
**Neue Darstellungswege zu
Hypothalamusregulationshormonen und
Enkephalinen**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2000

vorgelegt von
SARINA KRAUß

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2000

Dekan: Professor Dr. U. Nagel

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h.c. W. Voelter

2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Weber

Für meine Eltern und Geschwister

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Voelter in der Zeit von März 1989 bis April 2000 mit Unterbrechung an der Abteilung für Physikalische Biochemie des Physiologisch-chemischen Instituts der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Voelter danke ich herzlich für das interessante Thema, seine grosszügige und freundliche Unterstützung und sein stetes Interesse an dieser Arbeit.

Danksagungen

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Hartmut Echner für hilfreiche Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Hans-Jürgen Kohlbau für seine stets freundliche Unterstützung während der Zeit der Zusammenfassung dieser Arbeit.

Desweiteren möchte ich folgenden Mitarbeitern und Fakultätsangehörigen für ihre wertvolle Unterstützung danken:

Herrn W. Bock für die Elementaranalysen.

Herrn H. Bartholomä, Herrn R. Müller für die FD-MS-Messungen.

Herrn B. Maier für die Aufnahmen der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren.

Herrn P. Niederer möchte ich an dieser Stelle ganz besonders für seine stete Ansprechbarkeit und Unterstützung während meiner Zeit an der Universität Tübingen danken.

Frau H. Weber und Frau M. Schick danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft bei organisatorischen und verwaltungstechnischen Problemen.

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG	1
I. 1. Peptidhormone des Hypothalamus - Bildungsstätten der Hypothalamus-Regulationshormone	1
I.2. Opioide Peptide	1
II. ALLGEMEINER TEIL	1
II.1. Die Hypothalamus-Regulations-Hormone	2
II.1.1. Die Entdeckung der Hypothalamus-“Releasing“-Hormone	2
II.1.2. Physiologie des LH/FSH-“Releasing“-Hormons und Aufbau des hypothalamisch-hypophysären Systems	5
II.1.3. Struktur des LH/FSH-“Releasing“-Hormons	7
II.2. Opioide Peptide	8
II.2.1. Das endogene schmerzhemmende System	8
II.2.2. Opioid-Rezeptoren	9
II.2.3. Endorphine	10
II.2.4. Physiologische Wirkung der Enkephaline	11
II.2.5. Struktur der Enkephaline	12
II.3. Chemische Peptidsynthese	13
II.3.1. Festphasen-Peptidsynthese an polymeren Trägern	13
III. THEMENSTELLUNG - BEGRÜNDUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21
IV. SPEZIELLER TEIL	22
IV.1. Aminoschutzgruppen des Urethan-Typs	22
IV.2. Die 1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl(Adpoc)-N^α-Aminoschutzgruppe	22
IV.2.1. Chemische Struktur und Eigenschaft der Adpoc-Gruppe	22
IV.2.2. Synthese der Ausgangsverbindung und Einführungsreagenzien	23
IV.2.3. Einführung der Adpoc-Gruppe in die Aminosäuren	24
IV.2.4. N ^α -Adpoc-N ^ω -2,4,6-triisopropylbenzylsulfonyl-L-arginin (Adpoc-Arg(Tip))	27
IV.2.5. N ^α -Adpoc-N(π)-t-butoxymethyl-L-histidin (Adpoc-L-His(Bum)-OH)	28
IV.2.6. 1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl-L-Pro-OH und 1-(1-Adamantyl)-1-methyl-ethoxycarbonyl-L-Lys(Boc)-OH•DCHA	30
IV.2.7. ¹³ C-NMR-Spektroskopie von Adpoc-Aminosäuren	31
IV.2.8. Festphasensynthese von LH-RH unter Verwendung der Adpoc-N ^α -Aminoschutzgruppe und der säurelabilen N-(Fluorenyl-9-methyl-oxycarbonyl)-[4-methoxy-4'-(γ-carboxypropyloxy)]-benzhydrylamin-Ankergruppe	33
IV.2.8.1. Schutzgruppentaktik für die eingesetzten Aminosäuren	33
IV.2.8.2. Synthesestrategie für die Festphasensynthese	33
IV.2.8.3. Bestimmung der Beladung des Harzes an Fmoc-Amid	34
IV.2.8.4. Festphasen-Synthese von LH-RH mit der Adpoc-Strategie	34

IV.2.8.5. Festphasensynthese von LH-RH mit der Fmoc-Strategie	36
IV.3. Die 1-(4-tert-Butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl(p-Bumeoc-)-N^α-Aminoschutzgruppe	39
IV.3.1. Abhängigkeit der Säurelabilität der Urethan-Aminoschutzgruppen von der Molekülstruktur	39
IV.3.2. Quantifizierung der Säurelabilität in Abhängigkeit der Substituenten in aromatischen Urethan-Systemen	40
IV.3.3. Synthese der Ausgangsverbindung und Einführungsreagenzien der p-Bumeoc-Schutzgruppe	43
IV.3.4. Felddesorptions-Massenspektrometrie	50
IV.3.5. Darstellung und chemische Eigenschaften p-Bumeoc-geschützter Aminosäuren	53
IV.3.6. ¹³ C-NMR-Spektroskopie von p-Bumeoc-Aminosäuren	66
IV.3.7. Bestimmung der Abspaltungsgeschwindigkeit der p-Bumeoc-Gruppe	72
IV.3.8. Einfluss der Säurenatur- und Konzentration auf die Spaltgeschwindigkeit	73
IV.3.9. Synthese der p-Bumeoc-Aminosäure-N-Hydroxysuccinimidester	74
IV.3.10. Festphasensynthese von Leucin-Enkephalinamid unter Verwendung der säurelabilen p-Bumeoc-N ^α -Aminoschutzgruppe und des säurelabilen N-(Fluorenyl-9-methyl-oxycarbonyl)-[4-methoxy-4'-(γ-carboxypropyloxy)]-benzhydrylamin-Ankers	74
IV.3.10.1. Synthesestrategie und Kupplungsreagenzien	74
IV.3.10.2. Festphasensynthese mit p-Bumeoc-geschützten Aminosäuren	75
IV.3.10.3. Eigenschaften der p-Bumeoc-Schutzgruppe in der Festphasensynthese	76
IV.3.10.4. Abspaltung des Leucin-Enkephalinamid vom Träger(Harz)	76
IV.4. Die 1-(4-Isopropylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl(Iso-Meoc-)-N^α-Aminoschutzgruppe	77
IV.4.1. Chemische Struktur und Eigenschaften der Iso-Meoc-Aminoschutzgruppe	78
IV.4.2. Synthese der Ausgangsverbindung und Einführungsreagenzien der Iso-Meoc-Schutzgruppe	79
IV.4.3. Darstellung von Iso-Meoc-geschützten Aminosäuren	87
IV.5. Vergleich der Stabilität der Phenylcarbonate verschiedener Schutzgruppen des Urethantyps	89
IV.5.1. Synthese von Adpoc- und t-Bumeoc-phenylcarbonat und deren Eignung als Einführungsreagenzien	89
IV.5.1.1. Synthese des Adpoc-phenylcarbonats	89
IV.5.1.2. Synthese des t-Bumeoc-phenylcarbonats	89
IV.6. Die 1-(3,5-Di-isopropylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl (Diiso-Meoc)-„Schutzgruppe“	91
IV.6.1. Synthese der Ausgangsverbindung	92
V. EXPERIMENTELLER TEIL	93
V.1. Spektroskopische Methoden	93
V.1.1. Kernresonanzspektroskopie	93
V.1.2. Massenspektroskopie	93
V.1.3. Drehwerte	93
V.2. Chromatographische Methoden	93
V.2.1. Dünnschichtchromatographie	93

