54-1.90 (m, 4 H, β, γ-CH₂), 2.00, 2.04, 2.07, 2.16 (4 × s, 3 H, 4 × COCH₃), 3.10 (pseudo q, 2 H, δ-CH₂), 3.98 (td, ³J = 6.9, 1.0 Hz, 1 H, 5'-CH), 4.12-4.23 (m, 3 H, 6'-CH₂, α-CH), 4.63 (dt, ³J = 5.6, 1.4 Hz, 2 H, CH₂=CH-CH₂), 4.87 (d, ³J = 8.4 Hz, 1 H, 1'-CH), 5.05-5.12 (m, 2 H, 3'-CH, NH-Boc), 5.23-5.43 (m, 4 H, 2', 4'-CH, CH₂=CH-CH₂), 5.93 (ddt, ³J = 17.2, 10.4, 5.7 Hz, 1 H, CH=CH₂), 6.45 (br t, ³J = 5.2, 1 H, NH-CH₂), 7.76 (br s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 20.66, 20.69, 20.70, 20.90, (4 × COCH₃), 24.8 (γ-CH₂), 28.0, 28.3 (2 × C(CH₃)₃), 30.3 (β-CH₂), 40.5 (δ-CH₂), 53.7 (α-CH), 61.0 (6'-CH₂), 66.5 (O-CH₂), 66.9, 68.0, 70.5, 70.9 (4', 2', 5', 3'-CH), 79.7, 81.9 (2 × C(CH₃)₃), 102.5 (1'-CH), 118.9 (CH=CH₂), 131.5 (CH=CH₂), 150.3 (C=N), 152.8 (CO-Alloc), 155.4 (CO-Boc), 170.07, 170.13, 170.25, 170.34 (4 × COCH₃), 171.7 (COO^tBu).

MS (ESI):

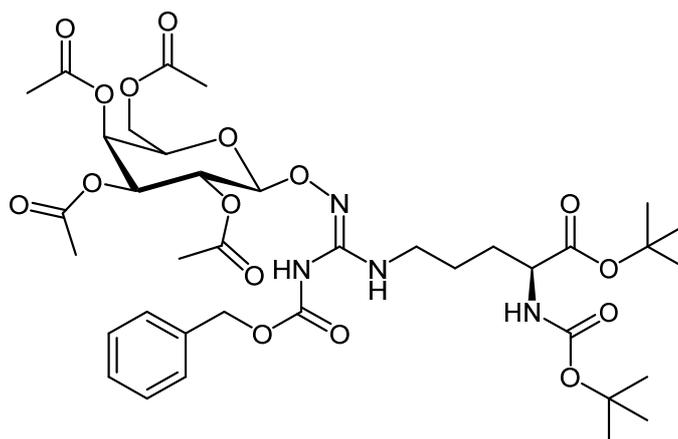
$m/z = 783 [M + Na]^+$, $761 [M + H]^+$.

IR (ATR):

cm⁻¹ = 3450, 2980, 1732, 1645, 1366, 1215, 1151, 1043, 772.

Elementaranalyse C₃₃H₅₂N₄O₁₆ (760.79):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 52.80 | H 6.86 | N 7.24, |
| gefunden: | C 52.34 | H 6.67 | N 7.28. |

***N*^α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*^ω-allyloxycarbonyl-*N*^{ω'}-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin-*tert*-butylester (116)**

Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **46** bereits beschrieben sind, mit **115** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 609 mg, 1,3 mmol). Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-40 %).

Ausbeute: 523 mg (51 %) eines weißen Feststoffs

Schmelzpunkt: 64 °C

DC: $R_f = 0,45$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; Reagenz A und B, UV)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 1.45, 1.46 (2 × s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.54-1.88 (m, 4 H, β, γ-CH₂), 1.99, 2.02, 2.03, 2.14 (4 × s, 3 H, 4 × COCH₃), 3.02-3.17 (m, 2 H, δ-CH₂), 3.97 (td, ³J = 6.9, 1.0 Hz, 1 H, 5'-CH), 4.10-4.25 (m, 3 H, 6'-CH₂, α-CH), 4.86 (d, ³J = 8.3 Hz, 1 H, 1'-CH), 5.01-5.13 (m, 2 H, 3'-CH, NH-Boc), 5.16 (s, 2 H, CH₂-Ph), 5.25 (dd, ³J = 10.5, 8.4 Hz, 1 H, 2'-CH), 5.41 (dd, ³J = 3.4, 0.9 Hz, 1 H, 4'-CH), 6.45 (br t, ³J = 5.1 Hz, 1 H, NH-CH₂), 7.30-7.43 (m, 5 H, ArH), 7.79 (br s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

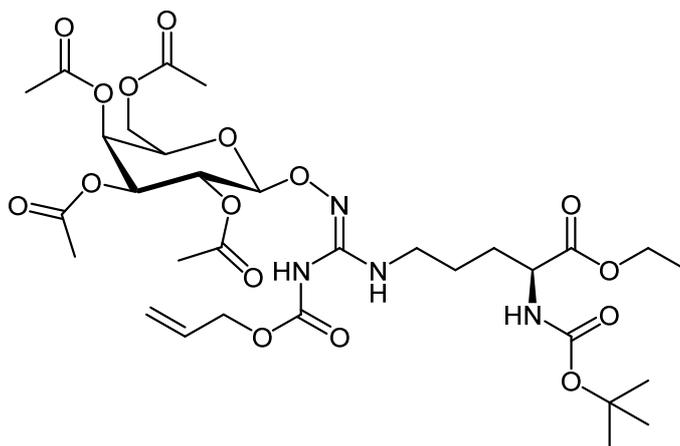
δ /ppm = 20.6, 20.7, 20.9, (4 × COCH₃), 24.8 (γ-CH₂), 28.0, 28.3 (2 × C(CH₃)₃), 30.3 (β-CH₂), 40.5 (δ-CH₂), 53.7 (α-CH), 60.9 (6'-CH₂), 66.8 (4'-CH), 67.6 (CH₂-Ph), 68.0, 70.5, 70.9 (2', 5', 3'-CH), 79.6, 81.9 (2 × C(CH₃)₃), 102.5 (1'-CH), 128.2, 128.6, 128.7 (ArCH), 135.1 (ArC), 150.3 (C=N), 152.9 (CO-Cbz), 155.3 (CO-Boc), 170.0, 170.2, 170.3 (4 × COCH₃), 171.7 (COO^tBu).

MS (ESI):

$m/z = 833 [M + Na]^+$, $811 [M + H]^+$.

Elementaranalyse $C_{37}H_{54}N_4O_{16}$ (810.85):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 54.81 | H 6.71 | N 6.91, |
| gefunden: | C 54.71 | H 7.44 | N 6.80. |

***N*^α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*^ω-allyloxycarbonyl-*N*^{ω'}-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin-ethylester (81)**

Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **46** bereits beschrieben sind, mit **80** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 387 mg, 0,96 mmol). Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-30 %).

Ausbeute: 653 mg (93 %) eines weißen Feststoffs

Schmelzpunkt: 65 °C

DC: $R_f = 0,31$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; Reagenz A und B, UV)

 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 1.28$ (t, $^3J = 7.2$ Hz, 3 H, CH_2CH_3), 1.45 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.59-1.94 (m, 4 H, β , γ - CH_2), 2.00, 2.04, 2.11, 2.16 (4 \times s, 3 H, 4 \times COCH_3), 3.10 (pseudo q, 2 H, δ - CH_2), 3.99 (td, $^3J = 6.9$, 1.0 Hz, 1 H, 5'-CH), 4.07-4.34 (m, 5 H, 6'- CH_2 , α -CH, CH_2CH_3), 4.66 (dt, $^3J = 5.6$, 1.4 Hz, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 4.87 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, 1'-CH), 5.03-5.13 (m, 2 H, 3'-CH, NH-Boc), 5.22-5.43 (m, 4 H, 2', 4'-CH, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 5.92 (ddt, $^3J = 17.2$, 10.4, 5.7 Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.44 (br t, $^3J = 5.2$, 1 H, $\text{NH}-\text{CH}_2$), 7.76 (br s, 1 H, NH).

 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 14.2$ (CH_2CH_3), 20.57, 20.64, 20.67, 20.94, (4 \times COCH_3), 25.0 (γ - CH_2), 28.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.0 (β - CH_2), 41.1 (δ - CH_2), 53.2 (α -CH), 60.9 (6'- CH_2), 61.4 (CH_2CH_3), 66.8 (4'-CH), 67.0 (O- CH_2), 67.6, 68.4, 70.7 (2', 5', 3'-CH), 79.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 103.1 (1'-CH), 119.4 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 131.5 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 150.1 (C=N), 152.8 (CO-Alloc), 155.4 (CO-Boc), 169.96, 170.14, 170.26, 170.31 (4 \times COCH_3), 171.5 (COOEt).

MS (ESI):

$m/z = 755$ [$M + \text{Na}$]⁺, 733 [$M + \text{H}$]⁺.

IR (ATR):

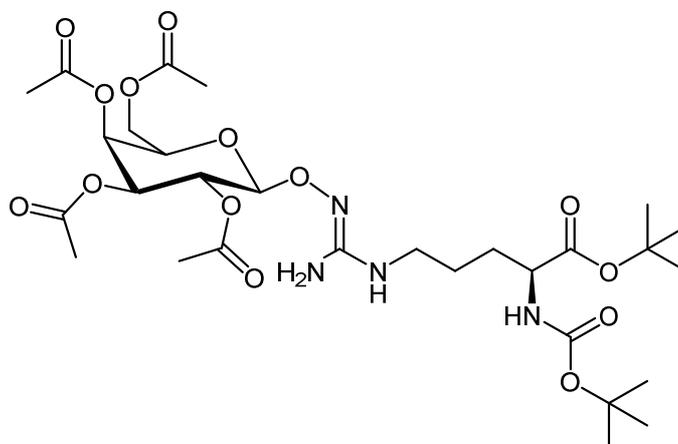
$\text{cm}^{-1} = 3400, 1744, 1651, 1506, 1367, 1215, 1161, 1047, 910, 772.$

Elementaranalyse $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_{16} \cdot 1,6 \text{H}_2\text{O}$ (761.57):

Berechnet: C 48.89 H 6.78 N 7.36,
 gefunden: C 48.64 H 6.98 N 6.88.

***N*^α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*^ω-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin-*tert*-butylester (73)**

Synthesevorschrift in Anlehnung an KUNZ und UNVERZAGT:¹⁹⁹



Zu einer Lösung von 729 mg (1 mmol) der vollgeschützten Verbindung **72** in 20 mL Tetrahydrofuran werden 1,1 g (7,7 mmol, 8 eq.) Dimedon **59** und 111 mg (0,1 mmol, 10 Mol-%) $\text{Pd}(0)[\text{Ph}_3\text{P}]_4$ zugegeben und der Ansatz 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der gelbe Rückstand in 30 mL Ethylacetat aufgenommen. Die Suspension wird dreimal mit 10 mL 3%iger_(aq) Ammoniaklösung und jeweils einmal mit 10 mL Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wird die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum eingengt. Die weitere Aufarbeitung erfolgt über Flashchromatografie (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol, 0-5 % über 25 Minuten).

Ausbeute: 588 mg (90 %) eines hellgelben Feststoffs

Schmelzpunkt: 95 °C

DC: $R_f = 0,33$ (Dichlormethan/Methanol, 95:5; Reagenz A und B)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 1.44, 1.46$ (2 × s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.53-1.83 (m, 4 H, β, γ- CH_2), 1.99, 2.03, 2.07, 2.18 (4 × s, 3 H, 4 × COCH_3), 2.98-3.06 (m, 2 H, δ- CH_2), 3.59 (br s, 1 H, NH-CH_2), 3.98 (td, $^3J = 6.9, 1.0$ Hz, 1 H, 5'-CH), 4.10-4.24 (m, 3 H, 6'- CH_2 , α-CH), 4.33 (br s, 2 H, NH_2), 4.87 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1 H, 1'-CH), 5.03-5.30 (m, 3 H, 2', 3'-CH, NH-Boc), 5.40 (dd, $^3J = 3.5, 1.0$ Hz, 1 H, 4'-CH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 20.62, 20.68, 20.71, 21.01, (4 × COCH₃), 25.4 (γ-CH₂), 28.0, 28.4 (2 × C(CH₃)₃), 30.8 (β-CH₂), 41.5 (δ-CH₂), 53.4 (α-CH), 61.0 (6'-CH₂), 66.9, 68.1, 70.4, 71.0 (4', 2', 5', 3'-CH), 79.7, 82.1 (2 × C(CH₃)₃), 102.5 (1'-CH), 155.6 (C=N), 156.6 (CO-Boc), 170.13, 170.16, 170.32, 170.36 (4 × COCH₃), 171.7 (COO^tBu).

¹⁵N-NMR (30 MHz, CDCl₃):

Ammoniak-Skala: δ /ppm = 53.2 (NH₂), 60.4 (NH-CH₂), 86.8 (NH-Boc),

Nitromethan-Skala: δ /ppm = -328.4 (NH₂), -321.2 (NH-CH₂), -294.8 (NH-Boc).

IR (ATR):

cm⁻¹ = 3450, 2950, 1744, 1714, 1645, 1516, 1366, 1217, 1152, 1043, 908.

MS (ESI):

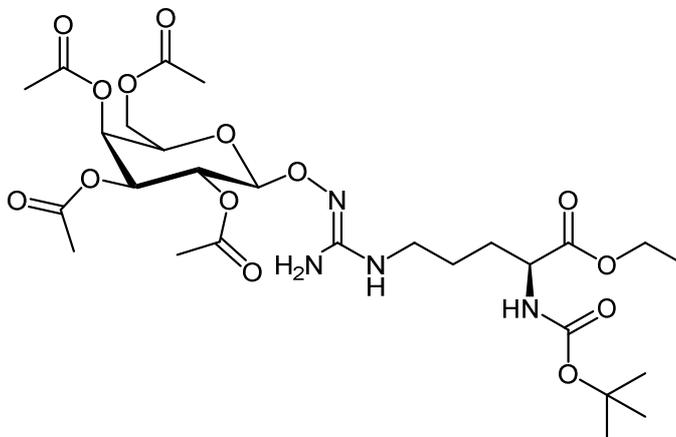
m/z = 677 [M + H]⁺.

HRMS (ESI) für C₂₉H₄₈N₄O₁₄:

m/z berechnet für [M + H]⁺ = 677.3239,

m/z gefunden für [M + H]⁺ = 677.3219.

***N*^α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*^ω-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin-ethylester (82)**



Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **73** bereits beschrieben sind, mit **81** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 300 mg, 0,41 mmol). Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol, 0-5 % über 20 Minuten).

Ausbeute: 220 mg (84 %) eines hellgelben Feststoffs

DC: R_f = 0,55 (Dichlormethan/Methanol, 95:5; Reagenz A und B)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

δ/ppm = 1.29 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 3 H, CH_2CH_3), 1.44 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.56-1.91 (m, 4 H, β , γ - CH_2), 1.99, 2.04, 2.09, 2.15 (4 \times s, 3 H, 4 \times COCH_3), 3.04-3.29 (m, 2 H, δ - CH_2), 4.00 (td, $^3J = 6.9, 1.0$ Hz, 1 H, 5'-CH), 4.12-4.35 (m, 5 H, 6'- CH_2 , α -CH, CH_2CH_3), 4.73 (br s, 2 H, NH_2), 4.87 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1 H, 1'-CH), 5.07 (dd, $^3J = 10.5, 3.4$ Hz, 1 H, 3'-CH), 5.20-5.31 (m, 2 H, 2'-CH, NH-Boc), 5.41 (dd, $^3J = 3.4, 1.0$ Hz, 1 H, 4'-CH).

 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

δ/ppm = 14.2 (CH_2CH_3), 20.60, 20.66, 20.70, 21.00, (4 \times COCH_3), 25.6 (γ - CH_2), 28.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.5 (β - CH_2), 41.2 (δ - CH_2), 52.7 (α -CH), 60.9 (6'- CH_2), 61.6 (CH_2CH_3), 66.9 (4'-CH), 67.9, 70.7, 70.8 (2', 5', 3'-CH), 80.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 103.0 (1'-CH), 155.9 (C=N), 157.1 (CO-Boc), 170.1, 170.20, 170.23, 170.3 (4 \times COCH_3), 172.5 (COOEt).

IR (ATR):

cm^{-1} = 1748, 1713, 1368, 1215, 1161, 1055, 955, 743.

MS (ESI):

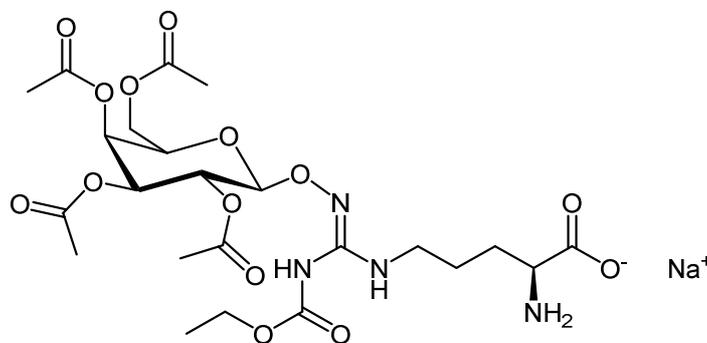
m/z = 649 [$M + \text{H}$] $^+$.

Elementaranalyse $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_{14} \cdot 1,4 \text{H}_2\text{O}$ (673.89):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 48.12 | H 7.00 | N 8.31, |
| gefunden: | C 48.28 | H 7.14 | N 7.55. |

 N^{ω} -Ethoxycarbonyl- $N^{\omega'}$ -(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin Natriumsalz (47)

Synthesevorschrift nach SCHADE *et al.*:¹⁰⁵



200 mg (0,26 mmol) der gut getrockneten Verbindung **46** werden unter Argon-Atmosphäre in 30 mL absolutem Diethylether gelöst und 30 Minuten bei -5 bis 0 °C gerührt. Anschließend wird vorsichtig für 8 Minuten trockener Chlorwasserstoff in die Lösung geleitet. Der Reaktionsansatz wird 24 h im Kühlschrank aufbewahrt, wobei das Produkt **47** als feiner weißer Niederschlag präzipitiert. Das Lösungsmittel wird vorsichtig im Vakuum abgezogen und der weiße Feststoff noch eine weitere Stunde im Ölpumpenvakuum getrocknet. Der Rückstand wird unter Eiskühlung in 2-3 mL 0,5 M NaHCO_3 -Lösung aufgenommen und flashchromatografisch über eine RP-18-Säule aufgearbeitet (*Aqua bidest.*/Methanol, Stufengradient: 10/25/50 % Methanol). Produkthaltige Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 136 mg (85 %) eines weißen Pulvers

DC: $R_f = 0,43$ (*i*-Prop/H₂O, 9:1; Reagenz A und B)

¹H-NMR (300 MHz, D₂O, TPS):

δ /ppm = 1.24 (t, $^3J = 7.2$ Hz, 3 H, CH₂CH₃), 1.48-1.94 (m, 4 H, β , γ -CH₂), 1.98, 2.05, 2.09, 2.18 (4 × s, 3 H, 4 × COCH₃), 3.10 (br t, $^3J = 6.8$ Hz, 2 H, δ -CH₂), 3.72 (t, $^3J = 6.2$, 1 H, 5'-CH), 4.12-4.26 (m, 5 H, 6'-CH₂, α -CH, CH₂CH₃), 4.88 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1 H, 1'-CH), 5.03-5.13 (m, 1 H, 3'-CH), 5.19-5.28 (m, 1 H, 2'-CH), 5.43-5.46 (m, 1 H, 4'-CH).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O, TPS):

δ /ppm = 15.3 (CH₂CH₃), 21.8, 22.0, 22.6 (4 × COCH₃), 25.7 (γ -CH₂), 29.7 (β -CH₂), 41.9 (δ -CH₂), 56.3 (α -CH), 63.7 (6'-CH₂), 64.9 (CH₂CH₃), 69.8, 69.9, 72.4, 73.0 (4', 2', 5', 3'-CH), 104.9 (1'-CH), 153.4 (C=N), 156.0 (CO-Eoc), 174.5, 174.9, 175.1, 175.4 (4 × COCH₃), 176.3 (COO).

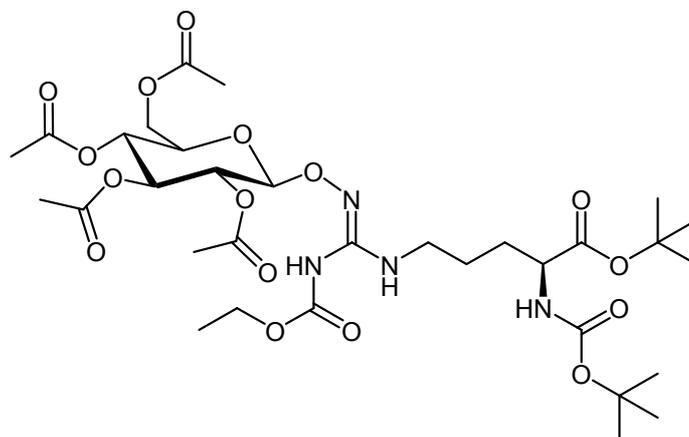
MS (ESI):

$m/z = 593 [M + H]^+$, 551 [$M - C_2H_2O + H$]⁺, 331 [C₁₄H₁₉O₉].

Die analytischen Daten stimmen mit den Daten der Literatur überein.¹⁰⁵

8.1.2.2.7 Vorstufen der N^{ω} -(β -D-Glucosyloxy)-L-arginin Prodrugs

N^{α} -(*tert*-Butyloxycarbonyl)- N^{ω} -ethoxycarbonyl- $N^{\omega'}$ -(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranos-1-yloxy)-L-arginin-*tert*-butylester (117)



Es werden 377 mg (0,9 mmol) des Thioharnstoffs **44**, 400 mg (1,3 mmol) der peracetylierten 1-Aminooxyglucose **86** und 221 μ L (1,3 mmol) DIPEA in 10 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Diese Lösung wird 30 Minuten bei 0 °C gerührt und anschließend 249 mg (1,3 mmol) EDCI zugegeben. Der Reaktionsansatz wird weitere 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 10 mL Dichlormethan verdünnt. Die Lösung wird mit jeweils 10 mL 1 %iger HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels erfolgt die Aufreinigung über Flashchromatografie (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-45 %).

Ausbeute: 548 mg (81 %) eines weißen Feststoffs

DC: $R_f = 0,42$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; Reagenz A und B, UV)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 1.30$ (t, $^3J = 7.2$ Hz, 3 H, CH_2CH_3), 1.44, 1.46 (2 \times s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.55-1.90 (m, 4 H, β , γ - CH_2), 2.02, 2.03, 2.08, 2.09 (4 \times s, 3 H, 4 \times COCH_3), 3.02-3.16 (m, 2 H, δ - CH_2), 3.77 (ddd, $^3J = 10.3$, 4.2, 2.3 Hz, 1 H, 5'-CH), 4.04-4.23 (m, 4 H, 6'a- CH_2 , α -CH, CH_2CH_3), 4.33 (dd, $^2J = 12.5$, $^3J = 4.3$ Hz, 1 H, 6'b- CH_2), 4.89 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, 1'-CH), 5.02-5.18 (m, 3 H, 2', 4'-CH, NH-Boc), 5.25 (dd, $^3J = 9.4$, 7.9 Hz, 1 H, 3'-CH), 6.50 (br t, $^3J = 5.1$ Hz, 1 H, NH-CH_2), 7.63 (br s, 1 H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 14.3$ (CH_2CH_3), 20.6, 20.7, 20.8, (4 \times COCH_3), 24.9 (γ - CH_2), 28.0, 28.3 (2 \times $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.3 (β - CH_2), 40.5 (δ - CH_2), 53.7 (α -CH), 61.8 (6'- CH_2), 62.2 (CH_2CH_3), 68.3, 70.2, 71.7, 72.9 (4', 2', 5', 3'-CH), 79.3, 81.9 (2 \times $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 102.0 (1'-CH), 150.7 (C=N), 153.1 (CO-Eoc), 155.4 (CO-Boc), 169.5, 169.8, 170.2, 170.7 (4 \times COCH_3), 171.7 (COO^tBu).

IR (ATR):

$\text{cm}^{-1} = 1740, 1717, 1645, 1506, 1464, 1366, 1213, 1151, 1034, 905, 773$.

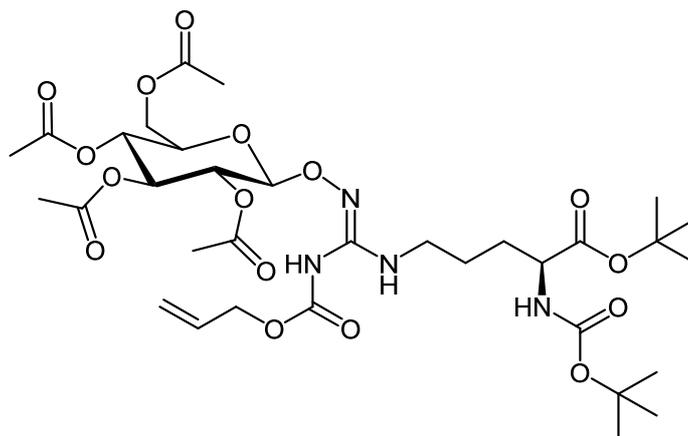
MS (ESI):

$m/z = 771 [M + Na]^+$, $749 [M + H]^+$.

Elementaranalyse $C_{32}H_{52}N_4O_{16}$ (748.78):

Berechnet: C 51.33 H 7.00 N 7.48,
 gefunden: C 51.35 H 7.26 N 7.22.

N^α -(*tert*-Butyloxycarbonyl)- N^ω -allyloxycarbonyl- $N^{\omega'}$ -(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranos-1-yloxy)-L-arginin-*tert*-butylester (87)



Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **117** bereits beschrieben sind, mit **71** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 714 mg, 1,65 mmol). Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-50 %).