V.2.2. Adsorptionschromatographie	94
V.2.3. Hochdruckflüssigkeitschromatographie	94
V.3. Analytische Methoden	94
V.3.1. Elementaranalysen	94
V.3.2. Aminosäureanalysen	94
V.3.3. Racemattest	95
V.4. Sonstige Geräte	95
V.5. Chemikalien	95
V.6. Festphasensynthese von LH-RH mit Adpoc- und Fmoc-Strategie	96
V.6.1. Darstellung von Adamantan-carbonsäure-(1)-methylester	96
V.6.2. Herstellung von 2-(1-Adamantyl)-2-propanol	97
V.6.3. Synthese von Fluorameisensäure-2-adamantyl(1)-propyl(2)-ester (Adpoc-F)	98
V.6.4. Allgemeine Herstellung der Adpoc-Aminosäuren über Adpoc-F	98
V.6.5. Kristallstruktur und Analyse von Adpoc-L-Pro-OH	101
V.6.6. Kristallstruktur und Analyse von Adpoc-L-Lys(Boc)-OH•DCHA	106
V.6.7. Stabilitätsuntersuchung einer geschützten Aminosäure am 4-Methoxy-4'-(γ -carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Harz (D-1600)	113
V.6.8. Festphasensynthese von LH-RH am 4-Methoxy-4'-(γ -carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Harz mit Adpoc-Strategie (Adpoc-Synthese 1 und 2)	114
V.6.9. Festphasensynthese von LH-RH am 4-Methoxy-4'-(γ -carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Harz mit der Fmoc-Strategie	117
V.6.10. Darstellung von [2-Adamantyl(1)-propyl(2)-phenyl-carbonat] (Adpoc-OPh)	118
V.6.11. Allgemeine Herstellung der Adpoc-Aminosäuren über das Adpoc-phenylcarbonat	119
V.7. Festphasensynthese von Leucin-Enkephalinamid am 4-Methoxy-4'-(γ-carboxy-propyloxy)-benzhydrylamin-Harz unter Verwendung der säurelabilen p-Bumeoc-N$^{\alpha}$-Aminoschutzgruppe	120
V.7.1. Darstellung der N $^{\alpha}$ -[1-(4-tert-Butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl]-(p-Bumeoc-) Aminosäurederivate	120
V.7.1.1. Darstellung von 4-tert-Butylbenzoesäuremethylester	120
V.7.1.2. Darstellung von 2-(4-tert-Butylphenyl)-2-propanol (p-Bumeoc-OH)	120
V.7.1.3. Darstellung von Fluorameisensäure-[1-(4-tert-butylphenyl)-1-methylethyl]ester (p-Bumeoc-F)	121
V.7.1.4. Allgemeine Herstellung der p-Bumeoc-Aminosäuren über p-Bumeoc-F	122
V.7.1.5. Darstellung von 1-[2-tert-Butylphenyl-(4)-propyl-(2)]-phenylcarbonat	122
V.7.1.6. Darstellung der N $^{\alpha}$ -[1-(4-tert-Butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl]-(p-Bumeoc-)-geschützten Aminosäuren	123
V.7.1.7. Bestimmung der Spaltgeschwindigkeit (mittels HPLC) und nach der allgemeinen Abspaltungsvorschrift	128
V.7.1.8. Synthese von N $^{\alpha}$ -[1-(4-tert-Butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-Leu-N-hydroxy-succinimidester (p-Bumeoc-L-Leu-OSu)	129
V.7.1.9. Abspaltung der Fmoc-Gruppe vom Harz (D-1600)	129
V.7.1.10. Bestimmung der Harzbeladung	129
V.7.1.11. Protokoll zur Festphasen-Synthese von Leucin-Enkephalinamid (L-Tyrosin(tBu)-L-glycinyl-L-glycinyl-L-phenylalanyl-L-leucinamid)	130
V.7.1.12. Darstellung von L-Tyrosin(tBu)-L-glycinyl-L-glycinyl-L-phenylalanyl-L-leucinamid	131

V.7.2. Kristallstruktur und Analyse von [2-(4-Tertiärbutylphenyl)-propyl-2)]-phenylether	132
V.8. Darstellung von N^α-Iso-Meoc-geschützten Aminosäuren	138
V.8.1. Darstellung von 4-Isopropylbenzoesäuremethylester	138
V.8.2. Darstellung von 2-(4-Isopropylphenyl)-2-propanol	139
V.8.3. Darstellung von [2-Isopropylphenyl-(4)-propyl-(2)]-phenylcarbonat	139
V.8.4. Darstellung von Iso-Meoc-L-Ala-OH•DCHA	140
V.8.5. Darstellung von Iso-Meoc-L-Leu-OH•DCHA	140
V.9. t-Bumeoc-geschützte Aminosäuren über t-Bumeoc-OPh	140
V.9.1. Darstellung von tert-Butylchlorid	140
V.9.2. Darstellung von 3,5-Di-tert-butyltoluol	140
V.9.3. Darstellung von 3,5-Di-tert-butylbenzoesäure	141
V.9.4. Darstellung von 3,5-Di-tert-butylbenzoesäuremethylester	142
V.9.5. Darstellung von 2-(3,5-Di-tert-butylphenyl)-2-propanol (t-Bumeoc-OH)	142
V.9.6. Darstellung von [2-Di-tert-butylphenyl(3,5)-propyl-(2)]-phenylcarbonat (t-Bumeoc-phenylcarbonat)	143
V.9.7. Darstellung von t-Bumeoc-L-Leu-OH•DCHA	143
V.10. Versuch zur Darstellung von N^α-[1-(3,5-Di-isopropylphenyl)-1-methyl-ethoxycarbonyl]-Aminosäurederivaten	144
V.10.1. Darstellung von 3,5-Di-isopropyltoluol	144
VI. ZUSAMMENFASSUNG	145
VII. LITERATURVERZEICHNIS	148

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
Adpoc	1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl
ASA	Aminosäureanalyse
atm	Atmosphäre
Ber.	berechnet
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
BOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)- phosphoniumhexafluorophosphat
BOP-Cl	N,N-bis[2-oxo-3-oxazolidinyl]phosphorodiamid-chlorid
Bpoc	1-(4-Biphenyl)-1-methylethoxycarbonyl
Bum	(π)-tert-Butoxymethyl
t-Bumeoc	1-(3,5-Di-tert-butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl
tBu	tert-Butylether
-Bzl	Benzylether
CCD	Multiplikative Verteilung
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCCI	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCHA	N,N-Dicyclohexylamin
DCM	Dichlormethan
Ddz	1-(3,5-Dimethoxyphenyl)-1-methylethoxycarbonyl
DIEA	N,N-Diisopropyl-ethylamin
DMA	N,N-Dimethylacetamid
DMAP	4-(N,N-Dimethylamino)-pyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
d. Th.	der Theorie
DVB	Divinylbenzol
EDT	Ethandithiol
EE	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
FAB-MS	“Fast atom bombardment“- Massenspektrometrie
FD-MS	Feldesorptions-Massenspektrometrie
Fmoc	9-Fluoromethyloxycarbonyl
Gef.	gefunden
h	Stunde
HBTU	Hydroxybenzotriazol-1-yl-oxy-tetra-(dimethylamino)uronium- hexafluorophosphat
HIPE	high internal phase emulsion
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	N-Hydroxysuccinimid
HPLC	Hoch-Leistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
i. Vak.	im Vakuum

I. EINLEITUNG

IR	Infrarot
IS-MS	Ionen-Spray-Massenspektrometrie
Kap.	Kapitel
m	Multilett
Me-	Methyl
MeO-	Methoxy
MeOH	Methanol
min	Minuten
MPA	Mercaptopropionic acid
Mtr	4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzolsulfonyl
NMR	Kernmagnetische Resonanz
-OBzl	Benzylester
-ODhbt	3-Hydroxy-2,3-dihydro-4-oxo-benzotriazinester
-OMe	Methylester
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
-OPfp	Pentafluorphenylester
-OSu	N-Hydroxysuccinimidester
-OtBu	tert-Butylester
-OTcp	2,4,5-Trichlorphenylester
-OTDO	2,5-Diphenyl-2,3-dihydro-3-oxo-4-hydroxythiophendioxidester
PS	Polystyrol
Rf	Retentionsfaktor
RIA	Radioimmunoassay
RT	Retentionszeit
s	Singulett
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett
tert	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
Tip	2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonyl
Trt	Trityl
UV	Ultraviolett
Z-	Benzyloxycarbonyl

Die Abkürzungen für Aminosäuren entsprechen der IUPAC-Nomenklatur: Eur. J. Biochem. 138 (1984) 9.

I. EINLEITUNG

I.1. Peptidhormone des Hypothalamus - Bildungsstätten der Hypothalamus-Regulationshormone

Die vegetativen Regulationen im Dienste der Erhaltung, Fortpflanzung und Arbeitsbereitschaft des Organismus werden zum Teil über das endokrine System und teilweise über das vegetative Nervensystem vermittelt. Dieses Zusammenwirken der beiden Systeme erfordert eine enge Koordination, für die der Hypothalamus zuständig ist. Hier liegen übergeordnete vegetative Zentren, die einerseits die Aktivität von Sympathikus und Parasympathikus und andererseits die Hormonabgabe der Hypophyse beeinflussen.

Hypothalamus und Hypophyse zusammen bilden eine übergeordnete Funktionseinheit für hormonale Regulation.

Dem Hypothalamus, einem Gebiet des Zwischenhirns, kommt innerhalb des endokrinen Systems die Bedeutung eines Steuerungs- und Integrationszentrums zu, in welchem affektive Reize und Impulse des Menschen und Rückmeldungen von Schilddrüse, Nebennierenrinde und Gonaden über den aktuellen Hormonspiegel im Blutplasma koordiniert und verarbeitet werden.

Das Hormonsystem dient biologischen Individuen neben dem Nerven- und dem Immunsystem als Kommunikationsweg. Ungefähr zwei Drittel aller bisher bekannten bioregulatorischen Faktoren haben Peptidstruktur. Zur Übertragung und Weiterleitung solcher Impulse werden vor allem in der Eminentia mediana, aber auch in verschiedenen anderen Kerngebieten, kurzkettige Peptide gebildet. Die kleinzelligen Kerngebiete des Nucleus infundibularis sind die Bildungsstätten der Hypothalamus-Regulationshormone, welche über ein spezialisiertes Gefäßsystem zum Hypophysenvorderlappen gelangen und dort die Bildung und Freisetzung bzw. Hemmung verschiedener Hormone bewirken (Tab. 1).

I.2. Opioid Peptide

Körpereigene Peptide kommen auch in anderen Teilen unseres Gehirns vor: Im Mittelhirn, das als Schmerzzentrum angesehen wird, wurden sogenannte opioid Peptide isoliert. Man vermutet, dass Enkephaline in irgend einer Weise an der Regulation des Schmerzempfindens beteiligt sein könnten. Trotz intensiver Forschung ist man aber noch weit davon entfernt, die physiologische Bedeutung der endogenen opioiden Peptide zu verstehen. Es ist anzunehmen, dass die Enkephaline aufgrund ihres Vorkommens in gewissen Gehirnregionen, also z. B. im Mittelhirn, bei der Übertragung von Sinnesreizen eine wichtige Funktion haben.

II. ALLGEMEINER TEIL

II.1. Die Hypothalamus-Regulations-Hormone

II.1.1. Die Entdeckung der Hypothalamus-“Releasing“-Hormone

Bereits vor 50 Jahren wurde postuliert^{1, 2}, dass die Hormonsekretion des Hypothalamusvorderlappens durch Substanzen, die im Hypothalamus gebildet werden, kontrolliert wird.

Der Hypothalamus ist ein kleines Gebiet des Zwischenhirns (Diencephalon), welches den hinteren Teil des Prosencephalons³ bildet, welches aus Hypothalamus, Thalamus, Metathalamus und Epithalamus besteht. Es wurde nachgewiesen², dass die Unterbrechung der Portalgefäße zwischen Eminentia mediana und der Hypophyse eine Veränderung der Funktion folgender Erfolgsorgane bewirkt: Schilddrüse, Nebennieren und Gonaden.

Daraus folgerte man, dass im Hypothalamus erzeugte hormonale Substanzen im Bereich der Eminentia mediana an die Portalgefäße abgegeben werden und damit die Hypophyse beeinflussen. Der Hauptregulator des endokrinen Systems ist also der Hypothalamus, dessen Hormone auch als “Releasing“ - Hormone oder “Inhibiting“ - Hormone bezeichnet werden, weil die im Hypothalamus gebildeten Hormone über den Hypophysenstiel zum Hypophysenvorderlappen transportiert werden und dort Hypophysenhormone freisetzen oder deren Freisetzung hemmen.

Daraufhin wurde eine Reihe von Hypothalamushormonen postuliert⁴, die inhibierenden oder freisetzenden Charakter besitzen. Einige ausgewählte Beispiele sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Man unterscheidet innerhalb des Hypothalamus drei mediolateral angeordnete Zonen: eine parventrikuläre, eine mediale und eine laterale Zone. Die parventrikuläre Zone ist dünn und um den 3. Ventrikel organisiert. Sie enthält eine grosse Zahl von Kerngebieten, die z. T. in den medialen Hypothalamus übergehen. Im letzteren können mehrere Kerngebiete, die vom vorderen bis zum hinteren Hypothalamus angeordnet sind, unterschieden werden (Abb. 1). Die Regio praeoptica gehört entwicklungs geschichtlich zum Endhirn, wird aber meistens zum Hypothalamus gerechnet. Im lateralen Hypothalamus kann man keine Kerngebiete unterscheiden. Die diffus angeordneten Neurone im lateralen Hypothalamus werden vom medialen Vorderhirnbündel durchzogen.

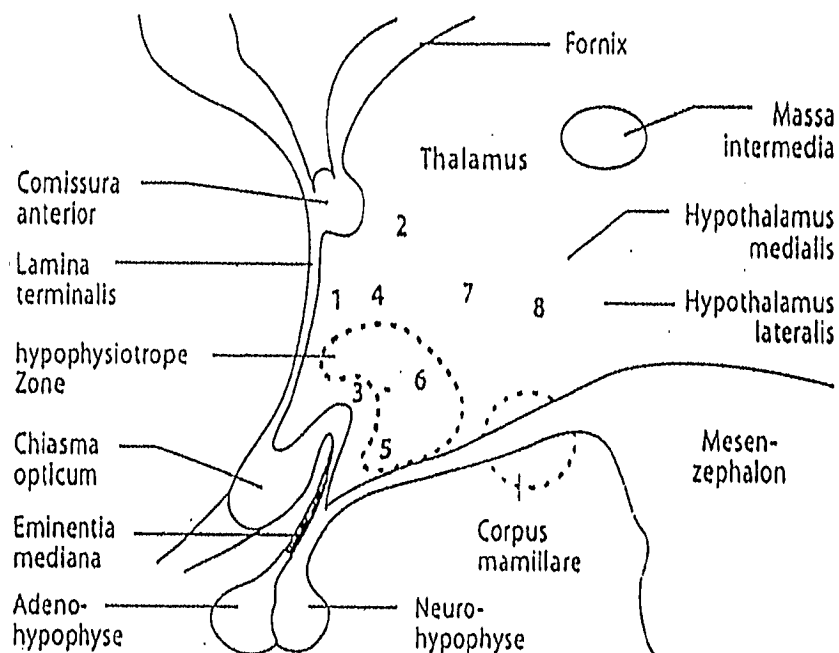


Abb. 1. Kerngebiete des Hypothalamus. Sagittalschnitt durch den dritten Ventrikel. Schematische Darstellung. 1. Nucleus praeropticus (Area präoptica); 2. Nucleus paraventricularis; 3. Nucleus supraopticus; 4. Nucleus anterior (Area anterior); 5. Nucleus infundibularis; 6. Nucleus ventromedialis; 7. Nucleus dorsomedialis; 8. Nucleus posterior (Area posterior). Nach BENNINGHOFF-GOERTLER, Lehrbuch der Anatomie des Menschen, Band III, Urban & Schwarzenberg (1977).

Die im Hypothalamus gebildeten Oligopeptid-Hormone, sog. Liberine ("releasing factors") und Statine ("release inhibiting factors"), werden über Nervenendigungen in das Portalblut der Hypophyse abgegeben. Über diesen Weg erreichen die Liberine und Statine Zellen im Hypophysenvorderlappen, die sog. Tropine (glandotrope Hormone) bilden, welche schliesslich die entsprechenden Hormondrüsen in der Peripherie beeinflussen. Die durch die peripheren Hormone beeinflussten Stoffwechselfparameter wirken z. T. auf den Hypothalamus zurück. Darüber hinaus üben die peripheren Hormone einen hemmenden Einfluss auf Hypothalamus und Hypophyse aus. Schliesslich kann das glandotrope Hormon oder sogar das Liberin selbst die Liberinausschüttung im Hypothalamus hemmen.

In Tab. 1 sind Releasing- und Release-Inhibiting-Hormone zusammengestellt.

II. ALLGEMEINER TEIL

Tab. 1. Freisetzende und hemmende Hypothalamus-Hormone für die Steuerung der Adenohypophysen-Funktion.