Ausbeute: 861 mg (69 %) eines weißen Feststoffs

DC: $R_f = 0,43$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; Reagenz A und B, UV)

 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 1.44, 1.46$ ($2 \times s$, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), $1.55\text{-}1.90$ (m, 4 H, $\beta, \gamma\text{-CH}_2$), $2.02, 2.03, 2.06, 2.07$ ($4 \times s$, 3 H, $4 \times \text{COCH}_3$), $3.02\text{-}3.15$ (m, 2 H, $\delta\text{-CH}_2$), 3.77 (ddd, $^3J = 9.9, 4.4, 2.4$ Hz, 1 H, $5'\text{-CH}$), $4.09\text{-}4.23$ (m, 2 H, $6'\text{a-CH}_2, \alpha\text{-CH}$), 4.32 (dd, $^2J = 12.2, ^3J = 4.4$ Hz, 1 H, $6'\text{b-CH}_2$), 4.62 (dt, $^3J = 5.6, 1.4$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2$), 4.88 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1 H, $1'\text{-CH}$), $5.04\text{-}5.17$ (m, 3 H, $2', 4'\text{-CH}_2, \text{NH-Boc}$), $5.21\text{-}5.41$ (m, 3 H, $3'\text{-CH}, \text{CH}_2=\text{CH-CH}_2$), 5.93 (ddt, $^3J = 17.2, 10.4, 5.7$ Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.45 (br t, $^3J = 5.2$, 1 H, NH-CH_2), 7.72 (br s, 1 H, NH).

 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 20.6, 20.7, 20.8$, ($4 \times \text{CO-CH}_3$), 24.8 ($\gamma\text{-CH}_2$), $28.0, 28.3$ ($2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.2 ($\beta\text{-CH}_2$), 40.5 ($\delta\text{-CH}_2$), 53.7 ($\alpha\text{-CH}$), 61.8 ($6'\text{-CH}_2$), 66.5 (O-CH_2), $68.5, 70.2, 71.7, 72.8$ ($4', 2', 5', 3'\text{-CH}$), $79.7, 81.9$ ($2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 102.0 ($1'\text{-CH}$), 119.0 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 131.4 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 150.5 ($\text{C}=\text{N}$), 152.8 (CO-Alloc), 155.4 (CO-Boc), $169.5, 169.9, 170.2, 170.7$ ($4 \times \text{COCH}_3$), 171.7 (COO^tBu).

MS (ESI):

$m/z = 783 [M + Na]^+$, $761 [M + H]^+$.

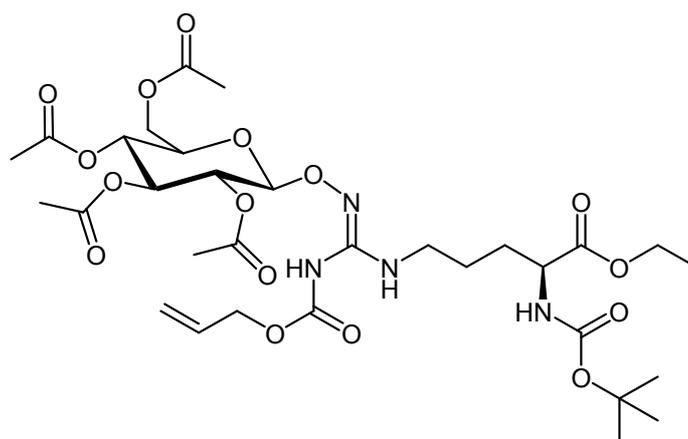
IR (ATR):

$\text{cm}^{-1} = 3400, 1732, 1645, 1366, 1215, 1151, 1036, 772.$

Elementaranalyse $\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_{16}$ (760.79):

Berechnet: C 52.10 H 6.89 N 7.36,
 gefunden: C 52.14 H 6.93 N 7.74.

N^{α} -(*tert*-Butyloxycarbonyl)- N^{ω} -allyloxycarbonyl- $N^{\omega'}$ -(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranos-1-yloxy)-L-arginin-ethylester (88**)**



Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **117** bereits beschrieben sind, mit **80** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 224 mg, 0,56 mmol). Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-45 %).

Ausbeute: 300 mg (73 %) eines weißen Feststoffs

DC: $R_f = 0,31$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; Reagenz A und B, UV)

 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 1.28$ (t, $^3J = 7.2$ Hz, 3 H, CH_2CH_3), 1.45 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.55-1.91 (m, 4 H, β , γ - CH_2), 2.02, 2.03, 2.06, 2.07 (4 \times s, 3 H, 4 \times COCH_3), 3.05-3.15 (m, 2 H, δ - CH_2), 3.77 (ddd, $^3J = 10.2, 4.5, 2.3$ Hz, 1 H, 5'-CH), 4.10-4.36 (m, 5 H, 6'- CH_2 , α -CH, CH_2CH_3), 4.62 (dt, $^3J = 5.7, 1.7$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 4.89 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, 1'-CH), 5.06-5.16 (m, 3 H, 2', 4'-CH, NH-Boc), 5.22-5.41 (m, 3 H, 3'-CH, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2$), 5.92 (ddt, $^3J = 17.2, 10.4, 5.7$ Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 6.45 (br t, $^3J = 5.3$, 1 H, $\text{NH}-\text{CH}_2$), 7.72 (br s, 1 H, NH).

 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 14.2$ (CH_2CH_3), 20.61, 20.63, 20.70, 20.90, (4 \times COCH_3), 25.0 (γ - CH_2), 28.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.1 (β - CH_2), 40.4 (δ - CH_2), 53.3 (α -CH), 61.8 (CH_2CH_3), 61.9 (6'- CH_2), 66.6 (O- CH_2), 68.3, 70.2, 71.7, 72.8 (4', 2', 5', 3'-CH), 79.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 102.0 (1'-CH), 119.0 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 131.4 ($\text{CH}=\text{CH}_2$), 150.5 (C=N), 152.8 (CO-Alloc), 155.4 (CO-Boc), 169.5, 169.9, 170.2, 170.7 (4 \times COCH_3), 172.6 (COOEt).

MS (ESI):

$m/z = 755$ [$M + \text{Na}$] $^+$, 733 [$M + \text{H}$] $^+$.

IR (ATR):

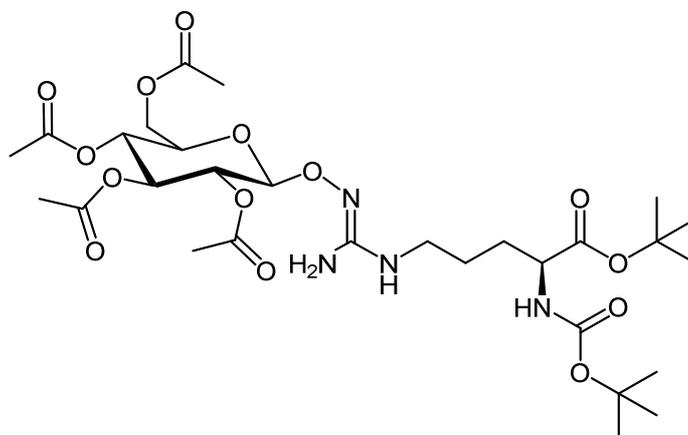
cm^{-1} = 3450, 1738, 1717, 1645, 1456, 1366, 1213, 1161, 1034, 908, 772.

Elementaranalyse $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_{16}$ (732.74):

Berechnet: C 50.82 H 6.60 N 7.65,
 gefunden: C 50.78 H 6.74 N 8.08.

N^α -(*tert*-Butyloxycarbonyl)- N^ω -(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranos-1-yloxy)-L-arginin-*tert*-butylester (89)

Synthesevorschrift in Anlehnung an KUNZ und UNVERZAGT:¹⁹⁹



Es werden 737 mg (0,97 mmol) der vollgeschützten Verbindung **87**, 1,1 g (7,7 mmol, 8 eq.) Dimedon **59** und 112 mg (0,1 mmol, 10 Mol-%) $\text{Pd}(0)[\text{Ph}_3\text{P}]_4$ in 20 mL Tetrahydrofuran gelöst und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der gelbe Rückstand in 30 mL Ethylacetat aufgenommen. Die Suspension wird dreimal mit jeweils 10 mL 3 %iger_(aq) Ammoniaklösung und jeweils einmal mit 10 mL Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wird die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum eingengt. Die weitere Aufreinigung erfolgt flashchromatografisch (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol, 0-5 % über 25 Minuten).

Ausbeute: 582 mg (89 %) eines weiß-gelben Feststoffs

Schmelzpunkt: 94 °C

DC: R_f = 0,31 (Dichlormethan/Methanol, 95:5; Reagenz A und B)

 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

δ/ppm = 1.44, 1.47 (2 \times s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.51-1.87 (m, 4 H, β , γ - CH_2), 2.01, 2.02, 2.06, 2.07 (4 \times s, 3 H, 4 \times COCH_3), 2.96-3.23 (m, 2 H, δ - CH_2), 3.70 (br s, 1 H, NH-CH_2), 3.77 (ddd, 3J = 10.1, 4.2, 2.4 Hz, 1 H, 5'-CH), 4.07-4.22 (m, 2 H, 6'a- CH_2 , α -CH), 4.27-4.45 (m, 3 H, 6'b- CH_2 , NH_2), 4.88 (d, 3J = 8.6 Hz, 1 H, 1'-CH), 5.03-5.29 (m, 4 H, 2', 3', 4'-CH, NH-Boc).

 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

δ/ppm = 20.61, 20.65, 20.80, 20.90, (4 \times COCH_3), 25.6 (γ - CH_2), 28.0, 28.4 (2 \times $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.7 (β - CH_2), 41.2

(δ -CH₂), 53.0 (α -CH), 61.8 (6'-CH₂), 68.3, 70.3, 71.6, 72.9 (4', 2', 5', 3'-CH), 80.0, 82.2 (2 \times C(CH₃)₃), 102.1 (1'-CH), 155.7 (C=N), 156.8 (CO-Boc), 169.5, 169.9, 170.2, 170.8 (4 \times COCH₃), 171.7 (COO^tBu).

IR (ATR):

cm⁻¹ = 1744, 1714, 1643, 1639, 1520, 1366, 1215, 1161, 1112, 1096, 1034, 908.

MS (ESI):

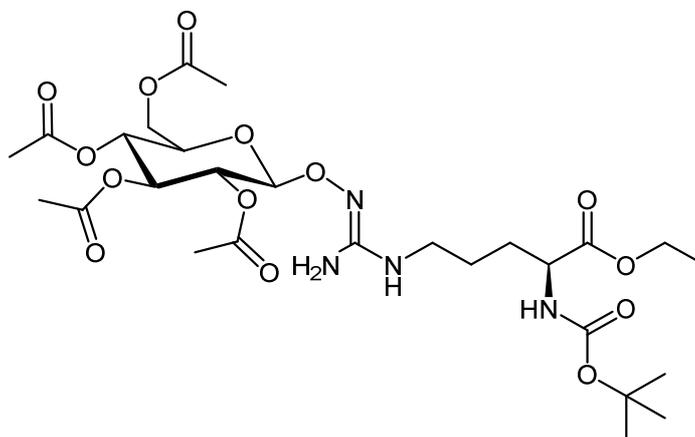
m/z = 677 [M + H]⁺.

HRMS (ESI) für C₂₉H₄₈N₄O₁₄:

m/z berechnet für [M + H]⁺ = 677.3239,

m/z gefunden für [M + H]⁺ = 677.3223.

N ^{α} -(tert-Butyloxycarbonyl)-N ^{ω} -(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranos-1-yloxy)-L-arginin-ethylester (90)



Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **89** bereits beschrieben sind, mit **88** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 239 mg, 0,33 mmol). Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol, 0-5 % über 30 Minuten).

Ausbeute: 180 mg (84 %) eines hellgelben Feststoffs

DC: R_f = 0,52 (Dichlormethan/Methanol, 9:1; Reagenz A und B)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 1.28 (t, ³J = 7.2 Hz, 3 H, CH₂CH₃), 1.44 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.52-1.90 (m, 4 H, β , γ -CH₂), 2.01, 2.02, 2.06, 2.07 (4 \times s, 3 H, 4 \times COCH₃), 3.02-3.27 (m, 2 H, δ -CH₂), 3.55 (br s, 1 H, NH-CH₂), 3.77 (ddd, ³J = 10.2, 4.6, 2.4 Hz, 1 H, 5'-CH), 4.10-4.37 (m, 7 H, 6'-CH₂, α -CH, CH₂CH₃, NH₂), 4.90 (d, ³J = 8.4 Hz, 1 H, 1'-CH), 5.02-5.29 (m, 4 H, 2', 3', 4'-CH, NH-Boc).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 14.2 (CH₂CH₃), 20.62, 20.65, 20.80, 20.90, (4 \times COCH₃), 25.6 (γ -CH₂), 28.3 (C(CH₃)₃), 30.6 (β -CH₂), 41.4 (δ -CH₂), 53.0 (α -CH), 61.5 (CH₂CH₃), 61.9 (6'-CH₂), 68.4, 70.4, 71.6, 73.0 (4', 2', 5', 3'-CH), 80.1

(C(CH₃)₃), 102.1 (1'-CH), 155.7 (C=N), 156.6 (CO-Boc), 169.5, 169.9, 170.2, 170.8 (4 × COCH₃), 172.6 (COEt).

MS (ESI):

$m/z = 671 [M + Na]^+$, $649 [M + H]^+$.

Elementaranalyse C₂₇H₄₄N₄O₁₄ (648.67):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 49.99 | H 6.84 | N 8.64, |
| gefunden: | C 49.81 | H 6.52 | N 8.87. |

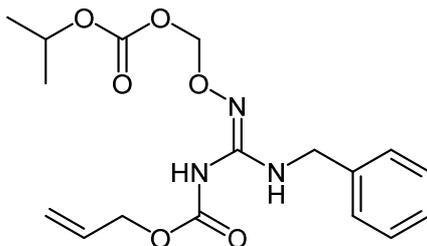
HRMS (ESI) für C₂₇H₄₄N₄O₁₄:

m/z berechnet für $[M + H]^+ = 649.2927$,

m/z gefunden für $[M + H]^+ = 649.2948$.

8.1.2.2.8 Vorstufen der N^ω-(Isopropoxycarbonyloxymethoxy)-L-arginin Prodrugs und analoge Modellverbindung

N-Benzyl-N'-allyloxycarbonyl-N''-(isopropoxycarbonyloxymethoxy)guanidin (99)



Es werden 270 mg (1,1 mmol) des Thioharnstoffs **66**, 200 mg (1,3 mmol) des frisch hergestellten Hydroxylamins **98** und 221 µL (1,3 mmol) DIPEA in 10 mL trockenem Dichlormethan gelöst und 30 Minuten bei 0 °C gerührt. Anschließend werden zu der Lösung 249 mg (1,3 mmol) EDCl gegeben und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wird mit 10 mL Dichlormethan verdünnt und jeweils mit 6 mL 1 %iger HCl, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-40 %).

Ausbeute: 213 mg (58 %) eines klaren und farblosen Öls

DC: $R_f = 0,76$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; Reagenz B, UV)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 1.31 (d, ³J = 6.3 Hz, 6 H, CH(CH₃)₂), 4.28 (d, ³J = 5.4 Hz, 2 H, CH₂-NH), 4.60 (ddd, ³J = 5.8, ⁴J = 1.6, 1.3 Hz, 2 H, CH₂=CH-CH₂), 4.90 (sep, ³J = 6.3 Hz, 1 H, CH(CH₃)₂), 5.27 (ddd, ²J = 2.3 Hz, ³J_{cis} = 10.4 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 1 H, CH₂=CH-CH₂), 5.34 (ddd, ²J = 3.2 Hz, ³J_{trans} = 17.2 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1 H, CH₂=CH-CH₂), 5.55 (s, 2 H, O-CH₂-O), 5.90 (ddt, ³J = 17.2, 10.4, 5.8 Hz, 1 H, CH=CH₂), 6.71 (br t, ³J = 5.4 Hz, NH-CH₂), 7.26-7.35 (m, 5 H, ArH), 7.83 (s, 1 H, NH).

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 21.8$ ($\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 45.1 ($\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 66.7 ($\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 72.4 ($\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$), 92.5 ($\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}$), 119.3 ($\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 127.5, 127.9, 128.7 (ArCH), 131.5 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$), 138.3 (ArC), 150.1 ($\text{C}=\text{N}$), 152. ($\text{C}=\text{O}-\text{Alloc}$), 154.2 (OCOO^iPr).

IR (ATR):

$\text{cm}^{-1} = 3381, 2964, 1741, 1721, 1647, 1544, 1258, 1221, 1103, 1047, 924, 829, 795.$

MS (ESI):

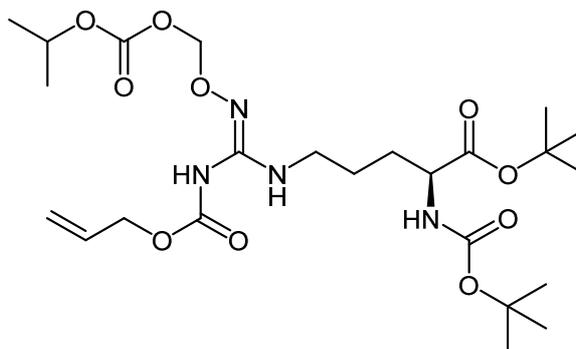
$m/z = 366$ [$M + \text{H}$] $^+$.

Elementaranalyse $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6$ (365.39):

Berechnet: C 55.88 H 6.35 N 11.50,

gefunden: C 55.77 H 6.91 N 11.27.

N^α -(*tert*-Butyloxycarbonyl)- N^ω -allyloxycarbonyl- $N^{\omega'}$ -(isopropoxycarbonyloxymethoxy)-L-arginin-*tert*-butylester (101)



Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **99** bereits beschrieben sind, mit **71** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 711 mg, 1,65 mmol). Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-50 %).

Ausbeute: 630 mg (70 %) eines klaren und farblosen Öls

DC: $R_f = 0,70$ (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; Reagenz A und B, UV)

 ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 1.30$ (d, $^3J = 6.3$ Hz, 6 H, $\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 1.44, 1.47 ($2 \times$ s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.57-1.99 (m, 4 H, β , γ - CH_2), 3.03-3.17 (m, 2 H, δ - CH_2), 4.18-4.25 (m, 1 H, α -CH), 4.60 (dt, $^3J = 5.6, 1.4$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 4.90 (sep, $^3J = 6.3$ Hz, 1 H, $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$), 5.10 (br d, $^3J = 8.2$ Hz, 1 H, NH-Boc), 5.27 (ddd, $^2J = 2.3$ Hz, $^3J_{cis} = 10.4$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, 1 H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 5.35 (ddd, $^2J = 3.2$ Hz, $^3J_{trans} = 17.2$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1 H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 5.52 (s, 2 H, $\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}$), 5.90 (ddt, $^3J = 17.2, 10.4, 5.7$ Hz, 1 H, $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$), 6.42 (br t, $^3J = 5.2$, 1 H, $\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 7.78 (br s, 1 H, NH).

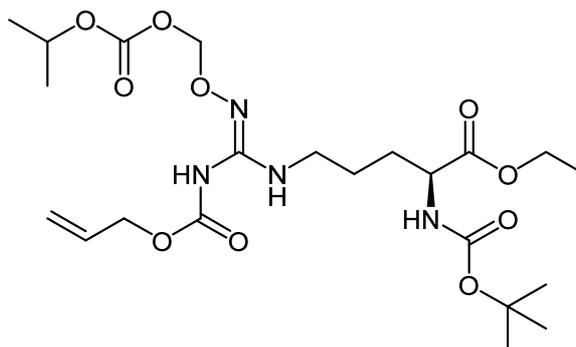
 ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 21.7$ ($\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 24.8 (γ - CH_2), 28.0, 28.3 ($2 \times$ $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 30.3 (β - CH_2), 40.5 (δ - CH_2), 53.7 (α -CH), 66.5 ($\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 72.2 ($\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$), 79.6, 81.9 ($2 \times$ $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 92.4 ($\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}$), 119.2 ($\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 131.4 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$), 150.2 ($\text{C}=\text{N}$), 152.7 ($\text{CO}-\text{Alloc}$), 154.1 (OCOO^iPr), 155.4 ($\text{CO}-\text{Boc}$), 171.8 (COO^tBu).

¹⁵N-NMR (30 MHz, CDCl₃):Ammoniak-Skala: δ /ppm = 62.4 (NH-CH₂), 85.9 (NH-Boc), 97.3 (NH-Alloc), 266.1 (N-O),Nitromethan-Skala: δ /ppm = -319.2 (NH-CH₂), -295.7 (NH-Boc), -284.3 (NH-Alloc), -115.5 (N-O).MS (ESI): m/z = 569 [$M + Na$]⁺, 547 [$M + H$]⁺.IR (ATR):cm⁻¹ = 3381, 2978, 2931, 1732, 1647, 1456, 1366, 1259, 1217, 1151, 1109, 1045, 926, 907, 829.Elementaranalyse C₂₄H₄₂N₄O₁₀ · 0.8 H₂O (561.03):

Berechnet: C 51.38 H 7.83 N 9.99,

gefunden: C 51.40 H 8.49 N 9.72.

***N*^α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*^ω-allyloxycarbonyl-*N*^{ω'}-(isopropoxycarbonyloxymethoxy)-L-arginin-ethylester (118)**

Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **99** bereits beschrieben sind, mit **80** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 829 mg, 2,06 mmol; 2 eq. **98**, DIPEA und EDCI). Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Cyclohexan/Ethylacetat, 0-45 %).

Ausbeute: 853 mg (80 %) eines klaren und farblosen Öls

DC: R_f = 0,63 (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1; Reagenz A und B, UV)¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 1.28 (t, ³ J = 7.2 Hz, 3 H, CH₂CH₃), 1.30 (d, ³ J = 6.3 Hz, 6 H, CH(CH₃)₂), 1.45 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.56-1.93 (m, 4 H, β , γ -CH₂), 3.06-3.17 (m, 2 H, δ -CH₂), 4.13-4.36 (m, 1 H, CH₂CH₃, α -CH), 4.60 (dt, ³ J = 5.6, 1.4 Hz, 2 H, CH₂=CH-CH₂), 4.90 (sep, ³ J = 6.3 Hz, 1 H, CH(CH₃)₂), 5.12 (br d, ³ J = 8.2 Hz, 1 H, NH-Boc), 5.27 (ddd, ² J = 2.3 Hz, ³ J_{cis} = 10.4 Hz, ⁴ J = 1.2 Hz, 1 H, CH₂=CH-CH₂), 5.35 (ddd, ² J = 3.2 Hz, ³ J_{trans} = 17.2 Hz, ⁴ J = 1.5 Hz, 1 H, CH₂=CH-CH₂), 5.52 (s, 2 H, O-CH₂-O), 5.90 (ddt, ³ J = 17.2, 10.4, 5.7 Hz, 1 H, CH=CH₂), 6.42 (br t, ³ J = 5.2, 1 H, NH-CH₂), 7.78 (br s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ /ppm = 14.2 (CH₂CH₃), 21.7 (CH(CH₃)₂), 24.9 (γ -CH₂), 28.3 (C(CH₃)₃), 30.1 (β -CH₂), 40.4 (δ -CH₂), 53.3 (α -

CH), 61.4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$), 66.6 ($\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 72.2 ($\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$), 79.6 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 92.4 ($\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}$), 119.2 ($\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 131.4 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$), 150.2 ($\text{C}=\text{N}$), 152.7 ($\text{CO}-\text{Alloc}$), 154.1 (OCOO^iPr), 155.4 ($\text{CO}-\text{Boc}$), 172.6 (COOEt).

MS (ESI):

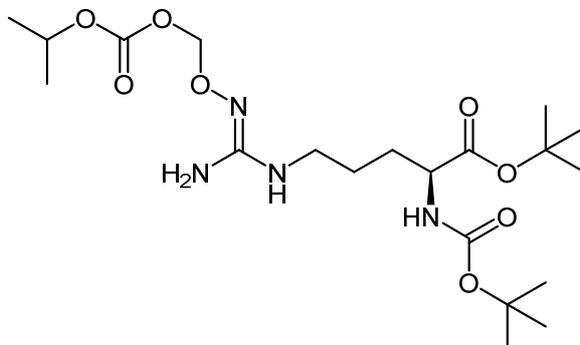
$m/z = 541 [M + \text{Na}]^+$, $519 [M + \text{H}]^+$.

IR (ATR):

$\text{cm}^{-1} = 3388, 2980, 2938, 1732, 1713, 1647, 1514, 1466, 1368, 1259, 1217, 1159, 1045, 926, 906, 829$.

Elementaranalyse $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_{10}$ (518.56):

| | | | |
|------------|---------|--------|----------|
| Berechnet: | C 50.96 | H 7.39 | N 10.80, |
| gefunden: | C 50.94 | H 7.54 | N 10.13. |

***N*^α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*^ω-(isopropoxycarbonyloxymethoxy)-L-arginin-*tert*-butylester (102)**

Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **89** bereits beschrieben sind, mit **101** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 488 mg, 0,89 mmol). Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol, 0-5 % über 30 Minuten).

Ausbeute: 391 mg (95 %) eines hellgelben Feststoffs

DC: $R_f = 0,39$ (Dichlormethan/Methanol, 95:5; Reagenz A)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 1.30 (d, ³*J* = 6.3 Hz, 6 H, CH(CH₃)₂), 1.44, 1.46 (2 × s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.52-1.81 (m, 4 H, β, γ-CH₂), 2.98-3.14 (m, 2 H, δ-CH₂), 3.77 (br s, 1 H, NH), 4.05-4.23 (m, 1 H, α-CH), 4.41 (br s, 1 H, NH), 4.89 (sep, ³*J* = 6.3 Hz, 1 H, CH(CH₃)₂), 5.15 (br d, ³*J* = 8.2 Hz, 1 H, NH-Boc), 5.52 (s, 2 H, O-CH₂-O).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 21.7 (CH(CH₃)₂), 25.3 (γ-CH₂), 28.0, 28.3 (2 × C(CH₃)₃), 30.6 (β-CH₂), 41.2 (δ-CH₂), 53.5 (α-CH), 71.9 (CH(CH₃)₂), 79.8, 82.0 (2 × C(CH₃)₃), 92.8 (O-CH₂-O), 154.2 (OCOO^tPr), 155.6 (CO-Boc), 171.8 (COO^tBu). Das Signal des Guanidinkohlenstoffs ist aufgrund der geringen Probenmenge nicht sichtbar.