A) RELEASING-HORMONE (LIBERINE)

Bezeichnung	Abk.	Synonyma	setzt frei
Soma(to)tropin- Releasing- Hormon	GH-RH	Somatoliberin, Growth-Hormone- Releasing-Hormon	Soma(to)tropin (STH)
Thyreotropin- Releasing- Hormon	TRH	Thyroliberin	Thyreotropin (TSH), daneben Somatotropin und Prolactin
Corticotropin- Releasing- Hormon	CRH	Corticoliberin	Corticotropin (ACTH)
Gonadotropin- Releasing-Hormon	GnRH (LH-RH)	Gonadoliberin, Gonadorelin	FSH + LH (ICSH)

B) RELEASE-INHIBITING-HORMONE (STATINE)

Bezeichnung	Abk.	Synonyma	hemmt Freisetzung von
Soma(to)tropin- Release-Inhibiting- Hormon	GIH (GH-IH)	Somatostatin	Somatropin (STH), daneben TSH und Corticotropin
Melanotropin- Release-Inhibiting- Hormon	MIH (MSH-IH)	Melanostatin	Melanotropin (MSH)
Prolactin-Release- Inhibiting-Hormon =Dopamin	PIH (PRL-IH)	Prolactostatin	Prolactin (LTH)

II. ALLGEMEINER TEIL

II.1.2. Physiologie des LH/FSH-“Releasing“-Hormons (1) und Aufbau des hypothalamisch-hypophysären Systems

Der Hypothalamus bildet die unterste Etage und den Boden des Zwischenhirns. Er besteht aus einem vorderen und einem mittleren Teil mit markarmen und einem hinteren Teil mit markreichen Nervenfasern (Abb. 2). Im vorderen Teil, der Regio hypothalamica anterior liegen der Nucleus supraopticus und der Nucleus paraventricularis. In ihren Neuronen wird ein Neurosekret gebildet, das durch axonalen Transport in den Hypophysenhinterlappen (s. u.) gelangt. Kerne der Regio hypothalamica intermedia (u. a. Nucleus infundibularis) steuern die Hormonsekretion in der Hypophyse. Die von ihnen freigesetzten Releasing-Hormone und Release-Inhibiting-Hormone (s. u.) gelangen zur Hypophyse. Die Regio hypothalamica posterior, welche die Kerne der Corpora mamillaria umfasst, steht mit vegetativen Zentren im Mesenzephalon und der Medulla oblongata in Verbindung.

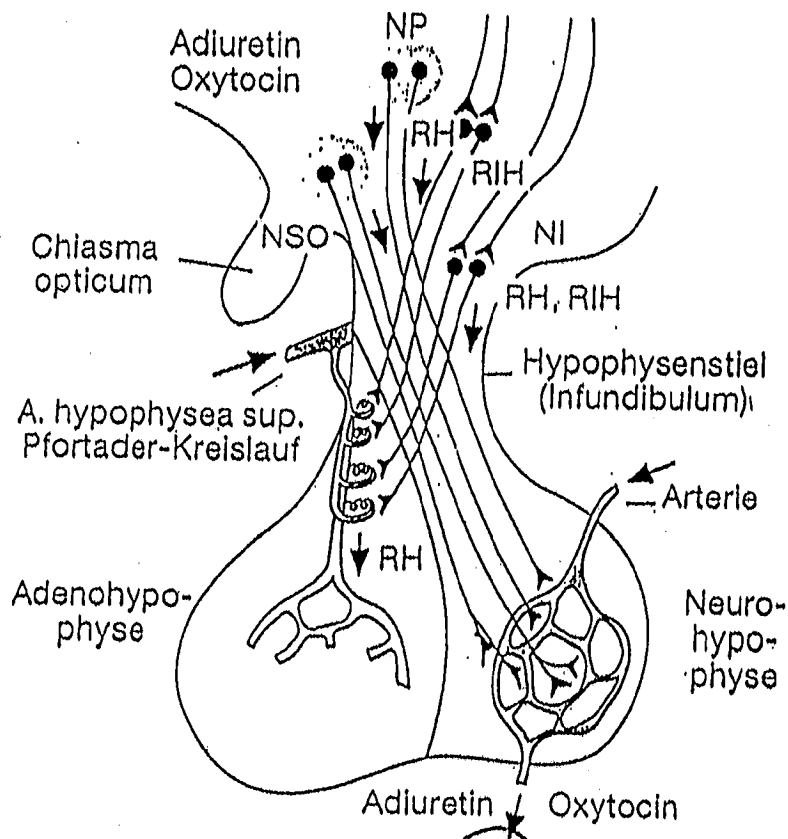


Abb. 2. Hypothalamisch - hypophysäres System in schematischer Darstellung. NI Nucleus infundibularis, NP Nucleus paraventricularis, NSO Nucleus supraopticus, RH Releasing-Hormone, RIH Release-Inhibiting-Hormone.

II. ALLGEMEINER TEIL

Das negative Rückkopplungssystem (Abb. 3) zwischen medialem Hypothalamus, Hypophyse und endokrinen Drüsen funktioniert auch ohne steuernde Einflüsse des ZNS, so z. B. in Tieren, bei denen der mediale Hypothalamus vom übrigen ZNS *in situ* isoliert worden ist. Die Anpassung dieses Systems an die inneren und äusseren Bedürfnisse des Organismus geschieht durch das ZNS. Diese zentralnervöse Steuerung des endokrinen hypothalamo-hypophysären Systems wird über den lateralen Hypothalamus vermittelt und geht vor allem von der Regio praeoptica, Strukturen des limbischen Systems und Strukturen des Mesencephalons aus. Es ist wahrscheinlich, dass auch diese ZNS-Bereiche über die Hormonkonzentration im Plasma Rückmeldungen von den endokrinen Drüsen erhalten. Man kann zeigen, dass die entsprechenden Neurone spezifisch auf endokrine Hormone reagieren und diese Hormone intrazellulär speichern. Als Beispiele für die biologische Bedeutung der steuernden Eingriffe des ZNS in das endokrine System mögen die zirkadiane Rhythmik der ACTH-Ausschüttung, die Steuerung der Kortisolausschüttung unter Stress und die Stoffwechsellagerung durch erhöhte Thyroxinausschüttung bei langanhaltender Kältebelastung gelten.

Während ein Teil der in das Portalsystem abgesonderten Hypothalamus-Hormone von den Hypophysenzellen aufgenommen und durch Rezeptoren gebunden wird, wobei das Releasing-Hormon am Rezeptor über die Aktivierung von cyclo-AMP⁵ wirkt, wird der andere Teil in den Körperkreislauf ausgeschieden und durch Peptidasen abgebaut. Die Halbwertszeit im Blut beträgt ungefähr vier Minuten, wie durch Radioimmunoassaymessungen bestätigt werden konnte⁶.

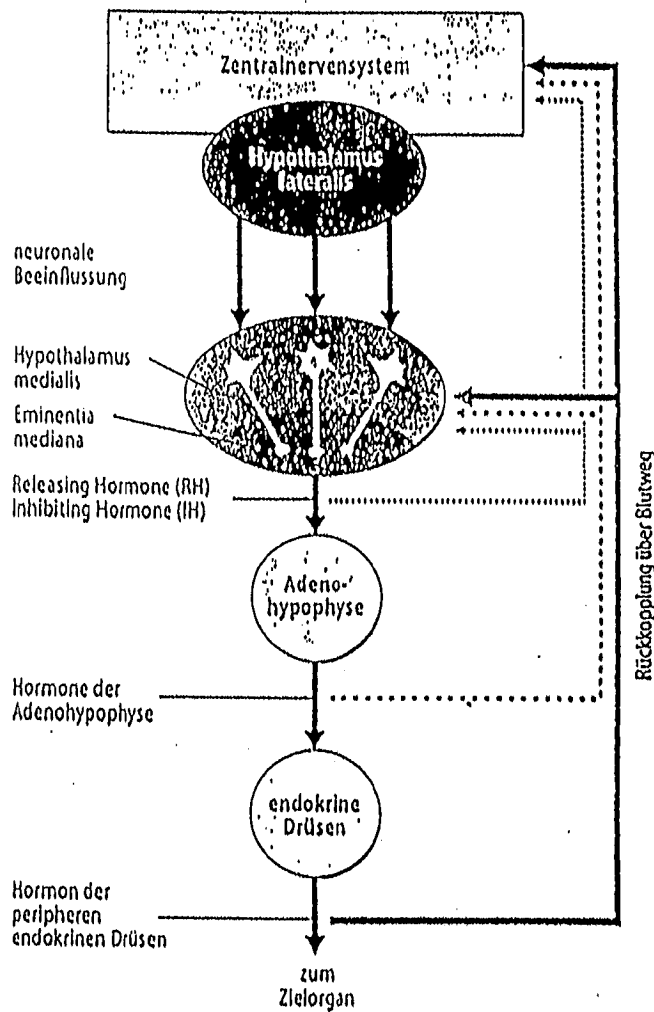


Abb. 3. Neuroendokrine Kopplung durch das hypothalamo-hypophysäre System. RH stimulierendes Releasinghormon; IH hemmendes Releasinghormon.