MS (ESI):

$m/z = 463 [M + H]^+$, 433 [$M - 2 \times CH_3$]⁺.

HRMS (ESI) für C₂₀H₃₈N₄O₈:

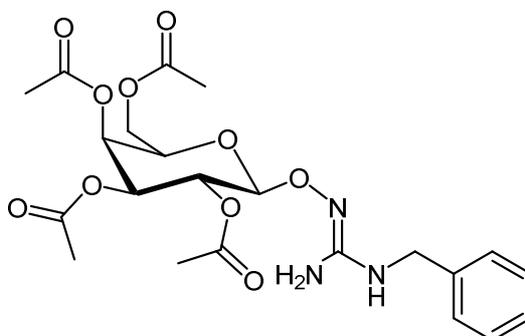
m/z berechnet für [$M + H$]⁺ = 463.2762,

m/z gefunden für [$M + H$]⁺ = 463.2778.

8.1.2.2.9 *N*^ω-(β-D-Galactosyloxy)-L-arginin Prodrugs und analoge Modellverbindungen

N-Benzyl-*N'*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)guanidin (**54**)

Synthesevorschrift in Anlehnung an KUNZ und UNVERZAGT:¹⁹⁹



Eine Lösung aus 150 mg (0,26 mmol) der geschützten Modellverbindung **67**, 294 mg (2,10 mmol, 8 eq.) Dimedon **59** und 35 mg (0,03 mmol, 10 Mol-%) Pd(0)[Ph₃P]₄ in 10 mL Tetrahydrofuran wird eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wird anschließend im Vakuum bis zur Trockne einkonzentriert und der gelbe Rückstand in 15 mL Ethylacetat aufgenommen. Die Suspension wird mit jeweils 6 mL 3 %iger_(aq) Ammoniaklösung, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels erfolgt die Aufreinigung mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol, 0-10 % über 20 Minuten).

Ausbeute: 75 mg (58 %) eines hellgelben Feststoffs

Schmelzpunkt: 74 °C

DC: $R_f = 0,53$ (Dichlormethan/Methanol, 95:5; Reagenz B, UV)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 2.00, 2.03, 2.07, 2.15 (4 × s, 3 H, 4 × COCH₃), 3.32 (br s, 1 H, NH), 3.62 (br t, 1 H, NH-CH₂), 3.99 (td, ³J = 6.9, 1.1 Hz, 1 H, 5'-CH), 4.16-4.36 (m, 5 H, 6'-CH₂, CH₂-Ph, NH), 4.91 (d, ³J = 8.3 Hz, 1 H, 1'-CH), 5.08 (dd, ³J = 10.6, 3.4 Hz, 1 H, 3'-CH₂), 5.23-5.32 (m, 1 H, 2'-CH), 5.41 (dd, ³J = 3.5, 1.0 Hz, 1 H, 4'-CH), 7.27-7.40 (m, 5 H, ArH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃):

δ /ppm = 20.6, 20.7, 21.0, (4 × COCH₃), 45.5 (NH-CH₂), 61.1 (6'-CH₂), 67.0, 68.1, 70.5, 71.0 (4', 2', 5', 3'-CH), 102.5 (1'-CH), 127.5, 127.7, 128.7 (ArCH), 138.9 (ArC), 156.4 (C=N), 170.1, 170.3, 170.4 (4 × COCH₃).

IR (ATR):

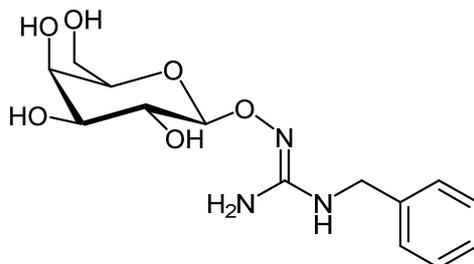
cm⁻¹ = 1743, 1645, 1368, 1213, 1166, 1053, 955, 903.

MS (ESI):

$m/z = 518 [M + Na]^+$, $496 [M + H]^+$.

Elementaranalyse $C_{22}H_{29}N_3O_{10} \cdot 0.1 H_2O$ (497.29):

| | | | |
|------------|---------|--------|---------|
| Berechnet: | C 53.14 | H 5.92 | N 8.45, |
| gefunden: | C 53.18 | H 6.36 | N 7.86. |

***N*-Benzyl-*N'*-(β -D-galactopyranos-1-yloxy)guanidin (**52**)**Methode A:

Es werden 178 mg (0,31 mmol) der geschützten Modellverbindung **51** in einem Lösungsmittelgemisch aus 6 mL Tetrahydrofuran und 3 mL Methanol gelöst. Zu dieser Lösung werden 4 mL einer 2 M LiOH-Lösung gegeben und 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird unter Eiskühlung mit verdünnter HCl neutralisiert und im Vakuum einkonzentriert. Der weiße Rückstand wird in 3 mL *Aqua bidest.* aufgenommen und flashchromatografisch über eine RP-18-Säule aufgearbeitet (*Aqua bidest./Methanol*, Stufengradient: 0/30/50 % Methanol). Produktenthaltige Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Methode B:²⁷⁹

140 mg (2,6 mmol) NaOMe werden in 10 mL Methanol 30 Minuten bei 0 °C gerührt. Zu dieser Lösung werden 130 mg (0,26 mmol) der Verbindung **54** gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird mit verdünnter HCl neutralisiert und im Vakuum eingedunstet. Der weiße Rückstand wird in 2 mL *Aqua bidest.* aufgenommen und, wie unter Methode A beschrieben, aufgearbeitet.

Ausbeute: Es resultiert ein weißer Feststoff; Methode A: 85 mg (84 %); Methode B: 78 mg (92 %)

DC: $R_f = 0,17$ (Dichlormethan/Methanol, 4:1; Reagenz B, UV)

 1H -NMR (300 MHz, D_2O , TPS):

δ /ppm = 3.48-3.77 (m, 5 H, 6'-CH₂, 2', 3', 5'-CH), 3.85 (dd, $^3J = 3.3, 0.9$ Hz, 1 H, 4'-CH₂), 4.14 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, 1'-CH), 7.23-7.39 (m, 5 H, ArH).

 ^{13}C -NMR (75 MHz, D_2O , TPS):

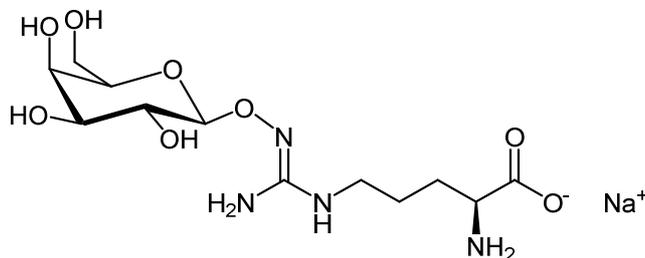
δ /ppm = 46.3 (NH-CH₂), 63.0 (6'-CH₂), 70.5, 71.4, 74.7, 76.9 (4', 2', 5', 3'-CH), 106.0 (1'-CH), 129.0, 129.8, 130.6 (ArCH), 140.6 (ArC), 161.4 (C=N).

MS (ESI):

$m/z = 350 [M + Na]^+$, $328 [M + H]^+$.

***N*^ω-(β-D-Galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin Natriumsalz (76)**

Synthesevorschrift in Anlehnung an AGOSTON *et al.*:²⁷⁹



54 mg (1 mmol) NaOMe werden in 10 mL Methanol 30 Minuten bei 0 °C gerührt. Zu dieser Lösung werden 100 mg (0,17 mmol) der peracetylierten Verbindung **75** zugegeben und weitere 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, wobei das Produkt **76** präzipitiert. Der Ansatz wird unter Eiskühlung mit verdünnter HCl neutralisiert und im Vakuum einkonzentriert. Der weiße Rückstand wird in 1-2 mL *Aqua bidest.* aufgenommen und über RP-18-Säulenchromatografie aufgereinigt (Eluent: *Aqua bidest.*, isokratisch). Ninhydrin-positive Fraktionen werden vereingigt und im Vakuum bei 30 °C auf ein Restvolumen von ca. 1 mL eingengt. Das restliche Wasser wird im Ölpumpenvakuum entfernt.

Ausbeute: 63 mg (quant.) eines weißen Pulvers

Schmelzpunkt: 139 °C

DC: $R_f = 0,35$ (*i*-Propanol/Wasser, 2:1; Reagenz A und B)

¹H-NMR (300 MHz, D₂O, TPS):

δ /ppm = 1.55-1.94 (m, 4 H, β , γ -CH₂), 3.23 (t, ³*J* = 6.8 Hz, 2 H, δ -CH₂), 3.60-3.81 (m, 6 H, 2', 3', 5'-CH, 6'-CH₂, α -CH), 3.91 (d, ³*J* = 2.4 Hz, 1 H, 4'-CH), 4.66 (d, ³*J* = 7.0 Hz, 1 H, 1'-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O, TPS):

δ /ppm = 25.8 (γ -CH₂), 29.4 (β -CH₂), 42.3 (δ -CH₂), 56.2 (α -CH), 63.0 (6'-CH₂), 70.3, 71.0, 74.5, 77.2 (4',2',5',3'-CH), 107.3 (1'-CH), 160.9 (C=N), 176.3 (COOH).

IR (ATR):

cm^{-1} = 3250 (breit), 1585 (v as COO⁻), 1454, 1408 (v s COO⁻), 1346, 1261, 1141, 1071, 1018, 947, 667.

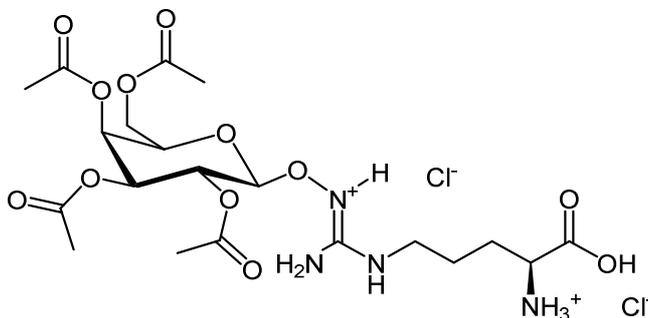
MS (ESI):

m/z = 375 [*M* + Na]⁺, 353 [*M* + H]⁺, 191 [C₆H₁₄N₄O₃ + H]⁺.

HRMS (ESI) für C₁₂H₂₄N₄O₈:

m/z berechnet für [*M* + H]⁺ = 353.1667,

m/z gefunden für [*M* + H]⁺ = 353.1669.

***N*^ω-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin Dihydrochlorid (75)**

In einem Dreihalskolben werden 1,23 g (1,82 mmol) der gut getrockneten Verbindung **73** in 30 mL absolutem Diethylether unter Argon-Atmosphäre gelöst und 30 Minuten bei $-5-0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend wird für 20 Minuten vorsichtig trockener Chlorwasserstoff in die Lösung geleitet und weitere zwei Stunden bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt, wobei das Produkt **75** als feiner weißer Niederschlag präzipitiert. Der Ansatz wird für 24 Stunden bei $4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der mit Chlorwasserstoff gesättigte Diethylether wird vorsichtig im Vakuum abgezogen und das resultierende Rohprodukt weitere drei Stunden im Ölpumpenvakuum getrocknet. Der gelbliche Rückstand wird in 30 mL Methanol aufgenommen, unter Eiskühlung mit Kieselgel versetzt und im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol, 0-20 %).

Ausbeute: 926 mg (86 %) eines weißen, stark hygroskopischen Pulvers

Schmelzpunkt: $151\text{ }^{\circ}\text{C}$

DC: $R_f = 0,65$ (Dichlormethan/Methanol, 1:1; Reagenz A und B)

 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O , TPS):

$\delta/\text{ppm} = 1.54-1.98$ (m, 4 H, $\beta,\gamma\text{-CH}_2$), 1.99, 2.06, 2.11, 2.20 ($4 \times s$, 3 H, $4 \times \text{COCH}_3$), 3.30 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2 H, $\delta\text{-CH}_2$), 3.95 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 1 H, $5'\text{-CH}$), 4.16-4.31 (m, 3 H, $6'\text{-CH}_2$, $\alpha\text{-CH}$), 5.17 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, $1'\text{-CH}$), 5.26 (dd, $^3J = 10.0$, 3.2 Hz, 1 H, $3'\text{-CH}_2$), 5.34 (dd, $^3J = 10.1$, 7.9 Hz, 1 H, $2'\text{-CH}_2$), 5.47 (d, $^3J = 3.1$ Hz, 1 H, $4'\text{-CH}_2$).

 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O , TPS):

$\delta/\text{ppm} = 21.8, 22.0, 22.1$, ($4 \times \text{COCH}_3$), 25.5 ($\gamma\text{-CH}_2$), 29.0 ($\beta\text{-CH}_2$), 42.6 ($\delta\text{-CH}_2$), 55.0 ($\alpha\text{-CH}$), 63.7 ($6'\text{-CH}_2$), 68.5, 69.7, 73.1, 73.2 ($4',2',5',3'\text{-CH}$), 104.5 ($1'\text{-CH}$), 160.1 (C=N), 174.4, 174.5, 174.8, 174.9 ($4 \times \text{COCH}_3$), 175.3 (COOH).

 $^{35}\text{Cl-NMR}$ für $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_{12}$ (29 MHz, D_2O , NaCl):

Berechnet: Cl 11.41,
gefunden: Cl 10.88 (95 %).

IR (ATR):

$\text{cm}^{-1} = 3224$ (breit), 1740, 1651, 1634, 1433, 1368, 1167, 1123, 1057, 955, 910.

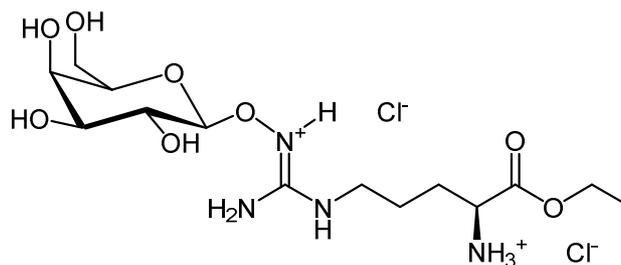
MS (ESI):

$m/z = 521 [M + H]^+$, $479 [M - C_2H_2O + H]^+$, $331 [C_{14}H_{19}O_9]^+$, $191 [C_6H_{14}N_4O_3 + H]^+$.

HRMS (ESI) für $C_{20}H_{32}N_4O_{12}$:

m/z berechnet für $[M + H]^+ = 521.2089$,

m/z gefunden für $[M + H]^+ = 521.2078$.

 N^{ω} -(β -D-Galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin-ethylester Dihydrochlorid (74**)**Methode A:

In einem Dreihalskolben werden 155 mg (0,23 mmol) der gut getrockneten Verbindung **73** in 20 mL trockenem Ethanol unter Argon-Atmosphäre gelöst und 30 Minuten bei $-5-0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Anschließend wird für 20 Minuten vorsichtig trockener Chlorwasserstoff in die Lösung geleitet und weitere vier Stunden bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt, wobei das Produkt **74** als feiner weißer Niederschlag präzipitiert. Der mit Chlorwasserstoff gesättigte Ethanol wird vorsichtig im Vakuum abgezogen und der resultierende Feststoff weitere drei Stunden im Ölpumpenvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in 1-2 mL *Aqua bidest.* aufgenommen und über RP-18-Säulenchromatografie aufgereinigt (Eluent: *Aqua bidest.*, isokratisch). Produkthaltige Fraktionen werden vereinigt und im Vakuum bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf ein Restvolumen von ca. 1 mL eingengt. Das restliche Wasser wird im Ölpumpenvakuum entfernt.

Methode B:

In einem Rundkolben werden 6 mL trockener Ethanol unter Argon-Atmosphäre und Eiskühlung vorgelegt und 2 mL (28 mmol) Acetylchlorid zugegeben. Diese Lösung wird 15 Minuten bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und anschließend werden 200 mg (0,3 mmol) der gut getrockneten Verbindung **73** zugegeben. Der Reaktionsansatz wird 48 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Die weitere Aufreinigung erfolgt analog zu Methode A.

Ausbeute: Es resultiert ein feines, weißes, stark hygroskopisches Pulver; Methode A: 100 mg (96 %);
Methode B: 111 mg (82 %)

Schmelzpunkt: $99\text{ }^{\circ}\text{C}$

DC: $R_f = 0,30$ (*i*-Propanol/Wasser, 2:1; Reagenz A und B)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O , TPS):

$\delta/\text{ppm} = 1.26$ (t, $^3J = 7.2$ Hz, 3 H, CH_2CH_3), 1.60-2.08 (m, 4 H, β , γ - CH_2), 3.31 (t, $^3J = 6.7$ Hz, 2 H, δ - CH_2), 3.63-3.79 (m, 5 H, 2',4', 5'-CH, 6'- CH_2), 3.91 (d, $^3J = 1.7$ Hz, 1 H, 3'-CH), 4.13 (t, $^3J = 6.4$ Hz, 1 H, α -CH), 4.28 (q, $^3J = 7.2$ Hz, 2 H, CH_2CH_3), 4.69 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 1 H, 1'- CH_2).

 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, D_2O , TPS):

$\delta/\text{ppm} = 15.1$ (CH_2CH_3), 25.4 (γ - CH_2), 28.7 (β - CH_2), 42.4 (δ - CH_2), 54.3 (α -CH), 62.8 (6'- CH_2), 65.5 (CH_2CH_3), 70.2, 70.6, 74.4, 77.5 (4',2',5',3'-CH), 108.4 (1'-CH), 158.5 (C=N), 171.7 (COOEt).

IR (ATR):

$\text{cm}^{-1} = 3200$ (breit), 2936, 1738, 1667, 1639, 1472, 1381, 1227, 1140, 1057, 1016, 858, 779.

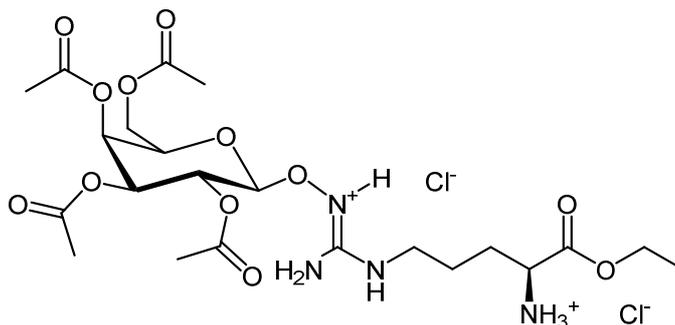
MS (ESI):

$m/z = 381$ [$M + \text{H}$] $^+$, 353 [$M - \text{C}_2\text{H}_4 + \text{H}$] $^+$, 219 [$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3 + \text{H}$] $^+$, 191 [$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3 + \text{H}$] $^+$.

HRMS (ESI) für $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_8$:

m/z berechnet für [$M + \text{H}$] $^+ = 381.1980$,

m/z gefunden für [$M + \text{H}$] $^+ = 381.1980$.

 N^w -(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-galactopyranos-1-yloxy)-L-arginin-ethylester Dihydrochlorid (83**)**

Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **75** bereits beschrieben sind, mit **82** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 356 mg, 0,55 mmol). Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol, 0-20 %).

Ausbeute: 206 mg (60 %) eines weißen, stark hygroskopischen Pulvers

Schmelzpunkt: 88 °C

DC: $R_f = 0,76$ (Dichlormethan/Methanol, 2:1; Reagenz A und B)

 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O , TPS):

$\delta/\text{ppm} = 1.27$ (t, $^3J = 7.2$ Hz, 3 H, CH_2CH_3), 1.56-1.86 (m, 2 H, γ - CH_2), 1.90-2.04 (m, 2 H, β - CH_2), 1.99, 2.06, 2.11, 2.20 ($4 \times s$, 3 H, $4 \times \text{COCH}_3$), 3.26 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 2 H, δ - CH_2), 4.14 (t, $^3J = 6.2$ Hz, 1 H, 5'-CH), 4.19-4.34 (m, 5 H, 6'- CH_2 , α -CH, CH_2CH_3), 5.15 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, 1'-CH), 5.25 (dd, $^3J = 10.2, 3.2$ Hz, 1 H, 3'- CH_2), 5.34 (dd, $^3J = 10.2, 7.8$ Hz, 1 H, 2'- CH_2), 5.47 (d, $^3J = 3.2$ Hz, 1 H, 4'- CH_2).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O, TPS):

$\delta/\text{ppm} = 15.1 (\text{CH}_2\text{CH}_3), 21.82, 21.83, 22.00, 22.10, (4 \times \text{COCH}_3), 25.5 (\gamma\text{-CH}_2), 28.8 (\beta\text{-CH}_2), 42.3 (\delta\text{-CH}_2), 54.3 (\alpha\text{-CH}), 63.4 (6'\text{-CH}_2), 65.5 (\text{CH}_2\text{CH}_3), 68.6, 69.7, 73.08, 73.11 (4',2',5',3'\text{-CH}), 104.3 (1'\text{-CH}), 160.9 (\text{C=N}), 171.6 (\text{COOEt}), 174.4, 174.8, 174.9, 175.3 (4 \times \text{COCH}_3).$

IR (ATR):

$\text{cm}^{-1} = 3400 (\text{breit}), 2950, 1740, 1670, 1369, 1213, 1167, 1121, 1057, 955, 908, 858.$

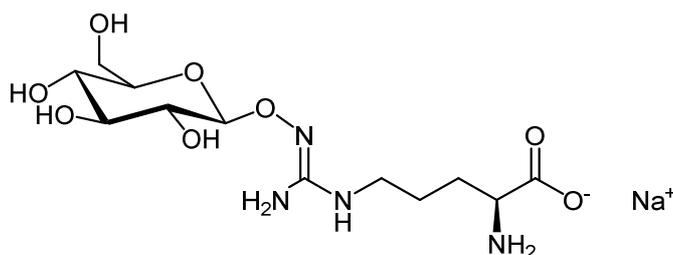
MS (ESI):

$m/z = 549 [M + H]^+, 507 [M - \text{C}_2\text{H}_2\text{O} + H]^+, 331 [\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_9]^+, 219 [\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3]^+.$

HRMS (ESI) für C₂₂H₃₆N₄O₁₂:

m/z berechnet für $[M + H]^+ = 549.2403,$

m/z gefunden für $[M + H]^+ = 549.2398.$

8.1.2.2.10 N^ω-(β-D-Glucosyloxy)-L-arginin Prodrugs**N^ω-(β-D-Glucopyranos-1-yloxy)-L-arginin Natriumsalz (94)**

Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **76** bereits beschrieben sind, mit **92** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 140 mg, 0,24 mmol). Die Aufreinigung erfolgt mittels RP-18-Säulenchromatografie (Eluent: *Aqua bidest.*, isokratisch).

Ausbeute: 81 mg (90 %) eines weißen Pulvers

Schmelzpunkt: 157 °C

DC: $R_f = 0,41$ (*i*-Propanol/Wasser, 2:1; Reagenz A und B)

¹H-NMR (300 MHz, D₂O, TPS):

$\delta/\text{ppm} = 1.55\text{-}1.81 (\text{m}, 2 \text{ H}, \gamma\text{-CH}_2), 1.82\text{-}1.96 (\text{m}, 2 \text{ H}, \beta\text{-CH}_2), 3.28 (\text{t}, {}^3J = 6.7 \text{ Hz}, 2 \text{ H}, \delta\text{-CH}_2), 3.37\text{-}3.55 (\text{m}, 4 \text{ H}, 2', 3', 4', 5'\text{-CH}), 3.68\text{-}3.76 (\text{m}, 2 \text{ H}, 6'\text{-a-CH}_2, \alpha\text{-CH}), 3.89 (\text{pseudo d}, {}^2J = 12.3 \text{ Hz}, 1 \text{ H}, 6'\text{-b-CH}_2), 4.74 (\text{d}, {}^3J = 7.9 \text{ Hz}, 1 \text{ H}, 1'\text{-CH}_2).$

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O, TPS):

$\delta/\text{ppm} = 25.6 (\gamma\text{-CH}_2), 29.4 (\beta\text{-CH}_2), 42.6 (\delta\text{-CH}_2), 56.2 (\alpha\text{-CH}), 62.3 (6'\text{-CH}_2), 70.9, 73.0, 77.5, 78.1 (4',2',5',3'\text{-CH}), 107.6 (1'\text{-CH}), 160.5 (\text{C=N}), 176.2 (\text{COOH}).$

IR (ATR):

$\text{cm}^{-1} = 3200 (\text{breit}), 1582 (\nu \text{ as COO}^-), 1454, 1408 (\nu \text{ s COO}^-), 1346, 1070, 1018, 989, 895.$

MS (ESI):

$m/z = 375 [M + Na]^+$, $353 [M + H]^+$, $191 [C_6H_{14}N_4O_3 + H]^+$.

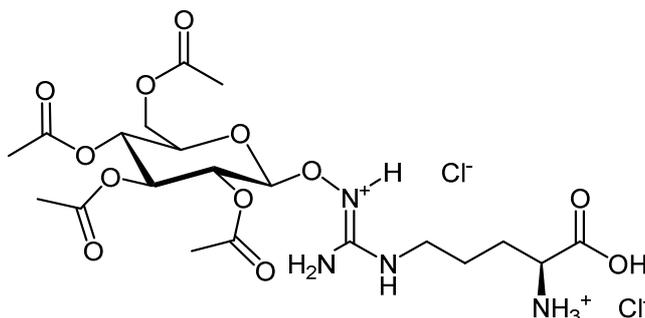
HRMS (ESI) für $C_{12}H_{24}N_4O_8$:

m/z berechnet für $[M + H]^+ = 353.1667$,

m/z gefunden für $[M + H]^+ = 353.1667$.

m/z berechnet für $[M + Na]^+ = 375.1486$,

m/z gefunden für $[M + Na]^+ = 375.1491$.