II.1.3. Struktur des LH/FSH-“Releasing“-Hormons

Zunächst wurde das LH/FSH-“Releasing“-Hormon aus Schweinehypothalamusgewebe isoliert. Amoss⁷ isolierte es aus Schafshypothalamusgewebe. Durch Sequenzanalyse⁸ konnte gezeigt werden, dass die Primärsequenz des LH-RH aus beiden Gewebearten gleich ist. Durch enzymatische Abbaumethoden konnte die Sequenz dieses Decapeptidamids (s. Abb. 4) nachgewiesen werden⁹, dessen biologische Funktion sowohl das luteinisierende Hormon (LH), als auch das follikelstimulierende Hormon (FSH) freisetzt (s. Tab. 1).

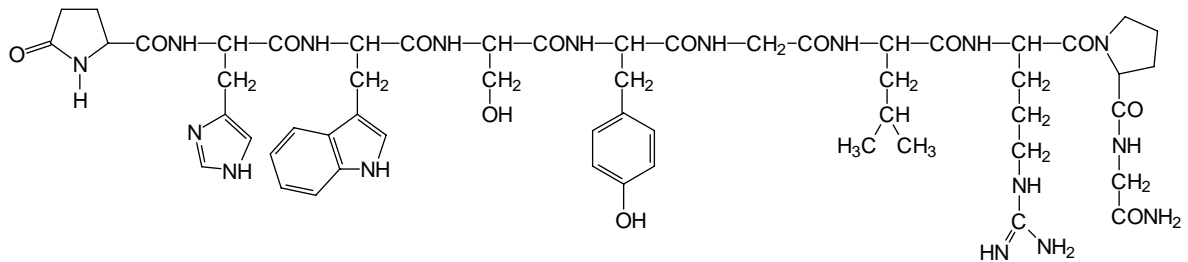


Abb. 4. Primärstruktur des LH/FSH-“Releasing“-Hormons.

II.2. Opioid Peptide

II.2.1. Das endogene schmerzhemmende System

Neben dem aufsteigenden schmerzvermittelnden System existiert ein körpereigenes absteigendes schmerzhemmendes System (antinozizeptives System), dessen Fasern von verschiedenen Ebenen des Zentralnervensystems ausgehen (Abb. 5). Deren Aufgabe ist es, die Weiterleitung von Schmerzimpulsen zu erschweren und damit die Schmerzempfindung herabzusetzen.

Stimulation von Opioid-Rezeptoren durch endogene Opioid-Peptide (s. u.) führt zu einer Aktivierung. Wie aus Abb. 5 ersichtlich, liegen wichtige Ursprungsgebiete des Systems im zentralen Höhlengrau und in der lateralen Formatio reticularis. Nur ein Teil der Fasern zieht direkt zum Rückenmark, der andere Teil wird in medullären Kernen umgeschaltet. Vom Nucleus raphe magnus und Nucleus raphe dorsalis gehen serotoninerge, von der Formatio reticularis mediales noradrenerge schmerzhemmende Bahnen aus. Die synaptische Erregungsübertragung von Schmerzimpulsen wird ferner in der Substantia gelatinosa des Rückenmarks durch ein Neuron mit Met-Enkephalin als Neurotransmitter (s. u.) gehemmt.

Mit dem schmerzhemmenden System lässt sich erklären, warum Schmerzen in einer Stresssituation zunächst nicht bemerkt, sondern erst nach Abklingen der Anspannung wahrgenommen werden. Das endogene schmerzhemmende System hat somit offensichtlich die Funktion, in Situationen, in denen die Handlungsfähigkeit des Organismus erforderlich ist, die lähmende Schmerzreaktion (vorrübergehend) zu unterdrücken. Unterschiedliche Aktivität des schmerzhemmenden Systems ist offensichtlich auch ein wesentlicher Grund für die verschiedene Schmerzempfindlichkeit von Patienten.

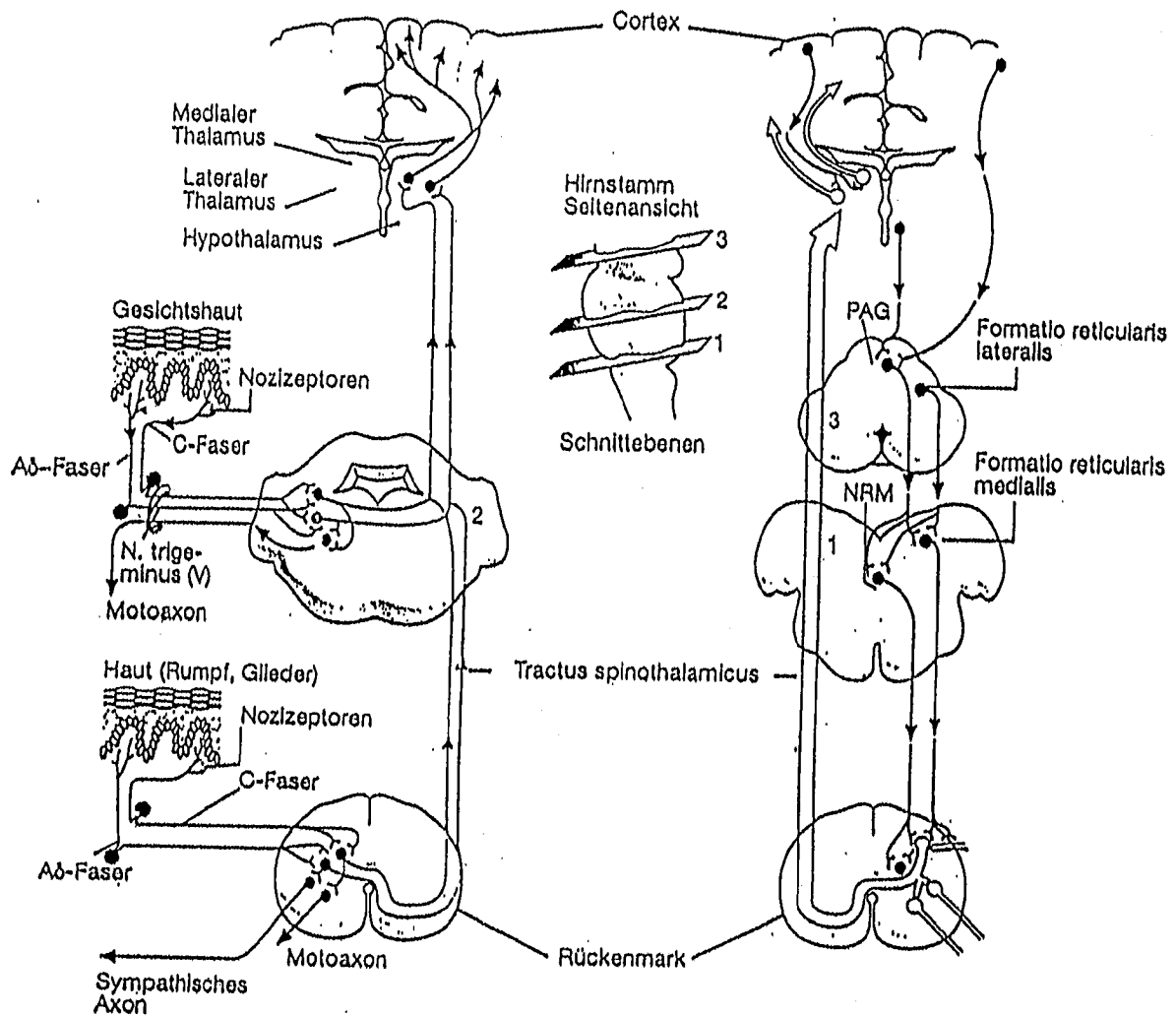


Abb. 5. Verlauf der aufsteigenden nozizeptiven Bahnen (links) und der absteigenden anti-nozizeptiven Bahnen (rechts). Die Lage der dargestellten Schnitte durch den Hirnstamm ist in der mittleren Einsatzfigur angegeben. PAG zentrales Höhlengrau, NRM Nucleus raphe magnus.

II.2.2. Opioid-Rezeptoren

In unterschiedlicher Dichte kommen die Opioid-Rezeptoren sowohl prä-, als auch postsynaptisch im ZNS und in der Peripherie vor. Besonders häufig werden sie im limbischen System, im Thalamus, im Hypothalamus und im Striatum, sowie in der Formatio reticularis und der Substantia gelatinosa des Rückenmarks gefunden.

II. ALLGEMEINER TEIL

Man unterscheidet verschiedene Subtypen, die man als μ -, κ - und δ -Rezeptoren bezeichnet. Alle Opioid-Rezeptoren hemmen bei Stimulation - G-Protein-gekoppelt - Adenylatzyklasten und bewirken dadurch eine Öffnung von Kaliumkanälen und/oder eine Schliessung von Calciumkanälen.