 N^w -(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranos-1-yloxy)-L-arginin Dihydrochlorid (92)

Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **75** bereits beschrieben sind, mit **89** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 582 mg, 0,86 mmol). Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol, 0-20 %).

Ausbeute: 491 mg (97 %) eines weißen, kristallinen Pulvers

Schmelzpunkt: 130 °C

DC: $R_f = 0,45$ (Dichlormethan/Methanol, 1:1; Reagenz A und B)

 1H -NMR (300 MHz, D_2O , TPS):

$\delta/ppm = 1.59-1.82$ (m, 2 H, γ -CH₂), $1.83-1.99$ (m, 2 H, β -CH₂), $2.02, 2.05, 2.08$ ($4 \times s$, 3 H, $4 \times COCH_3$), 3.28 (t, $^3J = 6.7$ Hz, 2 H, δ -CH₂), 3.98 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 1 H, α -CH), 4.07 (ddd, $^3J = 10.3, 4.6, 2.5$ Hz, 1 H, 5'-CH), 4.25 (dd, $^2J = 12.8, ^3J = 2.5$ Hz, 1 H, 6'a-CH₂), 4.32 (dd, $^2J = 12.8, ^3J = 4.1$ Hz, 1 H, 6'b-CH₂), $5.04-5.25$ (m, 3 H, 1', 2', 4'-CH), 5.26 (pseudo t, $^3J = 8.9$ Hz, 1 H, 3'-CH₂).

 ^{13}C -NMR (75 MHz, D_2O , TPS):

$\delta/ppm = 21.88, 21.89, 21.90, 21.98$ ($4 \times COCH_3$), 25.4 (γ -CH₂), 28.9 (β -CH₂), 42.5 (δ -CH₂), 54.7 (α -CH), 63.5 (6'-CH₂), $69.8, 70.6, 73.6, 74.9$ (4', 2', 5', 3'-CH), 104.1 (1'-CH), 160.8 (C=N), $174.1, 174.4, 174.6, 174.9$ ($4 \times COCH_3$), 175.4 (COOH).

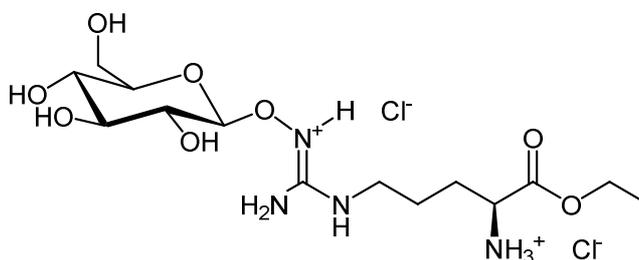
MS (ESI):

$m/z = 521 [M + H]^+$, $479 [M - C_2H_2O + H]^+$, $331 [C_{14}H_{19}O_9]^+$, $191 [C_6H_{14}N_4O_3 + H]^+$.

HRMS (ESI) für $C_{20}H_{32}N_4O_{12}$:

m/z berechnet für $[M + H]^+ = 521.2090$,

m/z gefunden für $[M + H]^+ = 521.2088$.

***N*^ω-(β-D-Glucopyranos-1-yloxy)-L-arginin-ethylester Dihydrochlorid (91)**

Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **74** Methode B bereits beschrieben sind, mit **89** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 300 mg, 0,44 mmol). Die Aufreinigung erfolgt mittels RP-18-Säulenchromatografie (Eluent: *Aqua bidest.*, isokratisch).

Ausbeute: 185 mg (93 %) eines weißen, stark hygroskopischen Pulvers

Schmelzpunkt: 86 °C

DC: $R_f = 0,31$ (*i*-Propanol/Wasser, 2:1; Reagenz A und B)

¹H-NMR (300 MHz, D₂O, TPS):

δ /ppm = 1.29 (t, ³J = 7.2 Hz, 3 H, CH₂CH₃), 1.62-1.89 (m, 2 H, γ -CH₂), 1.90-2.08 (m, 2 H, β -CH₂), 3.26-3.37 (m, 2 H, δ -CH₂), 3.40-3.67 (m, 4 H, 2', 3', 4', 5'-CH), 3.75 (dd, ²J = 12.4, ³J = 5.1 Hz, 1 H, 6'a-CH₂), 3.90 (dd, ²J = 12.8, ³J = 1.9 Hz, 1 H, 6'b-CH₂), 4.15 (t, ³J = 6.5 Hz, 1 H, α -CH), 4.30 (q, ³J = 7.2 Hz, 2 H, CH₂CH₃), 4.77 (d, ³J = 7.7 Hz, 1 H, 1'-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O, TPS):

δ /ppm = 15.1 (CH₂CH₃), 25.4 (γ -CH₂), 28.8 (β -CH₂), 42.4 (δ -CH₂), 54.4 (α -CH), 62.3 (6'-CH₂), 65.5 (CH₂CH₃), 70.9, 72.9, 77.4, 78.2 (4', 2', 5', 3'-CH), 107.9 (1'-CH), 160.4 (C=N), 171.7 (COOEt).

³⁵Cl-NMR für C₁₄H₃₀Cl₂N₄O₈ (29 MHz, D₂O, NaCl):

Berechnet: Cl 15.64,

gefunden: Cl 13.25 (85 %).

IR (ATR):

cm⁻¹ = 3200 (breit), 1738, 1667, 1512, 1470, 1449, 1381, 1296, 1226, 1070, 1118, 856.

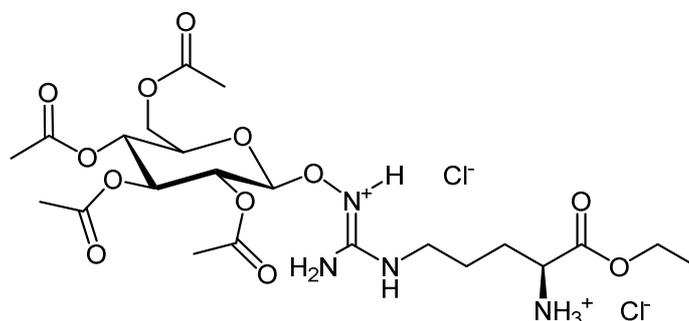
MS (ESI):

$m/z = 381 [M + H]^+$, $353 [M - C_2H_4 + H]^+$, $219 [C_8H_{18}N_4O_3 + H]^+$, $191 [C_6H_{14}N_4O_3 + H]^+$.

HRMS (ESI) für C₁₄H₂₈N₄O₈:

m/z berechnet für $[M + H]^+ = 381.1980$,

m/z gefunden für $[M + H]^+ = 381.1981$.

***N*^ω-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-β-D-glucopyranos-1-yloxy)-L-arginin-ethylester Dihydrochlorid (93)**

Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **75** bereits beschrieben sind, mit **90** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 256 mg, 0,4 mmol). Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol, 0-20 %).

Ausbeute: 182 mg (75 %) eines weißen, stark hygroskopischen Pulvers

Schmelzpunkt: 82 °C

DC: $R_f = 0,78$ (Dichlormethan/Methanol, 2:1; Reagenz A und B)

¹H-NMR (300 MHz, D₂O, TPS):

δ /ppm = 1.28 (t, ³J = 7.2 Hz, 3 H, CH₂CH₃), 1.58-1.86 (m, 2 H, γ-CH₂), 1.88-2.05 (m, 2 H, β-CH₂), 2.03, 2.07, 2.10 (4 × s, 3 H, 4 × COCH₃), 3.29 (t, ³J = 6.9 Hz, 2 H, δ-CH₂), 4.09 (ddd, ³J = 10.6, 4.2, 2.5 Hz, 1 H, 5'-CH), 4.14 (t, ³J = 6.2 Hz, 1 H, α-CH), 4.24-4.37 (m, 4 H, 6'-CH₂, CH₂CH₃), 5.12 (t, ³J = 9.6 Hz, 1 H, 4'-CH), 5.22 (dd, ³J = 16.4, 8.3 Hz, 1 H, 2'-CH₂), 5.23 (d, ³J = 8.3 Hz, 1 H, 1'-CH), 5.39 (t, ³J = 8.5 Hz, 1 H, 3'-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O, TPS):

δ /ppm = 15.1 (CH₂CH₃), 21.88, 21.89, 21.99, 22.00 (4 × COCH₃), 25.4 (γ-CH₂), 28.7 (β-CH₂), 42.4 (δ-CH₂), 54.3 (α-CH), 63.6 (6'-CH₂), 65.5 (CH₂CH₃), 69.8, 70.5, 73.6, 74.9 (4', 2', 5', 3'-CH), 103.9 (1'-CH), 160.8 (C=N), 171.6 (COOEt), 174.4, 174.6, 174.8, 175.4 (4 × COCH₃).

IR (ATR):

cm⁻¹ = 3400 (breit), 1740, 1670, 1368, 1211, 1148, 1069, 1034, 907, 856.

MS (ESI):

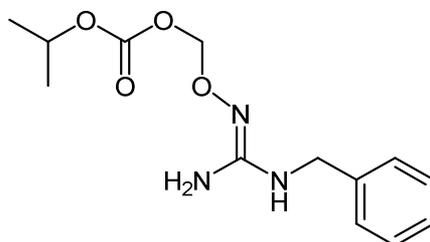
$m/z = 549 [M + H]^+$, 507 $[M - C_2H_2O + H]^+$, 331 $[C_{14}H_{19}O_9]^+$, 219 $[C_8H_{18}N_4O_3]^+$.

HRMS (ESI) für C₂₂H₃₆N₄O₁₂:

m/z berechnet für $[M + H]^+ = 549.2403$,

m/z gefunden für $[M + H]^+ = 549.2398$.

**8.1.2.2.11 *N*^ω-(Isopropoxycarbonyloxymethoxy)-L-arginin Prodrug und analoge Modellverbindung
N-Benzyl-*N'*-(isopropoxycarbonyloxymethoxy)guanidin (100)**



Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **54** bereits beschrieben sind, mit **99** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 137 mg, 0,38 mmol). Die Aufreinigung erfolgt mittels Flashchromatografie (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol, 0-5 % über 20 Minuten).

Ausbeute: 60 mg (56 %) eines klaren farblosen Öls

DC: $R_f = 0,30$ (Dichlormethan/Methanol, 95:5; Reagenz B, UV)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3):

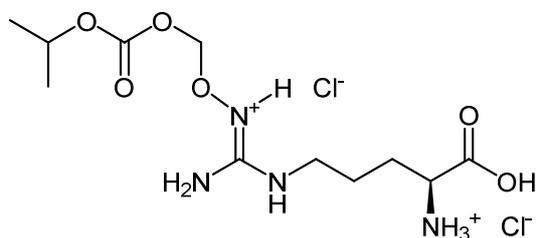
$\delta/\text{ppm} = 1.31$ (d, $^3J = 6.3$ Hz, 6 H, $\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 3.31 (br s, 1 H, NH), 3.36 (t, $^3J = 5.5$ Hz, 1 H, $\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 4.22 (d, $^3J = 5.5$ Hz, 2 H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}$), 4.27 (br s, 1 H, NH), 4.90 (sep, $^3J = 6.3$ Hz, 1 H, $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{C}\text{H}_3)_2$), 5.56 (s, 2 H, O- CH_2 -O), 7.27-7.36 (m, 5 H, ArH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3):

$\delta/\text{ppm} = 21.8$ ($\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$), 46.1 ($\text{NH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 72.4 ($\underline{\text{C}}\text{H}(\text{C}\text{H}_3)_2$), 92.5 (O- CH_2 -O), 127.5, 127.8, 128.7 (ArCH), 138.8 (ArC), 154.2 (OCOO^iPr), 156.4 (C=N).

MS (ESI):

$m/z = 282$ [$M + \text{H}$]⁺, 148 [$M - \text{C}_4\text{H}_9\text{O}_4$]⁺.

***N*^ω-(Isopropoxycarbonyloxymethoxy)-L-arginin Dihydrochlorid(103)**

Die Darstellung und Aufarbeitung verläuft unter denselben Bedingungen, wie sie für die Verbindung **75** bereits beschrieben sind, mit **102** als Ausgangsverbindung (Ansatzgröße: 343 mg, 0,74 mmol). Die Aufreinigung erfolgt mittels RP-18-Säulenchromatografie (Eluent: *Aqua bidest.*, isokratisch).

Ausbeute: 211 mg (75 %) eines weißen, stark hygroskopischen Feststoffs

DC: $R_f = 0,42$ (*i*-Propanol/Wasser, 2:1; Reagenz A)

¹H-NMR (300 MHz, D₂O, TPS):

δ /ppm = 1.27 (d, ³J = 6.3 Hz, 6 H, CH(CH₃)₂), 1.63-2.03 (m, 4 H, β , γ -CH₂), 3.23-3.42 (m, 2 H, δ -CH₂), 3.92-4.03 (m, 1 H, α -CH), 4.90 (sep, ³J = 6.3 Hz, 1 H, CH(CH₃)₂), 5.47 (s, 2 H, O-CH₂-O).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O, TPS):

δ /ppm = 22.6 (CH(CH₃)₂), 25.4 (γ -CH₂), 28.8 (β -CH₂), 42.4 (δ -CH₂), 54.6 (α -CH), 76.7 (CH(CH₃)₂), 95.7 (O-CH₂-O), 154.1 (OCOOⁱPr), 160.3 (C=N).

³⁵Cl-NMR für C₁₁H₂₄Cl₂N₄O₆ (29 MHz, D₂O, NaCl):

Berechnet: Cl 18.70,

gefunden: Cl 18.43 (99 %).

IR (ATR):

cm⁻¹ = 2900 (breit), 1738, 1668, 1622, 1506, 1454, 1260, 1159, 1084, 949, 905, 831.

MS (ESI):

$m/z = 307$ [$M + H$]⁺, 203 [C₇H₁₅N₄O₃]⁺.

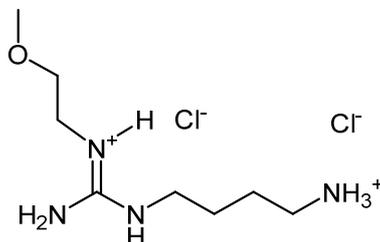
HRMS (ESI) für C₁₁H₂₂N₄O₆:

m/z berechnet für [$M + H$]⁺ = 307.1612,

m/z gefunden für [$M + H$]⁺ = 307.1611.

8.1.2.3 Synthese von *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin Dihydrochlorid (AbMEG)

N-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin Dihydrochlorid (10)



Es werden 2,5 g des Kationenaustauschers Amberlite IR 120 (H⁺-Form) dreimal mit 30 mL *Aqua bidest.* gewaschen und in eine Chromatographiesäule gefüllt. 250 mg (0,6 mmol) *N*-(4-Aminobutyl)-*N'*-(2-methoxyethyl)guanidin Bis(trifluoracetat) **9** werden in 1 mL *Aqua bidest.* gelöst und auf das Austauschermaterial aufgetragen. Der Austauscher wird solange mit *Aqua bidest.* gespült, bis der pH des Eluats neutral ist. Die weitere Elution erfolgt mit 3 N HCl. Ninhydrin-positive Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum bei 30 °C einkonzentriert. Das ölige Rohprodukt wird flashchromatografisch über eine RP-18-Säule aufgereinigt (Fließmittel: *Aqua bidest.*, isokratisch).

Ausbeute: 80 mg (52 %) eines klaren, farblosen Öls

DC: $R_f = 0,24$ (*i*-Propanol/Wasser/Eisessig, 6:3:1; Reagenz A)

¹H-NMR (300 MHz, D₂O, TPS):

δ /(ppm) = 1.59-2.77 (m, 4 H, β , γ -CH₂), 3.01 (t, ³J = 7.8 Hz, 2 H, α -CH₂), 3.23 (t, ³J = 6.6 Hz, 2 H, δ -CH₂), 3.38 (s, 3 H, O-CH₃), 3.39 (t, ³J = 5.0 Hz, 2 H, N^w-CH₂), 4.04 (t, ³J = 5.0 Hz, 2 H, O-CH₂).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O, TPS):

δ /ppm = 26.7 (β -CH₂), 27.8 (γ -CH₂), 41.8 (α -CH₂), 43.3, 43.8 (N-CH₂), 61.0 (O-CH₃), 73.1 (O-CH₂), 159.0 (C=N).

¹⁵N-NMR (30 MHz, DMSO-d₆):

Ammoniak-Skala: δ /ppm = 32.8 (NH₃⁺), 74.5 (NH₂), 78.9 (NH), 82.9 (NH⁺),

Nitromethan-Skala: δ /ppm = -348.8 (NH₃⁺), -307.1 (NH₂), -302.7 (NH), -298.7 (NH⁺).

³⁵Cl-NMR für C₈H₂₂Cl₂N₄O (29 MHz, D₂O, NaCl):

Berechnet: Cl 27.14,

gefunden: Cl 24.63 (91 %).

MS (ESI):

$m/z = 189 [M + H]^+$.

8.2 Bestimmung der Enantiomerenreinheit

8.2.1 HPLC mit chiraler mobiler Phase

8.2.1.1 Geräte und Materialien

HPLC-System:

Waters W600 quaternäre Niederdruckpumpe, Postnova PN 7505 Entgaser, Waters W474 Fluoreszenzdetektor, Waters W717plus Autosampler, EZChrom Datenaufnahme- und Datenauswertungssoftware.

Stationäre Phase:

VDS Optilab Nucleosil 100 C-18 (10 μm), 300 \times 4 mm.

Nachsäulenderivatisierung:

Waters W510 Pumpe, Reaktionsschleife: 2,5 m Teflonkapillare, ID = 0,2 mm.

Chemikalien:

Acetonitril und Methanol wurden in HPLC-Qualität von der Firma J. T. Baker, Griesheim, bezogen. *Aqua bidest.* (= doppelt destilliertes Wasser) stammte aus hausinterner Herstellung (Finnaqua 75-E-4). Sofern nicht anders angegeben, wurden alle weiteren Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich, Fluka, ABCR, Roth, Bachem und Alfa Aesar bezogen. Racemisches N^{δ} -Methylarginin wurde von der Arbeitsgruppe STEGLICH zur Verfügung gestellt.

8.2.1.2 Methoden

| | |
|----------------------------|---|
| Säulentemperatur: | 25 °C |
| Mobile Phase: | 17 mM L-Prolin, 8 mM Kupfer(II)-acetat in <i>Aqua bidest.</i> , pH 4,5 |
| Flussrate: | 0,5 mL/min |
| Nachsäulenderivatisierung: | 120 mg <i>o</i> -Phtaldialdehyd (angelöst in 2 mL Methanol), 0,3 mL 2-Mercaptoethanol und 3 mM EDTA in 600 mL Puffer (0,1 M H_3BO_3 , mit verdünnter NaOH-Lösung auf pH 9,25 eingestellt), Flussrate: 1,0 mL/ min |
| Detektion: | Fluoreszenzmessung bei λ_{ex} : 340 nm und λ_{em} : 455 nm |
| Proben: | 0,1-10 mM, angelöst im Fließmittel |
| Standards: | D- und L-Arginin 0,1-10 mM, racemisches N^{δ} -Methylarginin 0,1-10 mM, alle angelöst im Fließmittel |
| Injektionsvolumen: | 10 μL |
| Retentionszeiten: | D,L-Arginin 11,0 \pm 0,1 min (D); 12,4 \pm 0,1 min (L) N^{δ} -Methyl-D,L-arginin 10,7 \pm 0,2 min (D); 12,7 \pm 0,2 min (L). |

8.2.2 Polarimetrie

Alle Drehwerte wurden an einem Perkin Elmer 241 Polarimeter gemessen. Die Temperatur wurde über einen Lauda-Thermostat Typ K2-D konstant bei $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ gehalten. Die verwendete Quarzküvette hatte eine Schichtdicke von 10,002 cm und ein Messvolumen von 1 mL. Alle Drehwerte wurden bei 589 nm (Natrium-D-Linie) bestimmt. Die Proben wurden als 2 %ige Lösungen in *Aqua bidest.* vermessen.

8.3 Rekombinante Herstellung, Reinigung und (Co)Kristallisation der hDDAH-1

8.3.1 Geräte und Materialien

8.3.1.1 Geräte

Elektroblot:

Mini-Trans-Blot® Cell, Gene Pulser® II Electroporation System (Bio Rad Laboratories, München)

Entwicklermaschine:

Cawomat 2000 IR mit ABS-Kassette (Cawo Photochemisches Werk, Schrobenhausen)

Fermenter:

Sartorius Stedim Biotech BIOSTAT®A Plus 5 L Fermenter mit Thermostat, pH-Kontrolle und Luftzufuhr (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen)

Flachbett-Schüttler:

Bühler Schüttler KL2 (Edmund Bühler, Hechingen)

FPLC-System:

ÄKTA purifier mit Unicorn Software 5.11 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) und HiTrap®Q FF 5 mL IEX-columns (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)

Heizblock:

Techne Dri-Block DB-2D (Thermo-Dux, Wertheim)

Hochdruck-Homogenisator:

French Press Disrupter (FA078) mit Standard Zelle FA-032 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Inkubatoren:

Ecotron und Minitron (Brutschrank mit integriertem Schüttler)

PCR-Cycler:

Primus advanced HT2X Dualblock PCR-System mit HT Manager Software (Clemens, Waldbüttelbrunn)

Photometer:

Cary 50 UV-VIS Spektralphotometer mit Microplatten-Reader 50MPR, Cary Win UV Software Version 2.0 (Varian GmbH, München)

Schüttelwasserbad:

Wasserbad GFL® 1083 (GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)

SDS-PAGE:

Mini Protean® Tetra Cell System (Bio Rad Laboratories, München)

Sequenzierer:

LI-COR® DNA Sequencer Model 4200 (LI-COR Bioscience, Bad Homburg)

Spannungsquelle für Agarosegelelektrophorese:

Electrophoresis Power Supply EPS 300 (Pharmacia Biotech, Freiburg)

Zentrifugen:

Laborzentrifuge: Multifuge 1S-R, Rotoren 45002006 / 75002000 (Heraeus, Osterode)

Mikrozentrifuge: Biofuge pico (Heraeus, Osterode), Kühlzentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg)

Ultrazentrifuge: Optima® XL-80 K Ultrazentrifuge, Rotor 50.2 Ti, Fixed-Angle, Polycarbonat Ultrazentrifugen Röhrchen (Beckman Coulter, Palo Alto, USA)

8.3.1.2 Materialien**8.3.1.2.1 Enzyme, Kits und Chemikalien**

Alle verwendeten Chemikalien, Medien und Antikörper wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich, Carl Roth, Merck oder Fluka kommerziell bezogen.

Enzyme und Nucleotide:

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen, *Pfu*-Turbo DNA-Polymerase AD mit entsprechenden Reaktions-Puffern, *Pfu*-Puffer sowie die dNTPs wurden von den Firmen Fermentas (St. Leon Rot), Genaxxon Bioscience (Biberach) oder Stratagene (La Jolla, USA) bezogen.

DNA-Isolierung und -Sequenzierung:

Für die Plasmid-DNA-Isolierung wurde das Wizard® Plus SV-Minipreps DNA Purification System der Fa. Promega (Madison, USA) und zur DNA-Sequenzierung das GenomeLab DTCS Quick Start Kit der Fa. Beckman Coulter (Palo Alto, USA) verwendet.

Proteingehaltsbestimmung:

Die Proteingehaltsbestimmungen erfolgten mithilfe des Pierce BCA Protein Kit (Rockford, USA) oder mittels Bradford Bio Rad Protein Assay Kit (München).

Affinitätschromatografie:

Ni²⁺-NTA-Agarose für die Affinitätschromatografie wurde von der Fa. Quiagen (Hilden) bezogen.

Umpuffern:

Das Umpuffern erfolgte mittels Amicon Ultra 4 mL und 15 mL Filter-Tubes mit 10000 MWCO (Merck, Darmstadt).

SDS-PAGE:

Für die SDS-PAGE wurden der Mark12 Unstained Standard der Fa. Thermo Fisher Scientific oder der PageRuler® Prestained Protein Ladder der Fa. Fermentas eingesetzt. Das Anfärben der SDS-Gele erfolgte mittels Brilliant Blau G 250 (Carl Roth, Karlsruhe) oder PlusOne Silver Staining Kit Protein (GE Healthcare, München).

Western Blot:

Die Western-Blots erfolgten auf Hybond P PVDF-Membranen (0,2 µM Porenweite) zwischen Whatman 3MM CHR Chromatography Paper (Whatman International Ltd., Maidstone, England). Als Primärantikörper wurde hauptsächlich der Anti-DDAH1 Antikörper (in Kaninchen hergestellt) und als Sekundärantikörper der Goat Anti-Rabbit IgG-Antikörper (beide Fa. Sigma Aldrich, Taufkirchen) eingesetzt. Die Detektion der Western-Blots erfolgte mit Hilfe des ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare, München).

Kristallisation und Cokristallisation:

Alle Kristallisations- und Cokristallisationsscreenings erfolgten auf JCSG Core I-IV Suites der Firma Quiagen (Hilden).

8.3.1.2.2 Oligonukleotide

Alle Sequenzier-Primer und Mutagenese-Primer stammten aus hauseigener Synthese durch den Arbeitskreis von Prof. Dr. Beitz. Die Reinheit der Primer wurde über HPLC bestimmt.

Sequenzier-Primer:

| Name | Sinn | Sequenz | Plasmid |
|------------------------|------|------------------------------|---------------|
| fwSequDDAH-1pQE30G129T | s | GTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTC | pQE30_hDDAH-1 |
| fwSequDDAH-1pQE30G129T | s | CCGTGGTGCGGGCGCTAC | pQE30_hDDAH-1 |
| rSequDDAH-1pQE30G129T | as | CAAGCTAGCTTGGATTCTCACCAA | pQE30_hDDAH-1 |
| fwpQE30 | s | CGGATAACAATTTACACAG | pQE30 |
| rpQE30 | as | GTTCTGAGGTCATTACTGG | pQE30 |

Mutagenese-Primer:

Die mutierten Basen sind fett gedruckt.

| Name | Sinn | Sequenz | Plasmid |
|--------------------|------|--|---------------------|
| fwDDAH-1pQE30G129T | s | AAAGATGAAAATGCAACTTTAGATGG CACG GATGTTTTATTACAGGCAGAGAATTT | pQE30_hDDAH-1_G129T |
| rDDAH-1pQE30G129T | as | AAATTCTCTGCCTGTGAATAAAACATCC GTGCC CATCTAAAGTTGCATTTTCATCTTT | pQE30_hDDAH-1_G129T |

8.3.1.2.3 Plasmide

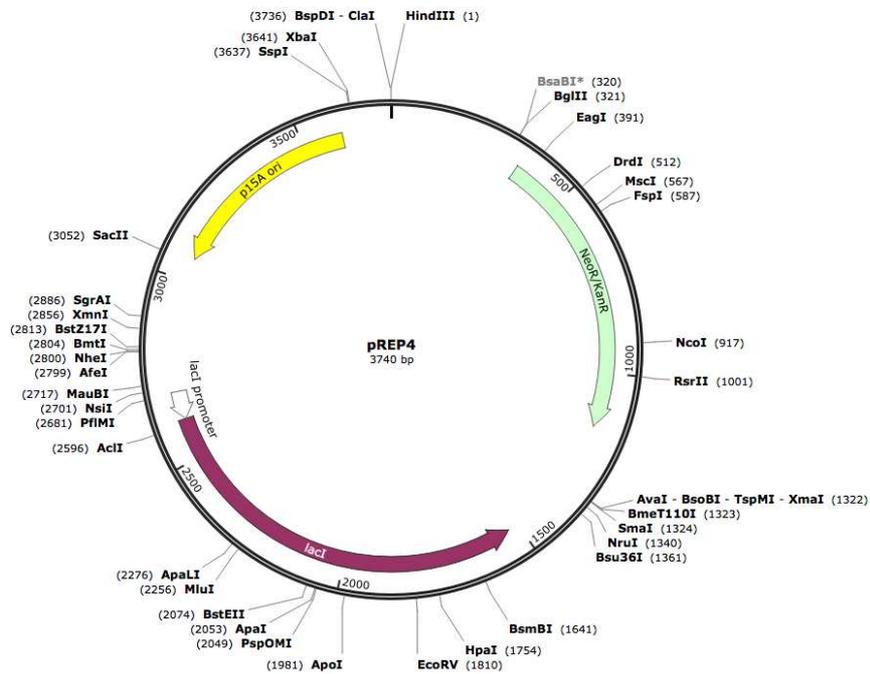


Abbildung 8-1: Vektorkarte des pREP4 (3740 bp).

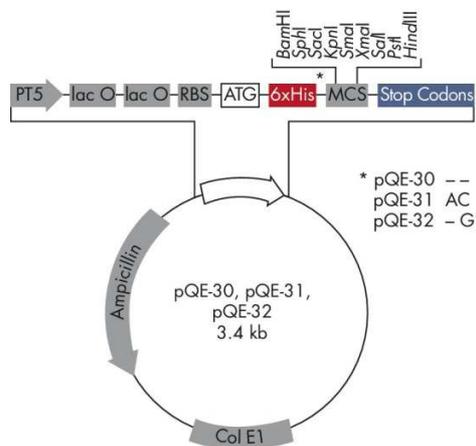


Abbildung 8-2: Vektorkarte des pQE30 (346 bp).

8.3.1.2.4 *Escherichia coli*-Stämme

| Name | Genotyp | Quelle |
|-----------------|--|------------|
| XL1-Blue | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI^qΔM15 Tn10(Tet^r)]</i> | Stratagene |
| BL-21(DE3)pRep4 | F ⁻ <i>ompT hsdSB(r_B⁻, m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pRep4 (Neo ^r) | Novagen |

8.3.1.2.5 Antikörper

Primärantikörper:

| Name | Beschreibung | Verdünnung |
|--------------|---|------------|
| Anti-DDAH-1 | Polyklonaler Antikörper gegen eine 131 AS lange Sequenz von Serin 143 bis Threonin 273 am N-Terminus, 0,2 mg/mL, Kaninchen, Sigma Aldrich | 1:50000 |
| RGS-Anti His | Monoklonaler Antikörper gegen den 6×Histidin-Tag, 0,2 mg/mL, Maus, Qiagen | 1:50000* |

* Abweichungen von den hier angegebenen Verdünnungen sind an entsprechender Stelle angegeben

Sekundärantikörper:

| Name | Beschreibung | Verdünnung |
|----------------|---|------------|
| Anti-Maus | Polyklonaler Antikörper gegen die leichte Kette des Maus IgG, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert, 0,8 mg/mL, Ziege, Jackson Immuno Research (115-035-174) | 1:50000* |
| Anti-Kaninchen | Polyklonaler Antikörper gegen die leichte und die schwere Kette des Kaninchen IgG, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert, 0,8 mg/mL, Ziege, Jackson Immuno Research (111-035-003) | 1:10000* |

* Abweichungen von den hier angegebenen Verdünnungen sind an entsprechender Stelle angegeben

8.3.1.2.6 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen sowie das Wasser für molekularbiologische Arbeiten und alle Nährmedien für *E. coli* wurden entweder sterilfiltriert (0,2 µm Porenweite) oder autoklaviert (20 min, 121 °C, 2 bar). Alle Puffer für die Proteinbiochemie (Reinigung etc.) wurden bei 4 °C gelagert und bei Bedarf unmittelbar vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt. Sofern nicht anders angegeben wurden alle Puffer und Lösungen mit *Aqua bidest.* hergestellt.

TAE-Puffer (50×) pH 8,0:

40 mM Tris-acetat,
1 mM EDTA

Ethidiumbromid-Lösung:

100 mg Ethidiumbromid
10 mL *Aqua bidest.*

LB-Medium:

10 g/L Bacto Trypon
10 g/L NaCl
5 g/L Hefeextrakt

Ladepuffer für DNA-Proben (10×):

0,4 % Orange G
30 % Glycerol
100 mM EDTA

TBE-Puffer (10×) pH 8,3:

0,89 mM Tris-base
0,89 mM Borsäure
0,02 mM EDTA

LB-Plattenagar:

35 g LB-Lennox
ad 1 L *Aqua bidest.*

TB-Medium:

12 g/L Pepton
 24 g/L Hefeextrakt
 12,5 g/L K_2CO_3
 2,3 g/L KH_2PO_4
 4 mL/L Glycerol

Trenngel-Puffer pH 8,8:

1,5 M Tris-base
 0,4 % SDS

Kathoden-Puffer pH 8,3:

25 mM Tris-base
 192 mM Glycin
 0,1 % SDS

Coomassie-Färbelösung:

1 g Coomassie Brilliant Blue R250
 50 mL Eisessig
 125 mL Isopropanol (99,5 %)
 ad 500 mL *Aqua bidest.*

SDS-Lade-Puffer (4×) pH 6,8:

250 mM Tris-base
 40 % Glycerol
 0,02 % Bromphenolblau
 8 % SDS
 400 mM DTT

TBS-T-Puffer pH 7,6:

20 mM Tris-base
 137 mM NaCl
 0,1 % Tween®20

PBS-Puffer pH 7,4:

137 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 10 mM Na_2HPO_4
 2 mM KH_2PO_4

Sammelgel-Puffer pH 6,8:

0,5 M Tris-base
 0,4 % SDS

Gel-Trockner-Lösung:

50 mM Glycerol
 100 mL Ethanol (99 %)
 350 mL *Aqua bidest.*

Entfärbelösung:

10 % Eisessig
 30 % Isopropanol (99,5 %)

Transferpuffer (10×) pH 8,3:

25 mM Tris-base
 192 mM Glycin

M-TBST-Puffer:

5 % Milchpulver in TBS-T-Puffer

Ponceau-Rot-S:

1 % Ponceau S

3 % Essigsäure

Standard-Lyse-Puffer pH 8,0:20 mM Na₂HPO₄

150 mM NaCl

1 mM Benzamidin

2 mM β-Mercaptoethanol

20 % Glycerol

Wasch-Puffer-Stock pH 7,0:100 mM K₂HPO₄

600 mM NaCl

1 mM β-Mercaptoethanol

2 mM Benzamidin

2 mM EDTA

20 % Glycerol

Imidazol-Stammlösung:

10 mM Imidazol

*Aqua bidest.*Lauf-Puffer pH 8,0 (IEC):

50 mM Tris-HCl

1 mM β-Mercaptoethanol

10 % Glycerol

1 mM PMSF

Lösung A (Aktivitätsassay):

80 mM Diacetylmonoxim

2 mM Thiosemicarbazid

Transfer-Puffer-Mix:

20 % Methanol

10 % 10× Transfer-Puffer

Wasch-Elutions-Puffer (× mM Imidazol):50 mM K₂HPO₄

300 mM NaCl

0,5 mM β-Mercaptoethanol

1 mM Benzamidin

1 mM EDTA

10 % Glycerol

0-200 mM Imidazol

0,5-1 mM PMSF

PMSF-Stammlösung:

100 mM PMSF

Isopropanol

Elutions-Puffer pH 8,0 (IEC):

1 M NaCl

Lauf-Puffer pH 8,0

Lösung B (Aktivitätsassay):200 mL H₃PO₄ (85 %)330 mL H₂SO₄ (96 %)750 mg NH₄(SO₄)₂ × 12 H₂Oad 1 L *Aqua bidest.*

Antibiotika-Zusätze:

| Name des Antibiotikums | µg/mL Plattenagar |
|------------------------|-------------------|
| Ampicillin | 100 |
| Kanamycin | 40 |

8.3.2 Methoden**8.3.2.1 Plasmid-DNA Isolierung (Miniprep)**

5 mL LB-Medium wurden mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum versetzt und mit einem Einzelklon oder der Dauerkultur angeimpft. Nach Inkubation der Kultur über Nacht (10-12 h) bei 37 °C unter Schütteln wurden 2-5 mL der Kultur abgenommen und bei 12000 × g zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet konnte anschließend für die Isolierung der Plasmid-DNA verwendet werden. Die Isolierung und Reinigung der Plasmide erfolgte mithilfe des *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* nach Herstellerangaben, mit der Ausnahme, dass auf den Einsatz alkalischer Protease verzichtet wurde. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 30-50 µL *Aqua bidest.* Die DNA-Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt und die Plasmide anschließend bei 4 °C gelagert.

Für die DNA-Konzentrationsbestimmung wurde folgende Formel zugrunde gelegt:

$$c = A_{260} \times f \times \text{Verdünnung} (\mu\text{g}/\mu\text{L})$$

$$f = 0,02 \text{ für Oligonukleotide und Einzelstrang-DNA}$$

$$f = 0,04 \text{ für Plasmide und Doppelstrang-DNA}$$

Die zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm dient der Prüfung auf Verunreinigungen durch Proteine. Die Reinheit wurde über das Verhältnis $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ berechnet. Als notwendige Bedingung für eine ausreichend reine DNA-Präparation musste das Verhältnis $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ größer als 1,8 sein.

8.3.2.2 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Ein Restriktionsverdau bestand aus 3 µL DNA-Lösung aus den Miniprep-Ansätzen, 0,5 µL des Restriktionsenzym, 1 µL des jeweiligen Puffers und 5,5 µL *Aqua bidest.* Anschließend wurde 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung der linearisierten DNA erfolgte über Agarosegelelektrophorese.

8.3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation der DNA wurden die PCR-Proben nach folgendem Schema hergestellt: 50-100 ng DNA-Template (Miniprep) wurden mit 5 µL 10× *PfuTurbo*-DNA-Polymerase-Puffer, je 10 pmol dNTPs, 25 pmol *sense*-Primer, 25 pmol *antisense*-Primer und 0,8 µL *PfuTurbo*-DNA-Polymerase in ein PCR-Tube gegeben und mit *Aqua bidest.* auf ein Gesamtvolumen von 50 µL aufgefüllt. Ein Ansatz ohne DNA-Template diente als Negativkontrolle auf Verunreinigungen durch die eingesetzten Reagenzien.

Für die Amplifikation der hDDAH-1_G129T im Thermocycler wurde folgendes Temperaurprogramm gefahren:

| | T (°C) | Zeit (s) |
|---------------|--------|----------|
| Denaturierung | 95 | 120 |
| Denaturierung | 95 | 30 |
| Annealing | T_m | 30 |
| Extension | 72 | 360 |
| } 20 Zyklen | | |
| Extension | 72 | 600 |
| Lagerung | 4 | ∞ |

Die Anlagerungstemperatur (Annealing) wurde näherungsweise über die Schmelztemperatur (T_m) der Primer mit folgender Formel berechnet:

$$T_m = 60 + (0,41 \times GC) - \frac{600}{n}$$

GC = Guanin und Cytosin-Anteil in %

n = Basenanzahl des Primers

Zum Verdau des DNA-Templates bei der Mutagenese-PCR wurden nach erfolgter PCR die Proben mit dem Restriktionsenzym *DpnI* behandelt. Dazu wurden 44 μL des PCR-Ansatzes mit 5 μL FastDigest®-Puffer und 1 μL FastDigest®*DpnI* versetzt und anschließend für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der *DpnI* erfolgte bei 80 °C für 20 min.

8.3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die analytische Auftrennung der aus PCR oder Verdau durch Restriktionsendonukleasen gewonnenen DNA erfolgte mithilfe der Agarose-Flachbett-Gelelektrophore, die Auskunft über die Reinheit der erhaltenen DNA geben sollte. Dazu musste zunächst ein 1 %iges Gel durch Suspension von 0,5 g Agarose in 50 mL TAE-Puffer hergestellt werden. Die Agarose löste sich durch 2 minütiges Erwärmen in der Mikrowelle. Nach dem Abkühlen wurde verdunstetes Wasser ergänzt und 1 μL Ethidiumbromidlösung zugegeben. Die Agaroselösung wurde in ein Geltaflet geegossen und anschließend in die Elektrophoresekammer gelegt. Zum Auftragen wurden 10-20 μL DNA-Lösung mit 1/10 Volumen des Agarosegel-Ladepuffers versetzt und 0,5-5 μL der Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Laufzeit betrug 20-30 min bei einer Spannung von 115 V. Als Marker für die Größenbestimmung der DNA wurde *PstI* geschnittene λ -DNA verwendet. Die DNA-Detektion erfolgte unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm.

8.3.2.5 DNA-Sequenzierung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten DNA-Sequenzierungen erfolgten nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger bei der über PCR DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge synthetisiert werden, die mit einem bestimmten ddNTP enden.²⁸⁰

Die Probenvorbereitung für die DNA-Sequenzierung erfolgte mithilfe des GenomeLab DTCS Quick Start Kit. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die fluoreszenzmarkierten ddNTPs in einem Master-Mix verwendet werden, dem lediglich noch DNA und die entsprechenden Sequenzier-Primer zugesetzt werden müssen. Dazu wurden zunächst 50-100 fmol Plasmid-DNA mit *Aqua bidest.* auf ein Volumen von 9,5 µL aufgefüllt und ein Preheat durchgeführt (s. PCR-Programm). Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 µL DTCS-Master-Mix und 1,5 µL (5000 fmol/µL) des jeweiligen Primers. Das PCR-Programm wurde nach folgendem Schema gefahren:

| | T (°C) | Zeit (s) |
|---------------|--------|----------|
| Preheat | 86 | 300 |
| Denaturierung | 96 | 20 |
| Annealing | 50 | 20 |
| Extension | 60 | 40 |
| } 20 Zyklen | | |
| Lagerung | 4 | ∞ |

Die folgende Reinigung der PCR-Produkte erfolgte nach Herstellerangaben mit Ethanolfällung. Abweichend vom Protokoll wurde aus Gründen der Ausbeuteoptimierung die Zentrifugationszeit bei den Waschschrritten mit Ethanol auf 5 min erhöht. Zusätzlich wurde die Vakuumtrocknung bei einer höheren Temperatur von 43 °C für 10 min durchgeführt und die Proben anschließend in SLS resuspendiert. Die Auswertung der Sequenzier-PCR-Proben erfolgte an einem Kapillarsequenzierer CEQ 8000 über die CEQ 8000 Genetic Analysis System Software.

8.3.2.6 Transformation in *E. coli*

Die Transformation erfolgte entweder in chemisch kompetenten XL1-Blue Zellen für die Dauerkultur oder in kompetenten BL-21(DE3)pRep4 Zellen für die Expression der hDDAH-1 und hDDAH-1_G129T. Dafür wurden 100 µL kompetente Zellen 3 min auf Eis aufgetaut und weniger als 100 ng Plasmid-DNA zugesetzt. Anschließend mussten die Zellen 30 min auf Eis, 1 min bei 42 °C und weitere 2 min auf Eis lagern. Danach wurden 900 µL LB-Medium zugesetzt und 45 min rotierend bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden bei 12000 × g pelletiert und 900 µL vom Überstand verworfen. Das Zell-Pellet wurde im restlichen Medium resuspendiert und auf eine geeignete antibiotikahaltige LB-Agarplatte ausplattiert. Im Anschluss inkubierte die Platte bei 37 °C über Nacht. Eine zum Teil eingesetzte Schnelltransformation verlief nach folgendem Schema: Es wurden 100 µL kompetente Zellen für wenige Minuten auf Eis aufgetaut und mit 0,3 µL Plasmid-DNA versetzt. Danach wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert und

anschließend direkt 50 μL dieser Zellsuspension auf eine geeignete antibiotikahaltige LB-Agarplatte ausplattiert. Im Anschluss inkubierte die Platte über Nacht bei 37 °C.

8.3.2.7 Enzymexpression

8.3.2.7.1 Schüttelkulturen

Zunächst musste eine Vorkultur angelegt werden, indem 50 mL LB-Medium mit je 50 μL Ampicillin- (100 mg/mL) und Kanamycinlösung (400 mg/mL) und einem Klon des Konstrukts versetzt wurden. Diese Kultur inkubierte für ca. 16 h bei 30 °C und 200 rpm. Anschließend wurden 4 \times 250 mL LB-Medium mit jeweils 250 μL Ampicillin- (100 mg/mL) und Kanamycinlösung (40 mg/mL) und 10 mL der Vorkultur versetzt. Diese Kulturen inkubierten unter den gleichen Bedingungen wie die Vorkulturen bis zu einer optischen Dichte OD_{600} von ca. 0,5. Anschließend erfolgte die Induktion mit jeweils 100 μM Isopropyl- β -thiogalactopyranosid (IPTG), gefolgt von einer weiteren Inkubation der Zellen für 6 Stunden bei 30 °C und anschließender Lagerung auf Eis. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation der Kulturen bei 4500 $\times g$ und 4 °C für 15 min. Die Zell-Pellets wurden in *Aqua bidest.* resuspendiert und erneut bei 5000 $\times g$ und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen ausgewogen und in Lyse-Puffer resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung.

8.3.2.7.2 Fermenter

Zunächst wurden 5 L TB-Medium im Fermentergefäß autoklaviert. Das Medium wurde mit jeweils 5 mL sterilfiltrierter Ampicillin- (100 mg/mL) und Kanamycinlösung (400 mg/mL) versetzt. 50 mL Vorkultur wurden über einen Schlauch in das Fermentergefäß gepumpt. Der Fermenter wurde nach Herstellerangaben sowie unter kontinuierlicher Kontrolle der Sauerstoffsättigung, Temperatur, pH-Wert und OD_{600} betrieben. Nach 160 Minuten und einer OD_{600} von 0,65 wurden die Zellen mit 500 μL IPTG (1 M) induziert. Der Schaumbildung konnte durch dreimalige Zugabe von 200-400 μL *Antifoam*-Lösung entgegengewirkt werden. Die Sauerstoffsättigung wurde konstant in einem Bereich von 92-100 % gehalten und der pH-Wert lag bei $6,93 \pm 0,03$. Nach 460 Minuten und einer OD_{600} von 11,6 erfolgte die Zellernte, indem die Zellen zunächst auf Eis gekühlt und, wie unter Kapitel 8.3.2.7.1 beschrieben, weiter verarbeitet wurden.

8.3.2.8 Zell-Lyse

Nach Auftauen der Zellsuspension und Zugabe von 1 mM PMSF wurde die Suspension in eine French Press-Zelle überführt und die Zellen in 2-3 Durchläufen mithilfe eines French Press Cell Disrupters bei 19000 psi und 4 °C aufgeschlossen. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation der Zellfragmente bei 5000 $\times g$ und 4 °C für 15 min. Der Zellüberstand wurde dekantiert und in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt. Um die lösliche Proteinfraction zu gewinnen wurde anschließend bei 100000 $\times g$ für 45 min in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die lösliche Proteinfraction konnte auf diese Weise von den Zelltrümmern getrennt und direkt für die anschließende Affinitätschromatografie an Ni^{2+} -NTA eingesetzt werden.

8.3.2.9 Reinigung der hDDAH-1

8.3.2.9.1 Ni²⁺-NTA Affinitätschromatografie

Die gesamte Reinigung an Ni²⁺-NTA erfolgte bei einer Temperatur von 4 °C. Alle Proben und Pufferlösungen wurden auf Eis gelagert. Allen Wasch- und Elutionspuffern musste vor Gebrauch 1 mM PMSF zugesetzt werden. Zunächst wurde die lösliche Proteinfraction aus der Ultrazentrifugation mit 600-2000 µL 50 %iger Ni²⁺-NTA-Agarose versetzt und unter leichtem Schütteln bei 4 °C über Nacht an die Matrix gebunden. Die manuelle Chromatografie erfolgte mit einem Stufengradienten. Die Elution konnte durch Ansetzen eines leichten Drucks durch eine Einmalspritze beschleunigt werden. Die an Ni²⁺-NTA gebundene Proteinlösung wurde zunächst portionsweise in Pierce Centrifuge Columns mit einem Volumen von 2-10 mL überführt um das Säulenbett aufzubauen. Der Durchlauf wurde aufgefangen und die Ni²⁺-NTA-Protein-Matrix mit 10 Säulenvolumina Imidazol-freiem Wasch-Puffer gewaschen. Es folgte eine Behandlung mit 10 Säulenvolumina 10 mM Imidazol-Wasch-Puffer, gefolgt von der eigentlichen Elution mit 5 Säulenvolumina 100 mM Imidazol-Wasch-Puffer. Noch an der Matrix befindliches Protein konnte durch die Behandlung mit 200 mM Imidazol-Wasch-Puffer entfernt werden. Anschließend wurde der Proteingehalt aller Fraktionen bestimmt (Kapitel 8.3.2.11) und die Reinheit der einzelnen Proteinfractionen mittels SDS-PAGE analysiert (Kapitel 8.3.2.12).

8.3.2.9.2 Manuelle Ionenaustauschchromatografie

Die aus der Ni²⁺-NTA Affinitätschromatografie gewonnenen hDDAH-1 haltigen Fraktionen wurden nach der Reinheitsprüfung mittels SDS-PAGE zunächst vereinigt und wie in Kapitel 8.3.2.10 beschrieben in einen Tris-HCl-Puffer pH 8,0 umgepuffert. Anschließend wurden die GE HiTrap® Q FF Säulen (1 mL, 5 mL) mit jeweils 10 Säulenvolumina *Aqua bidest.* gespült und danach mit 10 Säulenvolumina Tris-HCl-Puffer pH 8,0 konditioniert. Die Proteinlösungen wurden mit einer Einwegspritze langsam und mit konstantem Druck auf die IEX-Säule aufgetragen und der Durchlauf aufgefangen. Danach wurde die Säule mit 5 Säulenvolumina Tris-HCl-Puffer pH 8,0 gespült und der Durchlauf erneut aufgefangen. Die anschließende Elution erfolgte mit einem Stufengradienten, indem dem Tris-HCl-Puffer pH 8,0 0,1-0,5 M NaCl zugesetzt und mit jeweils 5 Säulenvolumina eluiert wurde. Die Eluate wurden den Konzentrationsstufen entsprechend aufgefangen und die Reinheit mittels SDS-PAGE analysiert (Kapitel 8.3.2.12). Hochreine hDDAH-1 enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und ggf. über Amicon® Ultra 4 mL oder 15 mL Filter-Tubes mit 10000 MWCO auf einen definierten Proteingehalt aufkonzentriert. Die IEX-Säule wurde im Anschluss an die Chromatografie mit 10 Säulenvolumina *Aqua bidest.* gespült und auf 20 % (V/V) Ethanol gelagert. Die GE HiTrap® Q FF Säulen (1 mL, 5 mL) wurden im Rahmen der manuellen IEC mit handelsüblichen Einwegspritzen betrieben.

8.3.2.9.3 FPLC-basierte Ionenaustauschchromatografie (IEC)

Wie in Kapitel 8.3.2.9.2 bereits beschrieben, mussten die aus der Ni²⁺-NTA Affinitätschromatografie gewonnenen DDAH-1 haltigen Fraktionen zunächst umgepuffert und auf einen Proteingehalt von ca. 1-4 mg/mL eingestellt werden. Es wurde folgendes FPLC-System eingesetzt:

| | |
|--------------------|--|
| FPLC-System: | ÄKTA™ Purifier mit P-901 Pumpe, M-925 Gradientenmischer, UV-900 Detektor, Frac 950 Fraktionssammler und Unicorn™ Software Version 5.11 |
| Säule: | GE HiTrap® Q FF (1 mL, 5 mL) starker Anionenaustauscher |
| Arbeitstemperatur: | 8 °C |
| Lauf-Puffer: | Tris-HCl-Puffer pH 8,0 |
| Elutions-Puffer: | Tris-HCl-Puffer pH 8,0 mit 1 M NaCl |
| Flussrate: | 1 mL/min Proteinauftrag; 4 mL/min Elution |
| Detektion: | UV-Detektion bei $\lambda = 280 \text{ nm}$, 254 nm, 215 nm |
| Proteinlösung: | hDDAH-1 in 5 mL Tris-HCl-Puffer pH 8,0 (1-4 mg/mL) |
| Injektion: | <i>Tubing Loop</i> Injektionsschleife 10 μL -10 mL |
| Elution: | hDDAH-1 hochrein bei 0,1 M-0,2 M NaCl |

Das Eluat wurde den Konzentrationsstufen entsprechend in Fraktionen von 4 mL aufgefangen und die Reinheit mittels SDS-PAGE analysiert (Kapitel 8.3.2.12). Dabei wurden nur Fraktionen berücksichtigt, die bereits UV-spektroskopisch erfasst werden konnten. Hochreine hDDAH-1 enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und ggf. über Amicon® Ultra 4 mL oder 15 mL Filter-Tubes mit 10000 MWCO auf einen definierten Proteingehalt aufkonzentriert. Die IEX-Säule wurde im Anschluss an die Chromatografie mit 10 Säulenvolumina *Aqua bidest.* gespült und auf 20 % (V/V) Ethanol gelagert.