II.2.3. Endorphine

Als körpereigene Agonisten an Rezeptoren des schmerzhemmenden Systems, den Opioid-Rezeptoren, wurden Poly- und Oligopeptide identifiziert, die als Endorphine (endogene Morphine) bezeichnet wurden. Zu diesen gehören:

- β - Endorphin mit 31 Aminosäuren,
- Dynorphine mit 8 bis 32 Aminosäuren, sowie
- die Pentapeptide Methionin - und Leucin-Enkephalin (Met- und Leu-Enkephalin), die aus den 5 endständigen Aminosäuren der Endorphine (Met-Enkephalin) bzw. der Dynorphine (Leu-Enkephalin) bestehen:
 - Tyr-Gly-Gly-Phe-Met (Met-Enkephalin)
 - Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (Leu-Enkephalin)

Sie entstehen im Gehirn, der Hypophyse, sowie dem Nebennierenmark aus drei Vorläuferproteinen, dem Proopiomelanocortin (POMC), dem Proenkephalin und dem Prodynorphin.

Es zeigte sich, dass Met-Enkephalin) und alle bisher bekannten Endorphine aus Teilsequenzen des Adenohypophysenhormons β -Lipotropin) bestehen, einem Peptid aus 91 Aminosäureresten, das selbst keine morphinartigen Wirkungen zeigt.

Abb. 6 zeigt, dass α -Endorphin aus 16, γ -Endorphin aus 17 und β -Endorphin aus 31 Aminosäureresten aufgebaut ist. Met-Enkephalin besteht aus den Aminosäuren 61-65 des β -Lipotropins, die als Anfangssequenz in allen Endorphinen enthalten sind.

Allerdings ist β -Lipotropin nicht der "Precursor" der Opioidpeptide - sie entstehen vielmehr aus unterschiedlichen Peptiden als Vorstufen. So entstehen aus:

Prä-Pro-Enkephalin A	die Enkephaline
Prä-Pro-Opiomelanocortin	die Endorphine
Prä-Pro-Enkephalin B	die Dynorphine

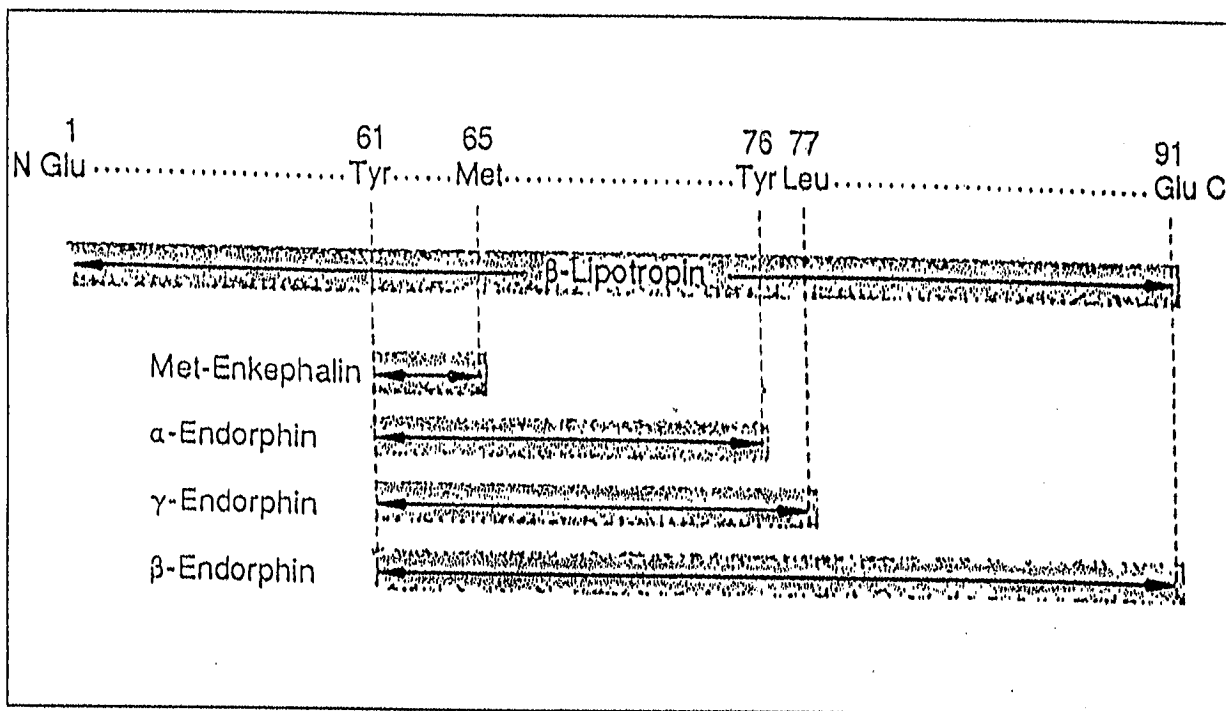


Abb. 6. Met-Enkephalin und Endorphin als Teilsequenzen des β -Lipotropins.

Da die Endorphine an denselben Rezeptoren, den Opioid-Rezeptoren angreifen, wie die opioiden Analgetika (sie werden daher auch als endogene Opiate bezeichnet), weisen sie auch die gleichen pharmakodynamischen Eigenschaften wie diese auf, unterscheiden sich aber aufgrund ihrer Peptid-Struktur in der Pharmakokinetik¹⁰. So sind beispielsweise die Enkephaline nur bei intraventrikulärer Injektion analgetisch wirksam, da sie im Plasma sehr rasch enzymatisch durch Proteasen hydrolysiert werden. β -Endorphin wirkt dagegen auch bei intravenöser Applikation.

Über den Wirkungsmechanismus der Endorphine ist bekannt, dass sie die Freisetzung schmerzimpulsvermittelnder Neurotransmitter (z. B. von Substanz P) hemmen und dadurch die Zahl der übergeleiteten nozizeptiven Aktionspotentiale herabsetzen.

Im Gehirn spielen wahrscheinlich Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin als Synapsentransmitter eine Rolle, Endorphine hemmen die Sekretion von Transmittern der hypothalamischen Releasinghormone und von Dopamin, d. h. sie hemmen letztlich die Gonadotropin- und ACTH-Sekretion; Prolaktin wird stimuliert (Hemmung von Dopamin).

II.2.4. Physiologische Wirkung der Enkephaline

Man schliesst aus der Tatsache, dass Enkephaline auch im limbischen System vorkommen, darauf, dass diese Substanzen an der Erzeugung von euphorischen Empfindungen beteiligt

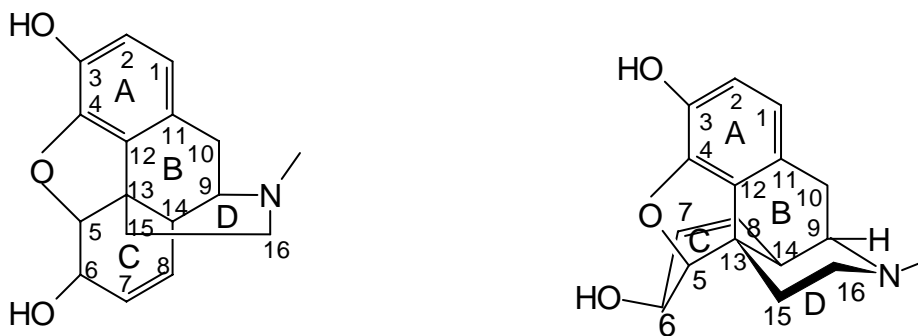
II. ALLGEMEINER TEIL

sind. Das limbische System ist durch Nervenfasern mit dem Hypothalamus verbunden. Diese Hirnregion ist, wie durch die Entdeckung der "Releasing"-Hormone bewiesen, die oberste Schaltstation in der Hierarchie der hormonellen Regulation im Organismus, sowie das oberste Integrationszentrum der vegetativen Zentren im Zentralnervensystem. Es ist noch unklar, welche Rolle die Enkephaline bei diesen Regulationsvorgängen spielen, obwohl man weiss, dass die Enkephaline die Freisetzung von Wachstumshormon und Prolactin stimulieren können. Weitere Opioideffekte sind die Hemmung der Atmungstätigkeit, die Erniedrigung der Körpertemperatur, die Beeinflussung im Lern- und Gedächtnisvermögen. Eine Beteiligung der Enkephaline an der neuronalen Informationsübertragung wird aufgrund der hohen Konzentrationen in den Nervenzellen angenommen¹¹. Enkephaline können, wie bereits erwähnt, die Neurotransmitter Acetylcholin, Noradrenalin und Substanz P hemmen. Daher werden sie auch als Neuroinhibitoren bezeichnet.