8.3.2.10 Umpuffern

Die an Ni²⁺-NTA gereinigten hDDAH-1-Fraktionen wurden in Amicon® Ultra 4 mL oder 15 mL Filter-Tubes mit 10000 MWCO überführt und bei 5000 $\times g$ und 4 °C 10-20 min (bei 15 mL Filter Tubes 5000 $\times g$) auf ein Restvolumen von ca. 0,5-2 mL eingeengt. Anschließend wurden die Filter Tubes mit 3-10 mL Tris-HCl-Puffer pH 8,0 aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Der Vorgang wiederholte sich ein weiteres Mal. Die Überstände in den Filter-Tubes wurden abpipettiert und auf das gewünschte Volumen verdünnt oder auf einen definierten Proteingehalt von 1-4 mg/mL eingestellt.

8.3.2.11 Bestimmung des Proteingehalts

Bio-Rad-Reagenz (Bradford-Methode):²⁸¹

Zu 0,8-8 μL Proteinlösung wurden 100 μL Reagenz 400 μL *Aqua bidest.* gegeben. Nach gründlichem Durchmischen wurde für mindestens 5 min inkubiert und anschließend die Absorption der farbigen

Lösungen bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ gegen einen Leerwert ohne Protein gemessen. Zur Kalibrierung wurden Standards mit Rinderserumalbumin verwendet.

Bicinchoninsäure (BCA)-Methode:²⁸²

10 μL der zu analysierenden Proteinlösungen wurden mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit gemäß Herstellerangaben bestimmt. Zur Probenvorbereitung wurden die Proteine zunächst mittels Pierce Compat-Able Protein Assay Kit gefällt, um Störungen durch Begleitstoffe zu minimieren. Alle Proben wurden UV-VIS-spektroskopisch bei 562 nm gegen einen Leerwert ohne Protein analysiert und durch Kalibrierung mit verschiedenen Konzentrationen Rinderserumalbumin quantifiziert.

8.3.2.12 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE in SDS-Minigel-Apparaturen verwendet.²⁸³ Für die Elektrophorese wurden ein 6 %iges Sammelgel und ein 12,5 %iges Trenngel verwendet. Die Zusammensetzung ist in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die Mengen beziehen sich auf die Herstellung von zwei Minigelen.

| | Sammelgel 6 % | Trenngel 12,5 % |
|------------------------------------|----------------------|------------------------|
| <i>Aqua bidest.</i> (mL) | 2,4 | 4 |
| Trenngel-Puffer (mL) | - | 3 |
| Sammelgel-Puffer (mL) | 1 | - |
| Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (mL) | 0,6 | 5 |
| 10 % APS (μL) | 25 | 80 |
| TEMED (μL) | 6 | 10 |

Die Gele konnten bei 4 °C mehrere Tage gelagert werden.

Zur Probenvorbereitung wurden die entsprechenden Proteinlösungen mit SDS-Ladepuffer versetzt und mit *Aqua bidest.* auf einen definierten Proteingehalt eingestellt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben bei 95 °C für 10 min inkubiert und anschließend das Gel mit 2-20 μg Gesamtprotein pro Probenspur geladen. Um die Proteine entsprechenden Molekulargewichten zuordnen zu können, mussten Molekulargewichtsmarker eingesetzt werden. Hauptsächlich kamen der Mark12 Unstained Standard und der Page Ruler® Prestained Protein Ladder zum Einsatz. Die Spannung zur Probenkonzentrierung im Sammelgel betrug 120 V und für die anschließende Auftrennung im Trenngel 200 V. Der Austritt der Bromphenolblaubande aus dem Trenngel zeigte den Endpunkt der elektrophoretischen Trennung an. Das Sammelgel wurde entfernt und die Auswertung erfolgte entweder über Coomassie-Färbung, Silber-Färbung oder Western Blot (Kapitel 8.3.2.13). Für die Coomassie-Brilliant-Blau färbung wurde das Gel zunächst für 1 h gefärbt und anschließend in verschiedenen Entfärbebädern so lange entfärbt, bis die blauen Proteinbanden sichtbar wurden. Eine Silberfärbung war auch bei vorangegangener Coomassie-Färbung möglich. Die Durchführung erfolgte mithilfe des PlusOne Silver Staining Kit Protein nach Herstellerangaben.

8.3.2.13 Western-Blot

Für die Protein-Detektion mittels Western-Blot wurde zunächst eine SDS-PAGE wie in Kapitel 8.3.2.12 durchgeführt. Um die Proteine einer immunologischen Detektion zugänglich zu machen, wurde sie im Wet-Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu musste die PVDF-Membran zunächst auf die Größe des SDS-Gels angepasst und 30 s in Methanol äquilibriert werden. Der Aufbau des Blots erfolgte ausgehend von der Anodenseite wie folgt: Vlies, zwei Lagen Whatman-Papier (zuvor in Transfer-Puffer getränkt), PVDF-Membran, das luftblasenfrei aufgebrachte SDS-Gel, zwei Lagen Whatman-Papier (zuvor in Transfer-Puffer getränkt) und zuletzt eine Lage Vlies. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte bei einer Spannung von 90 V für 2 h. Im Anschluss wurden freie Bindestellen auf der Membran durch eine einstündige Behandlung mit 5 % M-TBST-Puffer geblockt. Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:50000 in M-TBST-Puffer aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 15 min in TBS-T-Puffer gewaschen und anschließend für eine Stunde mit dem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper behandelt. Die Membran wurde erneut dreimal in TBS-T-Puffer gewaschen. Zur Detektion wurde der Blot nach Herstellerangaben mit dem ECL Plus Western Blotting Detection Reagenz behandelt und für 3 min unter Schwenken inkubiert. Die Entwicklung des Blots erfolgte durch Belichtung von Hyperfilm-ECL Folien. Die Belichtungszeit war stark von der Signalintensität der Chemilumineszenz abhängig und betrug i.d.R. 5 s bis 5 min. Um den Erfolg des durchgeführten Blots zu bestätigen wurde für den entsprechenden Primärantikörper die hDDAH-1 als Kontroll-Protein mit entwickelt.

Im Anschluss an die fotochemische Entwicklung der Blotting-Membran konnte zusätzlich eine Ponceau S Färbung durchgeführt werden. Dazu wurde die Membran zunächst mit Wasser gewaschen und anschließend kurz mit Ponceau S Lösung gefärbt. Die Membran wurde solange mit Wasser gespült, bis die Proteine als rote Banden auf weißem Hintergrund sichtbar wurden. Diese Färbung diente u.a. der Detektion des Protein-Markers als Kontrolle für die korrekte Auswertung des Western-Blots.

8.3.2.14 Kolorimetrischer *in vitro* Aktivitätsassay

Der kolorimetrische *in vitro* Aktivitätsassay für die rekombinant hergestellte hDDAH-1 und hDDAH-1_G129T erfolgte auf hitzebeständigen 96-well Mikrotiterplatten. Jede Probe, Kontrolle und Kalibrierung wurde pro Assay in einer Dreifachbestimmung untersucht.

Zunächst erfolgte die Herstellung von Inkubationsansätzen bestehend aus den Substraten ADMA, NMMA oder SMTC in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 in einer Endkonzentration von 300 µM (150 µL pro Ansatz). Durch Zugabe von 3 µg rekombinanter hDDAH-1 oder hDDAH-1_G129T wurde die Reaktion gestartet. Der Verdunstung von Wasser konnte durch Verschluss der Mikrotiterplatten mit einem Deckel entgegengewirkt werden. Die Platte inkubierte anschließend für 30 min unter Schütteln (200 rpm) bei 37 °C. Auf jeder Mikrotiterplatte erfolgte eine Achtpunkt-Kalibrierung mit L-Citrullin in Konzentrationen von 0-100 µM. Als Positivkontrolle wurde ein hDDAH-1 Protein-Standard mit Substrat-Lösung inkubiert und als Negativkontrollen ein hDDAH-1 Protein-Standard ohne Substrat, ein Substrat-Ansatz ohne Protein sowie eine Puffer-Kontrolle.

Die Derivatisierung des gebildeten L-Citrullins erfolgte mit einem Colder-Reagenz.²⁵⁹ Dieses Reagenz bestand aus den Lösungen A und B (s. Kapitel 8.3.1.2.6). Das Colder-Reagenz musste vor jedem Assay aus einem Teil Lösung A und drei Teilen Lösung B frisch hergestellt werden. Zu jedem Inkubations-Ansatz

wurden 200 μL des Colder-Reagenz gegeben und die Mikrotiterplatte zum Schutz vor Verdunstung mit einer hitzeresistenten Klebefolie verschlossen. Die Platte wurde zur besseren Wärmeübertragung auf einer Metallplatte bei 95 °C für 15-20 min erhitzt. Im Anschluss kühlte die Mikrotiterplatte unter Lichtausschluss auf Raumtemperatur ab. Die zeitnahe Detektion erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 540,5 nm auf einer speziellen Plattenreader-Vorrichtung.

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. FURCHGOTT R. F., CHERRY P. D., ZAWADZKI J. V., JOTHIANANDAN D.
Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries.
Journal of Cardiovascular Pharmacology **1984**, 6 Suppl 2, S336-43.
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. IGNARRO L. J., MURAD F.
Nitric oxide: biochemistry, molecular biology, and therapeutic implications.
San Diego: *Academic Press*, **1995**.
4. 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.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **1987**, 84, 9265–9269.
5. KOSHLAND D. E.
The molecule of the year.
Science **1992**, 258, 1861.
6. SORELLE R.
Nobel prize awarded to scientists for nitric oxide discoveries.
Circulation **1998**, 98, 2365–2366.
7. AHLNER J., ANDERSSON R. G., TORFGARD K., AXELSSON K. L.
Organic nitrate esters: clinical use and mechanisms of actions.
Pharmacological Reviews **1991**, 43, 351–423.
8. MARSH N., MARSH A.
A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology.
Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology **2000**, 27, 313–319.
9. ARNOLD W. P., MITTAL C. K., KATSUKI S., MURAD F.
Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **1977**, 74, 3203–3207.
10. 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.

11. FURCHGOTT R. F.
Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle.
Circulation Research **1983**, 53, 557–573.
12. FÖRSTERMANN U.
Stickoxid (NO): Umweltgift und körpereigener Botenstoff.
Biologie in unserer Zeit **1994**, 24, 62–69.
13. MCCLEVERTY J. A.
Chemistry of nitric oxide relevant to biology.
Chemical Reviews **2004**, 104, 403–418.
14. IGNARRO L. J., FUKUTO J. M., GRISCAVAGE J. M., ROGERS N. E., BYRNS R. E.
Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **1993**, 90, 8103–8107.
15. GOLDSTEIN S., CZAPSKI G.
Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solution in the absence and presence of various reductants. The nature of the oxidizing intermediates.
Journal of the American Chemical Society **1995**, 117, 12078–12084.
16. KENT J. A.
Kent and Riegel's handbook of industrial chemistry and biotechnology 11th ed.
New York: *Springer*, **2010**.
17. COONEY R. V., HARWOOD P. J., CUSTER L. J., FRANKE A. A.
Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids.
Environmental Health Perspectives **1994**, 102, 460–462.
18. CORPAS F. J., BARROSO J. B., DEL RIO L. A.
Enzymatic sources of nitric oxide in plant cells-beyond one protein-one function.
New Phytologist **2004**, 162, 246–248.
19. DEAN J. V., HARPER J. E.
The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean.
Plant Physiology **1988**, 88, 389–395.
20. DURNER J., KLESSIG D. F.
Nitric oxide as a signal in plants.
Current Opinion in Plant Biology **1999**, 2, 369–374.
21. MONCADA S., PALMER R. M., HIGGS E. A.
Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.
Pharmacological Reviews **1991**, 43, 109–142.

22. RASSAF T., PREIK M., KLEINBONGARD P., LAUER T., HEISS C., STRAUER B.-E., FEELISCH M., KELM M.
Evidence for *in vivo* transport of bioactive nitric oxide in human plasma.
Journal of Clinical Investigation **2002**, 109, 1241–1248.
23. KELM M.
Nitric oxide metabolism and breakdown.
Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics **1999**, 1411, 273–289.
24. DOYLE M. P., HOEKSTRA J. W.
Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins.
Journal of Inorganic Biochemistry **1981**, 14, 351–358.
25. PACHER P., BECKMAN J. S., LIAUDET L.
Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.
Pharmacological Reviews **2007**, 87, 315–424.
26. BEVAN J. A., KALEY G., RUBANYI G. M.
Flow-dependent regulation of vascular function.
New York: *Springer*, **2013**.
27. RUBANYI G. M., ROMERO J. C., VANHOUTTE P. M.
Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor.
American Journal of Physiology **1986**, 250, H1145-9.
28. BERRIDGE M. J., LIPP P., BOOTMAN M. D.
The versatility and universality of calcium signalling.
Nature Reviews Molecular Cell Biology **2000**, 1, 11–21.
29. CLAPHAM D. E.
Calcium signaling.
Cell **2007**, 131, 1047–1058.
30. IGNARRO L. J., CIRINO G., CASINI A., NAPOLI C.
Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview.
Journal of Cardiovascular Pharmacology **1999**, 34, 879–886.
31. PRIVIERO F. B. M., WEBB R. C.
Heme-dependent and independent soluble guanylate cyclase activators and vasodilation.
Journal of Cardiovascular Pharmacology **2010**, 56, 229–233.
32. POULOS T. L.
Soluble guanylate cyclase.
Current Opinion in Structural Biology **2006**, 16, 736–743.
33. LINCOLN T. M.
Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation.
Pharmacology & Therapeutics **1989**, 41, 479–502.

34. LINCOLN T. M., DEY N., SELLAH H.
Invited Review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression.
Journal of Applied Physiology **2001**, 91, 1421–1430.
35. RADOMSKI M. W., PALMER R. M., MONCADA S.
The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide.
British Journal of Pharmacology **1987**, 92, 639–646.
36. RADOMSKI M., PALMER R., MONCADA S.
Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium.
Lancet **1987**, 330, 1057–1058.
37. WANG G. R., ZHU Y., HALUSHKA P. V., LINCOLN T. M., MENDELSON M. E.
Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: *in vivo* phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **1998**, 95, 4888–4893.
38. BOULOS C., JIANG H., BALAZY M.
Diffusion of peroxynitrite into the human platelet inhibits cyclooxygenase via nitration of tyrosine residues.
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **2000**, 293, 222–229.
39. GARTHWAITE J., BOULTON C. L.
Nitric oxide signaling in the central nervous system.
Annual Review of Physiology **1995**, 57, 683–706.
40. CALABRESE V., MANCUSO C., CALVANI M., RIZZARELLI E., BUTTERFIELD D. A., GIUFFRIDA STELLA A. M.
Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity.
Nature Reviews Neuroscience **2007**, 8, 766–775.
41. SANDERS K. M., WARD S. M.
Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission.
American Journal of Physiology **1992**, 262, G379-92.
42. HIBBS J. B., JR, VAVRIN Z., TAINTOR R. R.
L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells.
Journal of Immunology **1987**, 138, 550–565.
43. NATHAN C. F., HIBBS J. B.
Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity.
Current Opinion in Immunology **1991**, 3, 65–70.

44. COLASANTI M., SUZUKI H.
The dual personality of NO.
Trends in Pharmacological Sciences **2000**, 21, 249–252.
45. GHAFOURIFAR P., CADENAS E.
Mitochondrial nitric oxide synthase.
Trends in Pharmacological Sciences **2005**, 26, 190–195.
46. PACHER P., BECKMAN J. S., LIAUDET L.
Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.
Pharmacological Reviews **2007**, 87, 315–424.
47. IGNARRO L. J.
Physiology and pathophysiology of nitric oxide.
Kidney International Supplement **1996**, 55, S2-5.
48. KOJDA G.
Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure.
Cardiovascular Research **1999**, 43, 562–571.
49. PITOCCHO D., ZACCARDI F., DI STASIO E., ROMITELLI F., SANTINI S. A., ZUPPI C., GHIRLANDA G.
Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes.
The Review of Diabetic Studies **2010**, 7, 15–25.
50. SHARMA J. N., AL-OMRAN A., PARVATHY S. S.
Role of nitric oxide in inflammatory diseases.
Inflammopharmacology **2007**, 15, 252–259.
51. XU W., LIU L. Z., LOIZIDOU M., AHMED M., CHARLES I. G.
The role of nitric oxide in cancer.
Cell Research **2002**, 12, 311–320.
52. THIEMERMANN C.
Nitric oxide and septic shock.
General Pharmacology **1997**, 29, 159–166.
53. GUIX F. X., URIBESALGO I., COMA M., MUÑOZ F. J.
The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain.
Progress in Neurobiology **2005**, 76, 126–152.
54. OLESEN J.
The role of nitric oxide (NO) in migraine, tension-type headache and cluster headache.
Pharmacology & Therapeutics **2008**, 120, 157–171.
55. OLESEN J.
Nitric oxide-related drug targets in headache.
Neurotherapeutics **2010**, 7, 183–190.

56. ANDLIN-SOBOCKI P., JÖNSSON B., WITTCHEN H.-U., OLESEN J.
Cost of disorders of the brain in Europe.
European Journal of Neurology **2005**, 12 Suppl 1, 1–27.
57. GROSS S. S., WOLIN M. S.
Nitric oxide: pathophysiological mechanisms.
Annual Review of Physiology **1995**, 57, 737–769.
58. LOSCALZO J.
Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis.
Circulation Research **2001**, 88, 756–762.
59. MONCADA S., HIGGS E. A.
The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology.
British Journal of Pharmacology **2006**, 147 Suppl 1, S193-201.
60. BIAN K., DOURSOUT M.-F., MURAD F.
Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases.
Journal of Clinical Hypertension **2008**, 10, 304–310.
61. FERRONI P., BASILI S., PAOLETTI V., DAVÌ G.
Endothelial dysfunction and oxidative stress in arterial hypertension.
Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases **2006**, 16, 222–233.
62. NAPOLI C., NIGRIS F. de, WILLIAMS-IGNARRO S., PIGNALOSA O., SICA V., IGNARRO L. J.
Nitric oxide and atherosclerosis: an update.
Nitric Oxide **2006**, 15, 265–279.
63. RAU L.
Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease.
The Journal of Clinical Hypertension **2006**, 8, 30–39.
64. STATISTISCHES BUNDESAMT
Fachserie 12, Reihe 7.2, 2002-2008. Gesundheit - Krankheitskosten **2011**.
65. STATISTISCHES BUNDESAMT
Fachserie 12, Reihe 4. Gesundheit - Todesursachen **2014**.
66. THOM T., HAASE N., ROSAMOND W., HOWARD V. J., RUMSFELD J., MANOLIO T., ZHENG Z.-J., FLEGAL K.,
O'DONNELL C., KITTNER S., LLOYD-JONES D., GOFF D. C., HONG Y., ADAMS R., FRIDAY G., FURIE K., GORELICK P.,
KISSELA B., MARLER J., MEIGS J., ROGER V., SIDNEY S., SORLIE P., STEINBERGER J., WASSERTHIEL-SMOLLER S.,
WILSON M., WOLF P.
Heart disease and stroke statistics - 2006 update: a report from the American Heart Association
Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee.
Circulation **2006**, 113, e85-151.
67. BURNETT A. L.
The role of nitric oxide in erectile dysfunction: implications for medical therapy.
Journal of Clinical Hypertension **2006**, 8, 53–62.

68. TODA N., AYAJIKI K., OKAMURA T.
Nitric oxide and penile erectile function.
Pharmacology & Therapeutics **2005**, 106, 233–266.
69. STUEHR D. J., KWON N. S., NATHAN C. F., GRIFFITH O. W., FELDMAN P. L., WISEMAN J.
 N^{ω} -Hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine.
Journal of Biological Chemistry **1991**, 266, 6259–6263.
70. ASH D. E.
Structure and function of arginases.
Journal of Nutrition **2004**, 134, 2760S-2764S.
71. BEDFORD M. T., CLARKE S. G.
Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why.
Molecular Cell **2009**, 33, 1–13.
72. OGAWA T., KIMOTO M., WATANABE H., SASAOKA K.
Metabolism of N^{ω},N^{ω} - and N^{ω},N^{ω} -dimethylarginine in rats.
Archives of Biochemistry and Biophysics **1987**, 252, 526–537.
73. MARTENS-LOBENHOFFER J., BODE-BÖGER S. M., CLEMENT B.
First detection and quantification of N^{δ} -monomethylarginine, a structural isomer of N^{ω} -monomethylarginine, in humans using MS³.
Analytical Biochemistry **2015**, 493, 14–20.
74. KIELSTEIN J. T., VELDINK H., MARTENS-LOBENHOFFER J., HALLER H., BURG M., LORENZEN J. M., LICHTINGHAGEN R., BODE-BÖGER S. M., KLIEM V.
SDMA is an early marker of change in GFR after living-related kidney donation.
Nephrology, Dialysis, Transplantation **2011**, 26, 324–328.
75. BOUCHER J. L., CUSTOT J., VADON S., DELAFORGE M., LEPOIVRE M., TENU J. P., YAPO A., MANSUY D.
 N^{ω} -Hydroxy-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase.
Biochemical and Biophysical Research Communications **1994**, 203, 1614–1621.
76. DAGHIGH F., FUKUTO J. M., ASH D. E.
Inhibition of rat liver arginase by an intermediate in NO biosynthesis, N^{ω} -hydroxy-L-arginine: implications for the regulation of nitric oxide biosynthesis by arginase.
Biochemical and Biophysical Research Communications **1994**, 202, 174–180.
77. CARDOUNEL A. J., CUI H., SAMOUILOV A., JOHNSON W., KEARNS P., TSAI A.-L., BERKA V., ZWEIER J. L.
Evidence for the pathophysiological role of endogenous methylarginines in regulation of endothelial NO production and vascular function.
Journal of Biological Chemistry **2007**, 282, 879–887.
78. LEONE A., MONCADA S., VALLANCE P., CALVER A., COLLIER J.
Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure.
Lancet **1992**, 339, 572–575.

79. GRIFFITH O. W., KILBOURN R. G.
Nitric oxide synthase inhibitors: amino acids.
Methods in Enzymology **1996**, 268, 375–392.
80. 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.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **2002**, 99, 13527–13532.
81. ALDERTON W. K., COOPER C. E., KNOWLES R. G.
Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.
Biochemical Journal **2001**, 357, 593–615.
82. MEADOR W. E., MEANS A. R., QUIOCHO F. A.
Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 Å structure of a calmodulin-peptide complex.
Science **1992**, 257, 1251–1255.
83. SIDDHANTA U., PRESTA A., FAN B., WOLAN D., ROUSSEAU D. L., STUEHR D. J.
Domain sapping in inducible nitric-oxide synthase: electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer.
Journal of Biological Chemistry **1998**, 273, 18950–18958.
84. KNOWLES R. G., MONCADA S.
Nitric oxide synthases in mammals.
Biochemical Journal **1994**, 298 (Pt 2), 249–258.
85. BURNETT A. L., NELSON R. J., CALVIN D. C., LIU J. X., DEMAS G. E., KLEIN S. L., KRIEGSFELD L. J., DAWSON V. L., DAWSON T. M., SNYDER S. H.
Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase.
Molecular Medicine **1996**, 2, 288–296.
86. OGAWA T., KIMOTO M., SASAOKA K.
Dimethylarginine: pyruvate aminotransferase in rats. Purification, properties, and identity with alanine:glyoxylate aminotransferase 2.
Journal of Biological Chemistry **1990**, 265, 20938–20945.
87. LEIPER J., VALLANCE P.
Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases.
Cardiovascular Research **1999**, 43, 542–548.
88. OGAWA T., KIMOTO M., SASAOKA K.
Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of N^{ω},N^{ω} -dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats.
Biochemical and Biophysical Research Communications **1987**, 148, 671–677.

89. FREY D., BRAUN O., BRIAND C., VASÁK M., GRÜTTER M. G.
Structure of the mammalian NOS regulator dimethylarginine dimethylaminohydrolase: a basis for the design of specific inhibitors.
Structure **2006**, 14, 901–911.
90. LEIPER J. M., SANTA MARIA J., 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.
Biochemical Journal **1999**, 343, 209–214.
91. ALTMANN K. S., HAVEMEYER A., BEITZ E., CLEMENT B.
Dimethylarginine-dimethylaminohydrolase-2 (DDAH-2) does not metabolize methylarginines.
ChemBioChem **2012**, 13, 2599–2604.
92. LAMBDEN S., KELLY P., AHMETAJ-SHALA B., WANG Z., LEE B., NANDI M., TORONDEL B., DELAHAYE M., DOWSETT L., PIPER S., TOMLINSON J., CAPLIN B., COLMAN L., BORUC O., SLAVIERO A., ZHAO L., OLIVER E., KHADAYATE S., SINGER M., ARRIGONI F., LEIPER J.
Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 regulates nitric oxide synthesis and hemodynamics and determines outcome in polymicrobial sepsis.
Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **2015**, 35, 1382–1392.
93. STONE E. M., COSTELLO A. L., TIERNEY D. L., FAST W.
Substrate-assisted cysteine deprotonation in the mechanism of dimethylargininase (DDAH) from *Pseudomonas aeruginosa*.
Biochemistry **2006**, 45, 5618–5630.
94. BOGUMIL R., KNIPP M., FUNDEL S. M., VASÁK M.
Characterization of dimethylargininase from bovine brain: evidence for a zinc binding site.
Biochemistry **1998**, 37, 4791–4798.
95. JENKINSON C. P., GRODY W. W., CEDERBAUM S. D.
Comparative properties of arginases.
Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology **1996**, 114, 107–132.
96. MORRIS S. M.
Enzymes of arginine metabolism.
Journal of Nutrition **2004**, 134, 2743S–2747S.
97. YANG Z., MING X.-F.
Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders.
Frontiers in Immunology **2014**, 5, 533.
98. JOHNSON F. K., PEYTON K. J., LIU X.-M., AZAM M. A., SHEBIB A. R., JOHNSON R. A., DURANTE W.
Arginase promotes endothelial dysfunction and hypertension in obese rats.
Obesity **2015**, 23, 383–390.