II.2.5. Struktur der Enkephaline

Um gemeinsame Strukturmerkmale der Enkephaline mit Morphin zu finden, wurden verschiedene Modelle entwickelt, da diese beiden auf den ersten Blick gänzlich verschiedenen Strukturen denselben Rezeptor belegen. So wurde ein Modell entwickelt, welches behauptet, die Tyrosinseitenkette des Enkephalins korrespondiert mit der Orientierung des Phenolrings im Phenanthrengerüsts des Morphins, und der N-Terminus des Enkephalins mit der tertiären Aminfunktion. Diesem Modell wurde allerdings durch Konformationsberechnungen¹², widersprochen.

a)



b)

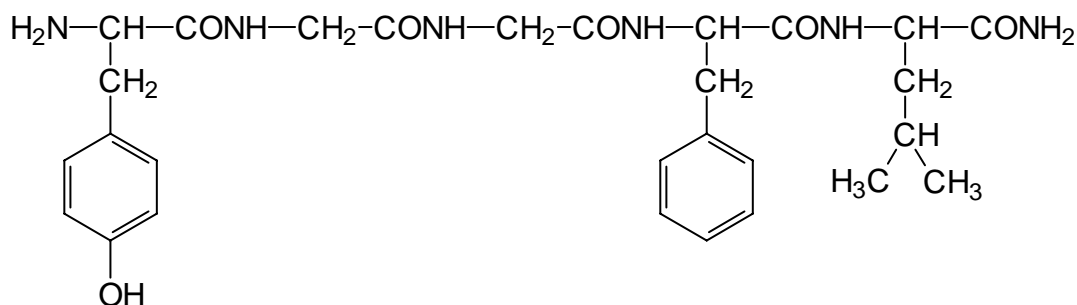


Abb. 7. Strukturen von Morphin (a) und Leucin-Enkephalin (b).

II.3. Chemische Peptidsynthese

Beim Aufbau eines Peptids ist die N-Acylierung einer Aminosäure durch eine andere Aminosäure die Basisreaktion. Man muss, um Nebenreaktionen zu vermeiden, die funktionellen Gruppen reversibel blockieren, die nicht für die Reaktion vorgesehen sind. Man teilt die chemische Peptidsynthese nach zwei völlig verschiedenen Arbeitsweisen ein, und zwar in die klassische¹³⁻¹⁶ und in die Festphasen-Peptidsynthese¹⁷⁻²¹.

Die klassische Peptidsynthese hat den Vorteil, dass man sowohl die Reinigung, als auch die Charakterisierung der Zwischenprodukte nach jedem Schritt durchführen kann, wodurch Nebenprodukte weitgehend entfernt werden können. Zudem lassen sich mit dieser konventionellen Methode verhältnismässig grosse Mengen an Peptidprodukt herstellen. Die Nachteile der klassischen Peptidsynthese sind jedoch grosser Zeitaufwand bei Reaktionen und mühsames Zwischen- und Endreinigen, sowie Löslichkeitsprobleme bei längeren, geschützten Fragmenten und die Gefahr von Racemisierungen bei Fragmentsynthesen.

II.3.1. Festphasen-Peptidsynthese an polymeren Trägern

Die von Merrifield entwickelte Festphasen-Peptidsynthese²² findet heute breite Anwendung. Ausgehend von einem festen, unlöslichen, für Lösungsmittel und Reagenzien aber permeablen polymeren Träger wird die Synthese durch aufeinanderfolgende Kupplungen und Abspaltungen durchgeführt. Die grundlegenden Syntheseschritte der Festphasen-Peptidsynthese zeigt Abb. 8. Man gibt die Reagenzien im mehrfachen Überschuss zu, damit die Reaktionen so schnell wie möglich ablaufen können. Nicht umgesetzte Reagenzien werden nach jedem Syntheseschritt

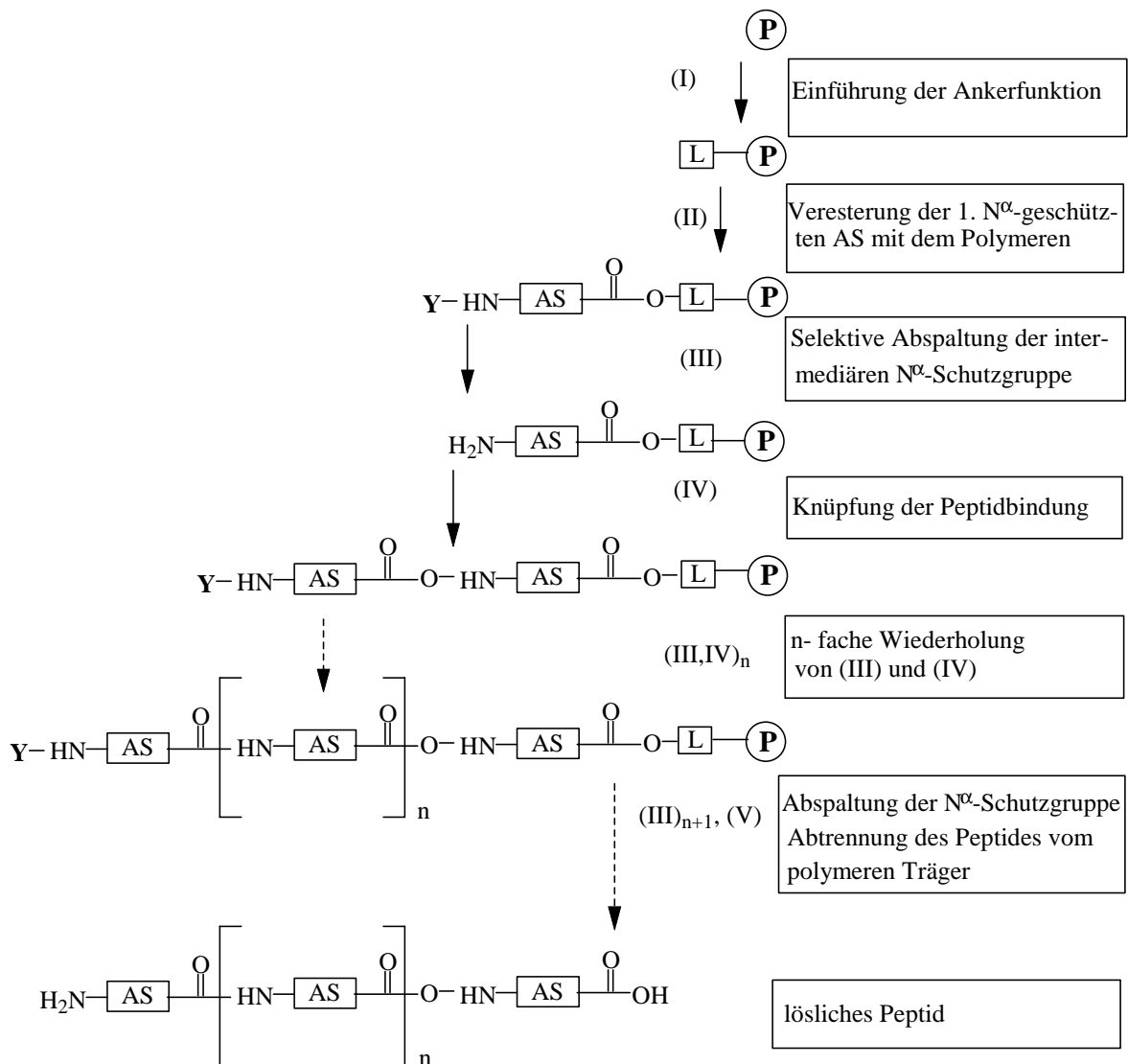


Abb. 8. Syntheseschritte der Festphasen-Peptidsynthese.

von dem bereits am Träger fixierten Peptid durch Filtration (Batch-Verfahren) oder durch kontinuierliches Waschen (Durchfluss-Verfahren) entfernt, wobei die Abspaltungs- und Kupplungs-Zyklen so oft wiederholt werden, bis das gewünschte Peptid aufgebaut ist, und dann vom Träger abgespalten und schliesslich gereinigt wird. Neben den Vorteilen der Festphasensynthese, wie einfachere Abtrennung der Reagenzien, kürzere Synthesezeit und der Möglichkeit zur Automatisierung gibt es auch Nachteile. Ohne die aufwendigen Zwischenreinigungen können neben dem gewünschten Peptid aufgrund von Nebenreaktionen in der oft vielstufigen Synthese verschiedene Nebenprodukte entstehen. Eine Endreinigung ist

II. ALLGEMEINER TEIL

oft schwierig, da sich das Peptid meist nur wenig von den Nebenprodukten unterscheidet. Diese Problematik zeigt sich besonders bei der Herstellung längerer Peptide.