99. 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.
100. HALLEMEESCH M. M., LAMERS W. H., DEUTZ N. E. P.
Reduced arginine availability and nitric oxide production.
Clinical Nutrition **2002**, 21, 273–279.
101. MEYER J., RICHTER N., HECKER M.
High-performance liquid chromatographic determination of nitric oxide synthase-related arginine derivatives *in vitro* and *in vivo*.
Analytical Biochemistry **1997**, 247, 11–16.
102. CASTILLO L., BEAUMIER L., AJAMI A. M., YOUNG V. R.
Whole body nitric oxide synthesis in healthy men determined from [¹⁵N] arginine-to-[¹⁵N]citrulline labeling.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **1996**, 93, 11460–11465.
103. FITCH C. A., PLATZER G., OKON M., GARCIA-MORENO B. E., MCINTOSH L. P.
Arginine: its pK_a value revisited.
Protein Science **2015**, 24, 752–761.
104. FUKUTO J. M.
Chemistry of *N*-hydroxy-L-arginine.
Methods in Enzymology **1996**, 268, 365–375.
105. SCHADE D., KOTTHAUS J., KLEIN N., KOTTHAUS J., CLEMENT B.
Prodrug design for the potent cardiovascular agent *N*^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA): synthetic approaches and physicochemical characterization.
Organic & Biomolecular Chemistry **2011**, 9, 5249–5259.
106. WALKER J. B., WALKER M. S.
The enzymatic reduction of hydroxyguanidine.
Journal of Biological Chemistry **1959**, 234, 1481–1484.
107. 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.
Chemical Research in Toxicology **1996**, 9, 682–688.
108. CLEMENT B., KUNZE T., HEBERLING S.
Reduction of *N*^ω-hydroxy-L-arginine to L-arginine by pig liver microsomes, mitochondria, and human liver microsomes.
Biochemical and Biophysical Research Communications **2006**, 349, 869–873.

109. 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.
Biochemical Pharmacology **1993**, 46, 2249–2267.
110. KOTTHAUS J., WAHL B., HAVEMEYER A., KOTTHAUS J., SCHADE D., GARBE-SCHÖNBERG D., MENDEL R., BITTNER F., CLEMENT B.
Reduction of N^{ω} -hydroxy-L-arginine by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC).
Biochemical Journal **2011**, 433, 383–391.
111. SCHADE D., KOTTHAUS J., CLEMENT B.
Modulating the NO generating system from a medicinal chemistry perspective: current trends and therapeutic options in cardiovascular disease.
Pharmacology & Therapeutics **2010**, 126, 279–300.
112. BOUCHER J. L., GENET A., VADON S., DELAFORGE M., HENRY Y., MANSUY D.
Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N^{ω} -hydroxy-L-arginine by NADPH and O₂ to nitric oxide and citrulline.
Biochemical and Biophysical Research Communications **1992**, 187, 880–886.
113. WALSH C. T., GARNEAU-TSODIKOVA S., GATTO G. J.
Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications.
Angewandte Chemie International Edition in English **2005**, 44, 7342–7372.
114. WANG Y.-C., PETERSON S. E., LORING J. F.
Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells.
Cell Research **2014**, 24, 143–160.
115. ZOBEL-THROPP P., GARY J. D., CLARKE S.
N-Methylarginine is a novel posttranslational modification of arginine residues in yeast proteins.
Journal of Biological Chemistry **1998**, 273, 29283–29286.
116. WEI H., MUNDADE R., LANGE K. C., LU T.
Protein arginine methylation of non-histone proteins and its role in diseases.
Cell Cycle **2014**, 13, 32–41.
117. LITT M., QIU Y., HUANG S.
Histone arginine methylations: their roles in chromatin dynamics and transcriptional regulation.
Bioscience Reports **2009**, 29, 131–141.
118. BÖGER R. H.
Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease: insights from prospective clinical trials.
Vascular Medicine **2005**, 10 Suppl 1, S19-25.

119. KOTTHAUS J., SCHADE D., TÖPKER-LEHMANN K., BEITZ E., CLEMENT B.
N^δ-Methylated L-arginine derivatives and their effects on the nitric oxide generating system.
Bioorganic & Medicinal Chemistry **2008**, 16, 2305–2312.
120. BODE-BÖGER S. M., SCALERA F., KIELSTEIN J. T., MARTENS-LOBENHOFFER J., BREITHARDT G., FÖBKER M., REINECKE H.
Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease.
Journal of the American Society of Nephrology **2006**, 17, 1128–1134.
121. LÜNEBURG N., HOLTEN R.-A. von, TÖPPER R. F., SCHWEDHELM E., MAAS R., BÖGER R. H.
Symmetric dimethylarginine is a marker of detrimental outcome in the acute phase after ischaemic stroke: role of renal function.
Clinical Science **2012**, 122, 105–111.
122. NAPOLI C., IGNARRO L. J.
Nitric oxide-releasing drugs.
Annual Review of Pharmacology and Toxicology **2003**, 43, 97–123.
123. WANG P. G., XIAN M., TANG X., WU X., WEN Z., CAI T., JANCZUK A. J.
Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications.
Chemical Reviews **2002**, 102, 1091–1134.
124. WANG P. G., CAI T. B., TANIGUCHI N.
Nitric oxide donors: for pharmaceutical and biological applications.
Weinheim: *Wiley*, **2005**.
125. SCHRAMMEL A., PFEIFFER S., SCHMIDT K., KOESLING D., MAYER B.
Activation of soluble guanylyl cyclase by the nitrovasodilator 3-morpholinosydnonimine involves formation of *S*-nitrosoglutathione.
Molecular Pharmacology **1998**, 54, 207–212.
126. CHEN Z., STAMLER J. S.
Bioactivation of nitroglycerin by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase.
Trends in Cardiovascular Medicine **2006**, 16, 259–265.
127. MÜNDEL T., DAIBER A., MÜLSCH A.
Explaining the phenomenon of nitrate tolerance.
Circulation Research **2005**, 97, 618–628.
128. SPARACINO-WATKINS C. E., TEJERO J., SUN B., GAUTHIER M. C., THOMAS J., RAGIREDDY V., MERCHANT B. A., WANG J., AZAROV I., BASU P., GLADWIN M. T.
Nitrite reductase and nitric-oxide synthase activity of the mitochondrial molybdopterin enzymes mARC1 and mARC2.
Journal of Biological Chemistry **2014**, 289, 10345–10358.

129. GRÖBER U., KISTERS K.
Gesunde Gefäße mit L-Arginin.
Stuttgart: *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*, **2014**.
130. BODE-BÖGER S. M., SCALERA F., IGNARRO L. J.
The L-arginine paradox: importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio.
Pharmacology & Therapeutics **2007**, 114, 295–306.
131. DONG J.-Y., QIN L.-Q., ZHANG Z., ZHAO Y., WANG J., ARIGONI F., ZHANG W.
Effect of oral L-arginine supplementation on blood pressure: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials.
American Heart Journal **2011**, 162, 959–965.
132. MANSUY D., BOUCHER J.-L.
Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases.
Free Radical Biology & Medicine **2004**, 37, 1105–1121.
133. SCHADE D., TÖPKER-LEHMANN K., KOTTHAUS J., CLEMENT B.
Synthetic approaches to N^{δ} -methylated L-arginine, N^{ω} -hydroxy-L-arginine, L-citrulline, and N^{δ} -cyano-L-ornithine.
Journal of Organic Chemistry **2008**, 73, 1025–1030.
134. BAGGIO R., ELBAUM D., KANYO Z. F., CARROLL P. J., CAVALLI R. C., ASH D. E., CHRISTIANSON D. W.
Inhibition of Mn^{2+} -arginase by borate leads to the design of a transition state analogue inhibitor, 2-(S)-amino-6-boronohexanoic acid.
Journal of the American Chemical Society **1997**, 119, 8107–8108.
135. KIM N. N., COX J. D., BAGGIO R. F., EMIG F. A., MISTRY S. K., HARPER S. L., SPEICHER D. W., Morris, Sidney M., ASH D. E., TRASH 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.
136. LUNK I.
Entwicklung neuer Inhibitoren der Enzyme Dimethylarginin Dimethylaminohydrolase und Arginase.
Kiel, *Dissertation* **2012**.
137. STEPPAN J., NYHAN D., BERKOWITZ D. E.
Development of novel arginase inhibitors for therapy of endothelial dysfunction.
Frontiers in Immunology **2013**, 4, 278.
138. BAGNOST T., BERTHELOT A., BOUHADDI M., LAURANT P., ANDRÉ C., GUILLAUME Y., DEMOUGEOT C.
Treatment with the arginase inhibitor N^{ω} -hydroxy-nor-L-arginine improves vascular function and lowers blood pressure in adult spontaneously hypertensive rat.
Journal of Hypertension **2008**, 26, 1110–1118.

139. GRIMMINGER F., WEIMANN G., FREY R., VOSWINCKEL R., THAMM M., BÖLKOW D., WEISSMANN N., MÜCK W., UNGER S., WENSING G., SCHERMULY R. T., GHOFrani H. A.
First acute haemodynamic study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension.
European Respiratory Journal **2009**, 33, 785–792.
140. EVGENOV O. V., PACHER P., SCHMIDT P. M., HASKÓ G., Schmidt, Harald H H W, STASCH J.-P.
NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential.
Nature Reviews Drug Discovery **2006**, 5, 755–768.
141. SALERNO L., SORRENTI V., DI GIACOMO C., ROMEO G., SIRACUSA M. A.
Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors.
Current Pharmaceutical Design **2002**, 8, 177–200.
142. VÍTEČEK J., LOJEK A., VALACCHI G., KUBALA L.
Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: therapeutic potential and challenges.
Mediators of Inflammation **2012**, 2012, 318087.
143. VALLANCE P., LEIPER J.
Blocking NO synthesis: how, where and why?
Nature Reviews Drug Discovery **2002**, 1, 939–950.
144. WANG Y., HU S., GABISI A. M., ER J. A. V., POPE A., BURSTEIN G., SCHARDON C. L., CARDOUNEL A. J., EKMEKCIOGLU S., FAST W.
Developing an irreversible inhibitor of human DDAH-1, an enzyme upregulated in melanoma.
ChemMedChem **2014**, 9, 792–797.
145. ROSSITER S., SMITH C. L., MALAKI M., NANDI M., GILL H., LEIPER J. M., VALLANCE P., SELWOOD D. L.
Selective substrate-based inhibitors of mammalian dimethylarginine dimethylaminohydrolase.
Journal of Medicinal Chemistry **2005**, 48, 4670–4678.
146. SCHADE D.
Synthese von Stickstoffmonoxid-modulierenden L-Arginin-Derivaten und Prodrugs für Hydroxyguanidine.
Kiel, *Dissertation* **2008**.
147. NANDI M., KELLY P., TORONDEL B., WANG Z., STARR A., MA Y., CUNNINGHAM P., STIDWILL R., LEIPER J.
Genetic and pharmacological inhibition of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 is protective in endotoxic shock.
Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **2012**, 32, 2589–2597.
148. WERMUTH C. G., GANELLIN C. R., LINDBERG P., MITSCHER L. A.
Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998).
Pure and Applied Chemistry **1998**, 70.

149. ETTMAYER P., AMIDON G. L., CLEMENT B., TESTA B.
Lessons learned from marketed and investigational prodrugs.
Journal of Medicinal Chemistry **2004**, 47, 2393–2404.
150. NANDURDIKAR R. S., MACIAG A. E., HONG S. Y., CHAKRAPANI H., CITRO M. L., KEEFER L. K., SAAVEDRA J. E.
Glycosylated PROLI/NO derivatives as nitric oxide prodrugs.
Organic Letters **2010**, 12, 56–59.
151. KLEIN N.
Neue Modulatoren des NO-generierenden Systems.
Kiel, *Dissertation* **2010**.
152. BRENNAUER A., KELLER M., FREUND M., BERNHARDT G., BUSCHAUER A.
Decomposition of 1-(ω -aminoalkanoyl)guanidines under alkaline conditions.
Tetrahedron Letters **2007**, 48, 6996–6999.
153. MATSUMOTO K., RAPOPORT H.
Preparation and properties of some acylguanidines.
Journal of Organic Chemistry **1968**, 33, 552–558.
154. SCHWABE U., PAFFRATH D., ANLAUF M.
Arzneiverordnungs-Report 2012: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare.
Berlin: *Springer*, **2012**.
155. WU X., TANG X., XIAN M., WANG P. G.
Glycosylated diazeniumdiolates: a novel class of enzyme-activated nitric oxide donors.
Tetrahedron Letters **2001**, 42, 3779–3782.
156. KLEIN C., SCHULZ G., STEGLICH W.
Umwandlung von ω -Guanidino- und ω -Ureido- α -aminosäuren in α -Ketosäuren und deren heterocyclische Folgeprodukte.
Liebigs Annalen der Chemie **1983**, 1983, 1623–1637.
157. LUZZI S. D., MARLETTA M. A.
L-Arginine analogs as alternate substrates for nitric oxide synthase.
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **2005**, 15, 3934–3941.
158. BENOITON L.
Amino acids and peptides: II. Synthesis of ϵ -N-methyl-L-lysine and related compounds.
Canadian Journal of Chemistry **1964**, 42, 2043–2047.
159. SCHADE D., KOTTHAUS J., CLEMENT B.
Efficient synthesis of optically pure N^{ω} -alkylated L-arginines.
Synthesis **2008**, 2008, 2391–2397.
160. FRIEDMAN M.
Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids.
Journal of Agricultural and Food Chemistry **1999**, 47, 3457–3479.

161. BAKER J. W., BELL R. P., CHOVIN P., DUFRAISSE C., KILPATRICK M., REITZ O., ROTHSTEIN E., SCHMID H., SCHWAB G. M.
Katalyse in Lösungen.
Wien: *Springer-Verlag*, **2013**.
162. QUITT P., HELLERBACH J., VOGLER K.
Die Synthese optisch aktiver *N*-Monomethyl-Aminosäuren.
Helvetica Chimica Acta **1963**, 46, 327–333.
163. AURELIO L., BROWNLEE R. T. C., HUGHES A. B.
Synthetic preparation of *N*-methyl- α -amino acids.
Chemical Reviews **2004**, 104, 5823–5846.
164. FUKUYAMA T., JOW C.-K., CHEUNG M.
2- And 4-nitrobenzenesulfonamides: exceptionally versatile means for preparation of secondary amines and protection of amines.
Tetrahedron Letters **1995**, 36, 6373–6374.
165. RUSSELL BOWMAN W., COGHLAN D. R.
A facile method for the *N*-alkylation of α -amino esters.
Tetrahedron **1997**, 53, 15787–15798.
166. LIN X., DORR H., NUSS J. M.
Utilization of Fukuyama's sulfonamide protecting group for the synthesis of *N*-substituted α -amino acids and derivatives.
Tetrahedron Letters **2000**, 41, 3309–3313.
167. KOCIENSKI P. J.
Protecting groups 3rd ed.
Stuttgart: *Georg Thieme Verlag*, **2005**.
168. SASAKI T., MINAMOTO K., ITOH H.
Convenient synthesis of some purine 8,5'-imino cyclonucleosides.
Journal of Organic Chemistry **1978**, 43, 2320–2325.
169. MOALI C., BROLLO M., CUSTOT J., SARI M.-A., BOUCHER J.-L., STUEHR D. J., MANSUY D.
Recognition of α -amino acids bearing various CNOH functions by nitric oxide synthase and arginase involves very different structural determinants.
Biochemistry **2000**, 39, 8208–8218.
170. PFEFFER P. E., SILBERT L. S.
Esterification by alkylation of carboxylate salts: influence of steric factors and other parameters on reaction rates.
Journal of Organic Chemistry **1976**, 41, 1373–1379.
171. GREHN L., RAGNARSSON U.
Exhaustive *tert*-butoxycarbonylation of peptide nitrogens.
Angewandte Chemie International Edition in English **1985**, 24, 510–511.

172. GIBSON M. S., BRADSHAW R. W.
The Gabriel synthesis of primary amines.
Angewandte Chemie International Edition in English **1968**, 7, 919–930.
173. KHAN M. N.
Suggested improvement in the Ing–Manske procedure and Gabriel synthesis of primary amines.
Journal of Organic Chemistry **1996**, 61, 8063–8068.
174. WOITTEZ W. J. A.
Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure 4th ed.
Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas **1993**, 112, 468.
175. ORNER B., HAMILTON A.
The guanidinium group in molecular recognition: design and synthetic approaches.
Journal of Inclusion Phenomena **2001**, 41, 141–147.
176. LEBLEU T., MA X., MADDALUNO J., LEGROS J.
Selective monomethylation of primary amines with simple electrophiles.
Chemical Communications **2014**, 50, 1836–1838.
177. FELDMAN P. L.
Synthesis of the putative L-arginine metabolite L- N^{ω} -hydroxyarginine.
Tetrahedron Letters **1991**, 32, 875–878.
178. WALLACE G. C., FUKUTO J. M.
Synthesis and bioactivity of N^{ω} -hydroxyarginine: a possible intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from arginine.
Journal of Medicinal Chemistry **1991**, 34, 1746–1748.
179. CLEMENT B., SCHNÖRWANGEN E., KÄMPCHEN T., MORDVINTCEV P., MÜLSCH A.
Synthesis of $^{15}N^{\omega}$ -hydroxy-L-arginine and ESR and ^{15}N -NMR studies for the elucidation of the molecular mechanism of enzymic nitric oxide formation from L-arginine.
Archiv der Pharmazie **1994**, 327, 793–798.
180. MARTIN N. I., WOODWARD J. J., MARLETTA M. A.
 N^{ω} -Hydroxyguanidines from primary amines.
Organic Letters **2006**, 8, 4035–4038.
181. RIEBLING, L.
Synthese, *in vitro* Charakterisierung und *in vivo* Testung neuer Amidin-Prodrugs.
Kiel, *Dissertation* **2014**.
182. SCHADE D., KOTTHAUS J., HUNGELING H., KOTTHAUS J., CLEMENT B.
The peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase (PAM): a novel prodrug strategy for amidoximes and N -hydroxyguanidines?
ChemMedChem **2009**, 4, 1595–1599.

183. 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.
Journal of Organic Chemistry **2000**, 65, 1566–1568.
184. WENKERT E., HUDLICKY T., SHOWALTER H. D. H.
Short syntheses of eburnamonine via β -oxycyclopropylcarbonyl and related intermediates.
Journal of the American Chemical Society **1978**, 100, 4893–4894.
185. WOVKULICH P. M., USKOKOVIĆ M. R.
Total synthesis of acosamine and daunosamine utilizing a diastereoselective intramolecular [3+2] cycloaddition.
Tetrahedron **1985**, 41, 3455–3462.
186. DAYAL B., SALEN G., TOOME B., TINT G. S., SHEFER S., PADIA J.
Lithium hydroxide/aqueous methanol: mild reagent for the hydrolysis of bile acid methyl esters.
Steroids **1990**, 55, 233–237.
187. NICHOLAS S. D., SMITH F.
Acetylation of sugars.
Nature **1948**, 161, 349.
188. JACQUEMARD U., BÉNÉTEAU V., LEFOIX M., ROUTIER S., MÉROUR J.-Y., COUDERT G.
Mild and selective deprotection of carbamates with Bu₄NF.
Tetrahedron **2004**, 60, 10039–10047.
189. Dang Vu Anh, OLOFSON R. A., WOLF P. R., PITEAU M. D., SENET J. P. G.
A simple conversion of 1-chloroethyl carbonates to fluoroformates: value in the preparation of tertiary alkyl fluoroformates.
Journal of Organic Chemistry **1990**, 55, 1847–1851.
190. BODANSZKY M., BODANSZKY A.
The practice of peptide synthesis 2nd ed.
Berlin, New York: *Springer-Verlag*, **1994**.
191. FELIX A. M., HEIMER E. P., LAMBROS T. J., TZOUGRAKI C., MEIENHOFER J.
Rapid removal of protecting groups from peptides by catalytic transfer hydrogenation with 1,4-cyclohexadiene.
Journal of Organic Chemistry **1978**, 43, 4194–4196.
192. JIRGENSONS A., KUMS I., KAUSS V., KALVINS I.
A convenient reagent for *N*-hydroxyguanylation.
Synthetic Communications **1997**, 27, 315–322.
193. 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.
Journal of the Chemical Society, Chemical Communications **1980**, 101.

194. CARPINO L. A., HAN G. Y.
9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group.
Journal of the American Chemical Society **1970**, 92, 5748–5749.
195. ATHERTON E., LOGAN C. J., SHEPPARD R. C.
Peptide synthesis. part 2: procedures for solid-phase synthesis using
 N^α -fluorenylmethoxycarbonylamino-acids on polyamide supports. synthesis of substance P and of
acyl carrier protein 65-74 decapeptide.
Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1 **1981**, 538.
196. CHATTAWAY F. D.
The action of ammonia upon esters.
Journal of the Chemical Society **1936**, 355.
197. KEARNEY P. C., FERNANDEZ M., FLYGARE J. A.
Solid-phase synthesis of 2-aminothiazoles.
Journal of Organic Chemistry **1998**, 63, 196–200.
198. KUNZ H., UNVERZAGT C.
The allyloxycarbonyl (Aloc) moiety: conversion of an unsuitable into a valuable amino protecting
group for peptide synthesis.
Angewandte Chemie International Edition in English **1984**, 23, 436–437.
199. KUNZ H., UNVERZAGT C.
Schutzgruppenabhängige Stabilität von Intersaccharid-Bindungen: Synthese eines Fucosyl-
Chitobiose-Glycopeptids.
Angewandte Chemie **1988**, 100, 1763–1765.
200. STADLWIESER J., ELLMERER-MÜLLER E. P., TAKÓ A., MASLOUH N., BANNWARTH W.
Combinatorial solid-phase synthesis of structurally complex thiazolyhydantoines.
Angewandte Chemie International Edition **1998**, 37, 1402–1404.
201. TAKAMIZAWA A., HIRAI K., MATSUI K.
Studies of the pyrimidine derivatives XXV: the reaction of alkoxycarbonylthiocyanates and related
compounds with the sodium salt of thiamine.
Bulletin of the Chemical Society of Japan **1963**, 36, 1214–1220.
202. TESTA B., MAYER JM, EDS.
Hydrolysis in drug and prodrug metabolism: chemistry, biochemistry, and enzymology.
Zürich: *Helvetica Chimica Acta*, **2003**.
203. HALL H. K.
Correlation of the base strengths of amines.
Journal of the American Chemical Society **1957**, 79, 5441–5444.
204. NEISES B., STEGLICH W.
Einfaches Verfahren zur Veresterung von Carbonsäuren.
Angewandte Chemie **1978**, 90, 556–557.

205. BROWN RIPIN D. H., TEAGER D. S., FORTUNAK J., BASHA S. M., BIVINS N., BODDY C. N., BYRN S., CATLIN K. K., HOUGHTON S. R., JAGADEESH S. T., KUMAR K. A., MELTON J., MUNEEER S., RAO L. N., RAO R. V., RAY P. C., REDDY N. G., REDDY R. M., SHEKAR K. C., SILVERTON T., SMITH D. T., STRINGHAM R. W., SUBBARAJU G. V., TALLEY F., WILLIAMS A.
Process improvements for the manufacture of tenofovir disoproxil fumarate at commercial scale.
Organic Process Research & Development **2010**, 14, 1194–1201.
206. SINGH S. B., RINDGEN D., BRADLEY P., CAMA L., SUN W., HAFEY M. J., SUZUKI T., WANG N., WU H., ZHANG B., WANG L., JI C., YU H., SOLL R., OLSEN D. B., MEINKE P. T., NICOLL-GRIFFITH D. A.
Design, synthesis, and evaluation of prodrugs of ertapenem.
ACS Medicinal Chemistry Letters **2013**, 4, 715–719.
207. SINGH S. B., RINDGEN D., BRADLEY P., SUZUKI T., WANG N., WU H., ZHANG B., WANG L., JI C., YU H., SOLL R. M., OLSEN D. B., MEINKE P. T., NICOLL-GRIFFITH D. A.
Design, synthesis, structure-function relationship, bioconversion, and pharmacokinetic evaluation of ertapenem prodrugs.
Journal of Medicinal Chemistry **2014**, 57, 8421–8444.
208. ZINNER G.
Über *O*-acylierte Hydroximsäure-ester und ihre Spaltung zu unsubstituierten *O*-Acyhydroxylaminen. X. Mitteilung über Hydroxylamin-Derivate.
Archiv der Pharmazie **1960**, 293, 657–661.
209. ZINNER G., NEBEL G., HITZE M.
Über weitere *N*-unsubstituierte *O*-Acyl-hydroxylamine. 41. Mitt. über Hydroxylamin-Derivate.
Archiv der Pharmazie **1970**, 303, 317–320.
210. LAKOWSKI T. M., SZEITZ A., PAK M. L., THOMAS D., VHUIYAN M. I., KOTTHAUS J., CLEMENT B., FRANKEL A.
MS³ fragmentation patterns of monomethylarginine species and the quantification of all methylarginine species in yeast using MRM³.
Journal of Proteomics **2013**, 80, 43–54.
211. GUDD J.
Evaluierung neuer Prodrugprinzipien für Wirkstoffe mit Amidin- und Guanidinfunktionen.
Kiel, *Dissertation* **2015**.
212. BARLOS K., KRONER J., NÖTH H., WRACKMEYER B.
³⁵Cl-NMR-Untersuchungen an Chloriden des Siliciums, Phosphors, Arsens und Schwefels.
Chemische Berichte **1980**, 113, 3716–3723.
213. PERRAS F. A., BRYCE D. L.
Direct investigation of covalently bound chlorine in organic compounds by solid-state ³⁵Cl NMR spectroscopy and exact spectral line-shape simulations.
Angewandte Chemie International Edition in English **2012**, 51, 4227–4230.

214. ROSSINI A. J., MILLS R. W., BRISCOE G. A., NORTON E. L., GEIER S. J., HUNG I., ZHENG S., AUTSCHBACH J., SCHURKO R. W.
Solid-state chlorine NMR of group IV transition metal organometallic complexes.
Journal of the American Chemical Society **2009**, 131, 3317–3330.
215. WEEDING T. L., VEEMAN W. S.
Characterisation of the structure of inorganic chloride salts with chlorine solid state n.m.r.
Journal of the Chemical Society, Chemical Communications **1989**, 946.
216. LIM H.-S., LEE S.-G.
Quantitative analysis of chloride by chlorine-35 NMR spectroscopy.
Bulletin of the Korean Chemical Society **2006**, 27, 972–973.
217. LINDHORST T. K.
Essential of carbohydrate chemistry and biochemistry 3rd ed.
Weinheim: *Wiley-VCH*, **2007**.
218. KARPLUS M.
Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments.
Journal of Chemical Physics **1959**, 30, 11.
219. KARPLUS M.
Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance.
Journal of the American Chemical Society **1963**, 85, 2870–2871.
220. CLEMENT B., KÄMPCHEN T.
¹⁵N-NMR-Studien an 2-Hydroxyguanidinen und Amidoximen.
Chemische Berichte **1985**, 118, 3481–3491.
221. ROTH H. J.
Stereochemie & Arzneistoffe: Grundlagen-Betrachtungen-Auswirkungen.
Stuttgart: *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*, **1998**.
222. BACH R. D., WOLBER G. J.
Theoretical analysis of the barrier to nitrogen inversion in *N*-fluoroformimine and formaldoxime.
Journal of Organic Chemistry **1982**, 47, 245–248.
223. BACH R. D., WOLBER G. J.
Theoretical study of the barrier to nitrogen inversion in *N*-cyano- and *N*-diazoforimine:
mechanism of the Schmidt reaction.
Journal of Organic Chemistry **1982**, 47, 239–245.
224. NSIKABAKA S., HARB W., RUIZ-LÓPEZ M. F.
The role of water on the acid-promoted *E/Z* isomerization of oximes in aqueous solution.
Journal of Molecular Structure: THEOCHEM **2006**, 764, 161–166.
225. RIDINGS J. E.
The thalidomide disaster, lessons from the past.
Methods in Molecular Biology **2013**, 947, 575–586.

226. BLASCHKE G., KRAFT H. P., FICKENTSCHE K., KOHLER F.
Chromatographic separation of racemic thalidomide and teratogenic activity of its enantiomers.
Arzneimittel-Forschung **1979**, 29, 1640–1642.
227. CAMP W. H. de.
The FDA perspective on the development of stereoisomers.
Chirality **1989**, 1, 2–6.
228. HRABAK A., BAJOR T., TEMESI A.
Comparison of substrate and inhibitor specificity of arginase and nitric oxide (NO) synthase for arginine analogs and related compounds in murine and rat macrophages.
Biochemical and Biophysical Research Communications **1994**, 198, 206–212.
229. RECZKOWSKI R. S., ASH D. E.
Rat liver arginase: kinetic mechanism, alternate substrates, and inhibitors.
Archives of Biochemistry and Biophysics **1994**, 312, 31–37.
230. CORRADINI D., EKSTEEN E., EKSTEEN R., SCHOENMAKERS P., MILLER N.
Handbook of HPLC.
New York, Basel: *CRC Press*, **2011**.
231. BODANSZKY M.
Peptide chemistry: a practical textbook.
Berlin, New York: *Springer-Verlag*, **1993**.
232. BARRETT GC, ED.
Chemistry and biochemistry of the amino acids.
Dordrecht: *Springer Netherlands*, **1985**.
233. TÖPKER-LEHMANN K.
 N^{δ} -substituierte Argininderivate: Synthesen und ihre Umsetzungen mit NO-Synthasen und Cytochrom P450.
Kiel, *Dissertation* **1997**.
234. MEYER V. R.
Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie.
Weinheim: *Wiley-VCH*, **2009**.
235. GIL-AV E., TISHBEE A., HARE P. E.
Resolution of underivatized amino acids by reversed-phase chromatography.
Journal of the American Chemical Society **1980**, 102, 5115–5117.
236. WALTON H. F.
Ligand-exchange chromatography: a brief review.
Industrial & Engineering Chemistry Research **1995**, 34, 2553–2554.
237. DAVANKOV V. A., SEMECHKIN A. V.
Ligand-exchange chromatography.
Journal of Chromatography **1977**, 141, 313–353.

238. KOTTHAUS J.
Substituierte L-Arginin-Derivate als Modulatoren des Stickstoffmonoxidgenerierenden Systems.
Kiel, *Dissertation* **2008**.
239. KOTTHAUS J., SCHADE D., KOTTHAUS J., CLEMENT B.
Designing modulators of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): a focus on selectivity over arginase.
Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry **2012**, 27, 24–28.
240. 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.
The Journal of Biological Chemistry **1998**, 273, 8882–8889.
241. BOESLER B., MÜLLER S.
Überexpression rekombinanter Proteine.
Biologie in unserer Zeit **2008**, 38, 287.
242. JANNING W., KNUST E.
Genetik: allgemeine Genetik, molekulare Genetik, Entwicklungsgenetik 2. Aufl.
Stuttgart: *Thieme*, **2004**.
243. FARABAUGH P. J.
Sequence of the *lacI* gene.
Nature **1978**, 274, 765–769.
244. ALTMANN K. S.
Untersuchung der Umsetzung asymmetrisch methylierter Arginine durch rekombinant hergestellte und native Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase-2.
Kiel, *Dissertation* **2014**.
245. HAGE D. S., CAZES J.
Handbook of affinity chromatography 2nd ed.
Boca Raton: *CRC Press*, **2005**.
246. HARRISON R.
Protein purification process engineering.
New York: *Taylor & Francis*, **1993**.
247. BENDE H.
Affinitäts-Chromatographie.
Chemie in unserer Zeit **1974**, 8, 17–25.
248. HOCHULI E., DOBELI H., SCHACHER A.
New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues.
Journal of Chromatography **1987**, 411, 177–184.

249. SMITH M. C., FURMAN T. C., INGOLIA T. D., PIDGEON C.
Chelating peptide-immobilized metal ion affinity chromatography: a new concept in affinity chromatography for recombinant proteins.
Journal of Biological Chemistry **1988**, 263, 7211–7215.
250. Fazekas de St Groth, S, WEBSTER R. G., DATYNER A.
Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips.
Biochimica et Biophysica Acta **1963**, 71, 377–391.
251. DIEZEL W., KOPPERSCHLÄGER G., HOFMANN E.
An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of coomassie brilliant blue.
Analytical Biochemistry **1972**, 48, 617–620.
252. KURIEN BT, SCOFIELD RH, EDS.
Protein electrophoresis: methods and protocols.
New York: *Springer*, **2012**.
253. D'ARCY A.
Crystallizing proteins - a rational approach?
Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography **1994**, 50, 469–471.
254. ZULAUF M., D'ARCY A.
Light scattering of proteins as a criterion for crystallization.
Journal of Crystal Growth **1992**, 122, 102–106.
255. YAMAMOTO S., NAKANISHI K., MATSUNO R.
Ion-exchange chromatography of proteins.
New York: *M. Dekker*, **1988**.
256. FORBES S. P., DRUHAN L. J., GUZMAN J. E., PARINANDI N., ZHANG L., GREEN-CHURCH K. B., CARDOUNEL A. J.
Mechanism of 4-HNE mediated inhibition of hDDAH-1: implications in no regulation.
Biochemistry **2008**, 47, 1819–1826.
257. 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. Q., VALLANCE P.
Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis.
Nature Medicine **2007**, 13, 198–203.
258. WANG Y., MONZINGO A. F., HU S., SCHALLER T. H., ROBERTUS J. D., 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.

259. KNIPP M., VASÁK M.
A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of enzymatically formed citrulline.
Analytical Biochemistry **2000**, 286, 257–264.
260. FEARON W. R.
The carbamido diacetyl reaction: a test for citrulline.
Biochemical Journal **1939**, 33, 902–907.
261. LORENTZ K., KOCH H.
Bestimmung von Ornithin-Carbamyl-Transferase mittels FEARON-Reaktion. I. Citrullinbestimmung.
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine **1971**, 9, 215–219.
262. CHAYEN N. E., SARIDAKIS E.
Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal.
Nature Methods **2008**, 5, 147–153.
263. MYERSON A.
Handbook of industrial crystallization.
Amsterdam: *Elsevier Science*, **2002**.
264. HUI R., EDWARDS A.
High-throughput protein crystallization.
Journal of Structural Biology **2003**, 142, 154–161.
265. MCPHERSON A.
Introduction to protein crystallization.
Methods **2004**, 34, 254–265.
266. DELUCAS L. J., BRAY T. L., NAGY L., MCCOMBS D., CHERNOV N., HAMRICK D., COSENZA L., BELGOVSKIY A., STOOPS B., CHAIT A.
Efficient protein crystallization.
Journal of Structural Biology **2003**, 142, 188–206.
267. BERGFORS T. M.
Protein crystallization 2nd ed.: *International University Line*, **2009**.
268. BENVENUTI M., MANGANI S.
Crystallization of soluble proteins in vapor diffusion for x-ray crystallography.
Nature Protocols **2007**, 2, 1633–1651.
269. BRUMSHTEIN B., GREENBLATT H. M., FUTERMAN A. H., SILMAN I., SUSSMAN J. L.
Control of the rate of evaporation in protein crystallization by the 'microbatch under oil' method.
Journal of Applied Crystallography **2008**, 41, 969–971.
270. CHAYEN N. E.
Comparative studies of protein crystallization by vapour-diffusion and microbatch techniques.
Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography **1998**, 54, 8–15.

271. CHAYEN N. E., SHAW STEWART P. D., BLOW D. M.
Microbatch crystallization under oil: a new technique allowing many small-volume crystallization trials.
Journal of Crystal Growth **1992**, 122, 176–180.
272. LLUIS M., WANG Y., MONZINGO A. F., FAST W., ROBERTUS J. D.
Characterization of C-alkyl amidines as bioavailable covalent reversible inhibitors of human DDAH-1.
ChemMedChem **2011**, 6, 81–88.
273. MURRAY-RUST J., LEIPER J., MCALISTER M., PHELAN J., TILLEY S., SANTA MARIA J., VALLANCE P., McDONALD N.
Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase.
Nature Structural Biology **2001**, 8, 679–683.
274. LESLEY S., WILSON I.
Protein production and crystallization at the joint center for structural genomics.
Journal of Structural Functional Genomics **2005**, 6, 71–79.
275. KOSHLAND D. E.
Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **1958**, 44, 98–104.
276. LITTY F. A., GUDD J., GIRRESER U., CLEMENT B., SCHADE D.
Design, synthesis, and bioactivation of O-glycosylated prodrugs of the natural nitric oxide-precursor *N*^ω-hydroxy-L-arginine.
Manuscript in Preparation **2016**.
277. RENAUDET O., DUMY P.
Expedient synthesis of aminooxylated-carbohydrates for chemoselective access of glycoconjugates.
Tetrahedron Letters **2001**, 42, 7575–7578.
278. 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.
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **2007**, 17, 983–986.
279. ÁGOSTON K., DOBÓ A., RÁKÓ J., KERÉKGYÁRTÓ J., SZURMAI Z.
Anomalous ZEMPLÉN deacylation reactions of α - and β -D -mannopyranoside derivatives.
Carbohydrate Research **2001**, 330, 183–190.
280. SANGER F., NICKLEN S., COULSON A. R.
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proceedings of the National Academy of Sciences **1977**, 74, 5463–5467.

-
281. BRADFORD M. M.
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Analytical Biochemistry **1976**, 72, 248–254.
282. SMITH P. K., KROHN R. I., HERMANSON G. T., MALLIA A. K., GARTNER F. H., PROVENZANO M. D., FUJIMOTO E. K., GOEKE N. M., OLSON B. J., KLENK D. C.
Measurement of protein using bicinchoninic acid.
Analytical Biochemistry **1985**, 150, 76–85.
283. LAEMMLI U. K.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **1970**, 227, 680–685.

ANHANG

Erklärung zu § 8 Abs. 1 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 Prüfverfahrens vorgelegen.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, im Januar 2016

Felix-Alexander Litty

Danksagung

An erster 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 Freiheiten in der Forschung bei gleichzeitig steter Diskussionsbereitschaft und Förderung bedanken.

Herrn Dr. Dennis Schade möchte ich ganz besonders für die intensive Betreuung und die vielen hilfreichen Ratschläge aus Dortmund danken. Dennis' Ideen, Motivation und Kritik förderten meine Forschung in ganz besonderem Maße. Darüber hinaus möchte ich mich bei Dennis für die große Unterstützung beim Schreiben der Publikationen und Posterbeiträge sowie ganz besonders für das ausführliche und kritische Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken.

Bei Herrn Dr. Ulrich Girreser möchte ich mich für seine durchweg hilfsbereite, sympathische und humorvolle Art und Unterstützung bei chemischen Fragestellungen aller Art bedanken, ganz besonders für die großartige Hilfestellung bei spektroskopischen und anderen analytischen Problemen. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Uli für das zügige Korrekturlesen meiner Arbeit sowie die Zusammenarbeit bei den Publikationen und Posterbeiträgen.

Herrn Prof. Dr. Thomas Kunze und Prof. Dr. Eric Beitz danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft und die vielen hilfreichen Ratschläge bei molekularbiologischen und biochemischen Fragestellungen.

Bei Dr. Ingrid Vetter möchte ich mich für die Kooperation bei den Kristallisationsexperimenten mit der hDDAH-1 bedanken.

Ganz besonders danke ich Karin für die unermüdliche Unterstützung bei der rekombinanten Herstellung der DDAH, die vielen wertvollen Tipps beim Arbeiten mit DNA, Bakterien und Proteinen sowie für die tolle Zusammenarbeit im DDAH-Projekt.

Bei Thorsten bedanke ich mich für die vielen gemeinsamen Mittagspausen und die lustige gemeinsame Zeit in Kiel. Die Mensa und Campus Suite werden uns vermissen.

Julia danke ich für die gute Zusammenarbeit im SIGNO-Projekt. Zugleich möchte ich mich bei Lukas, Chris und Tamara für die vielen synthetischen Tipps bedanken. Ina danke ich für die lehrreiche und lustige Zeit, in der ich sie noch zu Studenienzeiten als HiWi unterstützten konnte. Bei Laura, Julia und unserer Kaffeemaschine bedanke ich mich für die unkomplizierte und lustige Zusammenarbeit im Labor und Büro.

Bei Tamara, Jenny, Sonja und Julia bedanke ich mich für das zügige und äußerst sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit.

Tineke, Julia, Sonja, Holger, Danilo und Chris danke ich für die unkomplizierte Betreuung des 5. Semesters und die unterhaltsamen Stunden während der Praktikumszeit.

Bei Martin Clemen bedanke ich mich für die vielen HRMS-Messungen, die er in seiner Freizeit gemessen hat und sehr wichtig für die Charakterisierung meiner Verbindungen waren.

Bei allen Kollegen und ehemaligen Kollegen bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis, die tolle Zusammenarbeit und das freundschaftliche Arbeitsklima. Die unvergessliche Zeit im Arbeitskreis wird mir lange in Erinnerung bleiben.

Dem gesamten Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Beitz danke ich für die vorübergehende Aufnahme in ihren Arbeitskreis während des DDAH-Projektes

Bei Sven, Melissa, Thomas und Björn bedanke ich mich für die exzellente technische Unterstützung im Labor. Der gleiche Dank gilt auch Susanne und Kalle, die mich durch Ihre hilfsbereite und engagierte Art über das fachliche hinaus bei technischen und organisatorischen Dingen unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie, die immer an mich geglaubt und mich jederzeit unterstützt haben und mir stets ein großes Vorbild waren.

Mein letzter und innigster Dank gilt meiner Ehefrau Sonja, die mich bei allen Entscheidungen mit ihrer bewundernswerten verständnisvollen Art und Ruhe unterstützt und nie an mir gezweifelt hat. Ganz besonders bedanke ich mich für die Hingabe und den Rückhalt in der gesamten Zeit meiner Promotion. Vielen, vielen Dank dafür!

Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------------|------------------------|
| Name | Felix- Alexander Litty |
| Geburtstag | 02. Oktober 1985 |
| Geburtsort | Pinneberg |
| Staatsangehörigkeit | Deutsch |

Schulbildung

| | |
|---------------|---|
| 1992 bis 1996 | Grundschule in Bönningstedt |
| 1996 bis 2005 | Wolfgang-Borchert-Gymnasium des Kreises Pinneberg in Halstenbek |
| 2005 | allgemeine Hochschulreife |

Zivildienst

| | |
|---------------|------------------------------|
| 2005 bis 2006 | DRK Tagespflege in Rellingen |
|---------------|------------------------------|

Hochschulausbildung

| | |
|-----------------------------|---|
| April 2007 bis Mai 2011 | Studium der Pharmazie an der Christian- Albrechts-Universität zu Kiel |
| Juli 2011 bis Dezember 2011 | Pharmaziepraktikum bei der Firma G. Pohl Boskamp GmbH & Co. KG |
| Januar 2012 bis Juni 2012 | Pharmaziepraktikum in der Flora Apotheke e.K. in Pinneberg |
| August 2012 | Erteilung der Approbation als Apotheker |

Berufliche Tätigkeit, Promotion und Weiterbildung

| | |
|---------------------|--|
| seit September 2012 | wissenschaftlicher Mitarbeiter am pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. B. Clement |
| vorauss. April 2016 | Fachapotheker für pharmazeutische Analytik |

Kurzfassung

Stickstoffmonoxid (NO) spielt bei einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse eine zentrale Rolle. Eine Dysregulation dieses biologisch wichtigen Moleküls ist mit der Pathogenese unterschiedlichster Krankheiten assoziiert. Die Herausforderung bei der Entwicklung neuer Modulatoren des NO-generierenden Systems besteht darin, nur bestimmte NO-abhängige Effekte zu beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Konzepte für die Entwicklung neuer Modulatoren zur Beeinflussung der NO-Verfügbarkeit verfolgt.

Die durch posttranslationale Methylierung von Argininresten gebildeten und durch Proteolyse freigesetzten endogenen Inhibitoren der NO-Synthasen (NOS) N^{ω},N^{ω} -Dimethyl-L-arginin (ADMA) und N^{ω} -Monomethyl-L-arginin (NMMA) sind heutzutage gut untersucht und stellen wichtige Markersubstanzen bei kardiovaskulären Erkrankungen dar. Die biologische Funktion des erst kürzlich in humanem Plasma erstmalig nachgewiesenen und quantifizierten N^{δ} -Methyl-L-arginins (NDMA) ist noch weitestgehend unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine effiziente Synthese entwickelt werden, die sowohl NDMA als auch dessen potentiellen Metaboliten N^{δ} -Methyl-L-ornithin in acht bis zehn Stufen und guten Gesamtausbeuten von 20 % sowie einer bisher erstmalig beschriebenen Enantiomerenreinheit von über 99 % *ee* zugänglich machte. Dies wurde durch den Einsatz einer 2-Nitrophenylsulfonamid-Schutzgruppe ermöglicht, die die selektive Monomethylierung der N^{δ} -Position zuließ und unter schonenden Bedingungen, ohne Risiko einer Racemisierung, abgespalten werden konnte.

Natürliches N^{ω} -Hydroxy-L-arginin (NOHA) stellt das beste Substrat der NOS dar, ist aber aufgrund seines schlechten Arzneistoffcharakters, besonders für die perorale Applikation, therapeutisch schwer einsetzbar. Daher ist die Entwicklung von stabilen und bioverfügbaren NOHA-Prodrugs von großem pharmakologischem Wert. Es konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass Prodrugs mit N^{ω} -Carbamatstruktur nicht bioaktiviert wurden. In der vorliegenden Arbeit gelang es durch ein neues orthogonales Schutzgruppenkonzept eine Synthese zu entwickeln, die Prodrugs des N^{ω} -Hydroxy-L-arginins durch *O*-Konjugation der Hydroxyguanidinfunktion mit verschiedenen acetalischen Gruppen und ohne Carbamatstruktur zugänglich machte. Durch Evaluierung verschiedener Schutzgruppenkonzepte anhand einfacher Modellverbindungen erwies sich die Einführung einer Alloc-Schutzgruppe als besonders effizient, da dessen schonende Abspaltung sowohl mit der *O*-glycosidischen Bindung als auch mit den Schutzgruppen der α -Aminosäurefunktion kompatibel war. Durch den Angriff eines Palladium(0)-Katalysators bildete sich zunächst ein π -Allyl-Komplex, der sich unter Zugabe von Dimedon als Allylgruppenakzeptor auflöste und so das carbamatfreie *N*-Hydroxyguanidin lieferte. Diese Strategie ermöglichte die Darstellung der ersten carbamatfreien Galactosyl- und Glucosyl-Prodrugs in fünf bis sieben Stufen und guten Gesamtausbeuten. Die breite Anwendbarkeit dieser neuen effizienten Synthese zeigte sich schlussendlich in der Darstellung des ersten Prodrugs mit offener, nicht-zyklischer Acetalstruktur, welches eine Glycosidase-unabhängige Bioaktivierung ermöglicht. Diese stabilen und bioaktivierbaren *O*-acetalischen NOHA-Prodrugs könnten zukünftig einen neuen nebenwirkungsarmen pharmazeutischen Ansatz zur Behandlung NO-defizitärer kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen.

Die humane hDDAH-1 ist ein erfolgsversprechendes Target bei der Behandlung von NO-defizitärer Erkrankungen. Das im Arbeitskreis CLEMENT entwickelte AbMEG stellt einen potenten und selektiven Hemmstoff der hDDAH-1 dar. Um dessen Bindemodus im katalytischen Zentrum der hDDAH-1 besser verstehen zu können, wurde der Inhibitor mit dem Enzym cokristallisiert. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit die hDDAH-1 rekombinant hergestellt, zweifach chromatografisch gereinigt und anschließend cokristallisiert. Durch eine hochpräzise Strukturaufklärung mit Auflösungen von bis zu 1,8 Å gelang es, die für die Affinität und Selektivität entscheidenden Strukturmerkmale von AbMEG herauszuarbeiten.

Abstract

Nitric oxide (NO) is involved in a plethora of physiological and pathophysiological processes. Dysregulations of this key second messenger are associated with various disease states. Therefore, endogenous NO levels need to be strictly regulated. The challenge in developing useful modulators of the NO generating system is the required selectivity for distinct NO dependent effects. Hence, the aims of this work were the development of different concepts for novel modulators to influence NO availability.

Methylated arginines such as ADMA (asymmetric N^{ω},N^{ω} -dimethyl-L-arginine) and NMMA (N^{ω} -monomethyl-L-arginine) are formed by posttranslational methylation of arginine residues in proteins and finally released by proteolysis to provide endogenous inhibitors of nitric oxide synthases (NOSs). In fact, ADMA represents a well-appreciated marker for cardiovascular diseases (CVDs). In contrast, the biological relevance of an N^{δ} -methylated arginine species such as N^{δ} -methyl-L-arginine (NDMA) is not well-understood. Recent studies suggest a physiological role in humans since NDMA has been first detected and quantified in human plasma. Thus, an efficient synthetic strategy could be developed to afford NDMA and its putative metabolite N^{δ} -methyl-L-ornithine in eight to ten steps with good overall yields of about 20 % and a first described enantiomeric purity of more than 99 % *ee*. This was accomplished by introduction of a 2-nitrobenzenesulfonamid protecting group that enabled selective monomethylation of the N^{δ} -position and could be removed under mild conditions with minimal risk for racemization.

Naturally occurring N^{ω} -hydroxy-L-arginine (NOHA) is the best substrate of NO-synthases, but direct therapeutic application is limited by its inferior drug-like properties, evoked by NOHAs deleterious chemical and metabolic stability. To overcome these shortcomings, the development of stable and bioavailable prodrugs provides a pharmacologically valuable strategy. In previous works it came out that prodrugs of NOHA with carbamate structure were not bioactivated *in vitro*. Hence, in this work the establishment of a straightforward synthetic concept was pursued that provided a series of diversely substituted NOHA prodrugs by *O*-conjugation of the hydroxyguanidine moiety with different acetalic groups such as monosaccharides and without N^{ω} -carbamate structure. Therefore, an orthogonal protecting group strategy was needed that would allow efficient synthesis of the *N*-hydroxyguanidine group, but also ensured mild cleavage conditions that were compatible with the carbohydrate conjugate and α -amino acid protecting groups. We reasoned that the Alloc protecting group could fulfill these requirements by an attack of a palladium(0) catalyst to afford π -allyl palladium complexes which can then be trapped by mild nucleophiles such as dimedone. This synthetic strategy allowed access to the first described carbamate-free galactosyl and glucosyl prodrugs of NOHA in five to seven steps and good overall yields. The widespread applicability of this efficient concept was finally demonstrated by synthesis of a NOHA prodrug with open, non-cyclic acetalic structure which provides a glycosidase-independent bioactivation. These stable and bioactivatable galactosyl- and glucosyl prodrugs of NOHA may furnish a novel pharmaceutical approach for the treatment of NO dependent CVDs with a less potential for side effects.

Human DDAH-1 is a promising target for the treatment of diseases caused by an excess of NO. AbMEG represents a potent and highly selective inhibitor of hDDAH-1 which was developed by our group. To understand its mode of action in the catalytic site of hDDAH-1, the inhibitor was cocrystallized with the enzyme. Hence, in this work the hDDAH-1 was overexpressed, chromatografically purified and finally cocrystallized with AbMEG. By high-precision structure determination with resolutions up to 1.8 Å it was possible to dissect the key structural requirements of AbMEG for high affinity-binding to hDDAH-1 while ensuring a desired selectivity towards NOSs and arginase.