– Batch-Verfahren und Durchfluss-Verfahren:- zwei unterschiedliche Arbeitsweisen der Festphasen-Peptid-Synthese:

Beim Batch-Verfahren wird der Träger, an dem das Peptid aufgebaut wird, während der Reaktion in einem Gefäß mit Lösungsmittel und Reagenzien geschüttelt oder gerührt. Durch Filtration werden nach der Reaktion die überschüssigen Reagenzien und sämtliche Lösungsmittel vom Träger getrennt. Mit diesem Verfahren werden Peptide mittels Boc- und Fmoc-Strategie hergestellt. Im Durchfluss-Verfahren dagegen werden die Reagenzien und Lösungsmittel laufend durch die Säule gepumpt, in welcher sich der polymere Träger für die Peptidsynthese befindet, während die Synthesereaktionen stattfinden. Man betreibt die Peptidsynthese aus technischen Gründen meist im Durchfluss-Verfahren nur mit Fmoc-Chemie.

– Die Bindung: Peptid-Polymerträger - Der Anker:

Der Anker besitzt eine funktionelle Gruppe für die Anknüpfung der C-terminalen Aminosäure der Peptidkette an den Polymerträger. Dieser Anker soll nach dem Aufbau der Peptidkette mit einem passenden Reagenz abspaltbar sein. Die Auswahl der Ankerfunktion hängt sowohl von der Schutzgruppen-Kombination als auch von der terminalen Funktion des gewünschten Peptides ab.

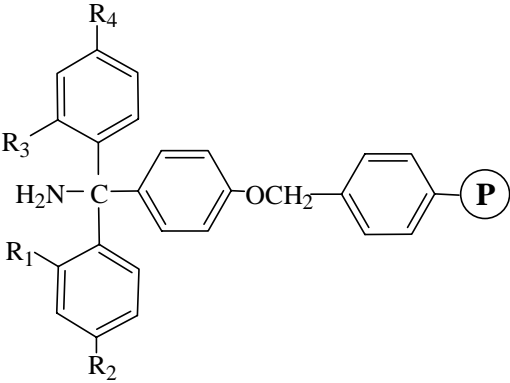
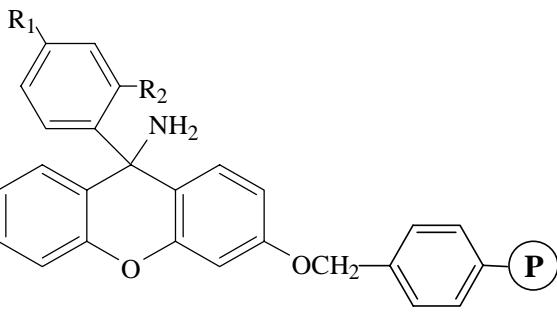
Für die Festphasen-Synthesen von Peptiden mit C-terminaler freier Carboxyl-Funktion stehen Benzylester-Anker zur Verfügung: Benzylester-(Merrifield-Anker)²² oder Pam-Anker²³ für die Boc/Bzl-Strategie und p-Alkoxybenzylester-Anker (Wang-Anker)²⁴ für die Fmoc/tBu-Strategie.

Mit Dialkoxybenzylestern als Ankergruppe gelingt die Abspaltung bereits in verdünnter (1 %) TFA^{25, 26}. Somit ist eine Darstellung von geschützten Peptidfragmenten möglich. Für die Synthese von Peptidamiden (C-terminale Carboxylamidfunktion) ist die Aktivierung des entsprechenden Ankers notwendig. Während die mit HF spaltbaren BHA-²⁷ und MBHA-Amidanker²⁸ für die Boc/Bzl-Strategie zur Verfügung stehen, war lange Zeit die Ammonolyse die einzige Methode²⁹ zur Darstellung von Peptidamiden mit der Fmoc/tBu-Schutzgruppen-Kombination. Es sind Harze mit TFA-labilen Ankern entwickelt worden³⁰⁻³⁶. Der Grundbaustein solcher Anker sind entweder Trialkoxybenzylamine oder substituierte

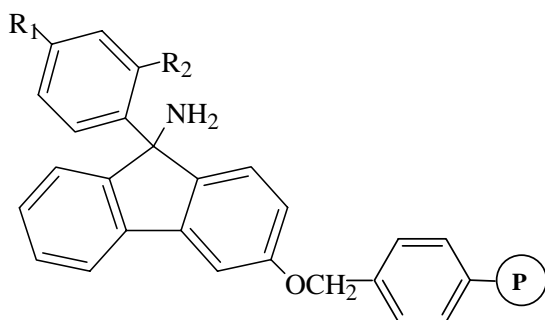
II. ALLGEMEINER TEIL

Alkoxybenzhydrylamine. Erst kürzlich wurden neue Anker für Peptidamide entwickelt, die sich von diesen Grundbausteinen ableiten. In Tab. 2 sind einige dieser Anker aufgelistet. Es handelt sich dabei um neue methoxysubstituierte Trityl-, 9-Phenylxanthenyl- und 9-Phenylfluorenylaminanker³⁷⁻⁴¹. Der Vorteil dieser Anker ist der, dass nur 1 % TFA/DCM nötig ist, um das voll geschützte Peptid vom Harz abzuspalten. Man hat so die Möglichkeit, über Fragmentkondensation grössere Peptide herzustellen.

Tab. 2. TFA-labile Anker zur Festphasensynthese von Peptidamiden.

Anker für Peptidamide	Abspaltungsbedingungen
 <p>Methoxysubstituierte 4-Benzyloxytritylamin-Harze</p> <p>a: $R_1 = R_3 = H$; $R_2 = R_4 = -OCH_3$ b: $R_1 = H$; $R_2 = R_3 = R_4 = -OCH_3$ c: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = -OCH_3$</p>	<p>1 % TFA</p> <p>a: 1h b: 15 min c: 10 min</p>
 <p>Methoxysubstituierte 9-Phenylxanthen-9-ylamin-Harze</p> <p>1. $R_1 = -OCH_3$, $R_2 = H$; 2. $R_1 = R_2 = -OCH_3$</p>	<p>1 % TFA, < 10 min</p>

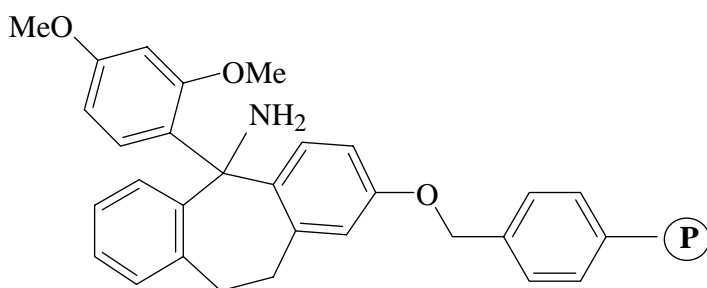
II. ALLGEMEINER TEIL



1. 15 % TFA
2. 5-10 % TFA,

Methoxysubstituierte 9-Phenylfluoren-9-ylamin-Harze

1. $R_1 = -OCH_3$, $R_2 = H$; 2. $R_1 = R_2 = -OCH_3$



- 3-10 % TFA,
< 15 min

Methoxysubstituierte 5-Phenyl-10,11-dihydrodibenzo[a,d]-
cyclohept-5-ylamin-Harz

P = Polystyrol mit 1 % DVB vernetzt

– Anforderungen an den polymeren Träger:

Der verwendete Träger sollte während der Peptidsynthese chemisch inert, unlöslich in den eingesetzten Lösungsmitteln, aber für Lösungsmittel und Reagenzien gut permeabel und zugänglich sein. Man verwendet heute Polystyrol), Polyacrylamid (Polyamid), Polyacrylamid auf Kieselgur, PS-PEG und PolyHIPE-Harz.

Beim PS-PEG handelt es sich um ein Pfropfpolymer, welches durch Aufpfropfen von Polyethylenglycol (PEG) auf Polystyrolkugeln hergestellt wird. Optimal ist dabei eine PEG-Kettenlänge von ungefähr 3000 Dalton, wobei das Polymer etwa 70 % PEG- und 30 % PS-Matrix enthält. Die Eigenschaften dieses Polymers werden hauptsächlich von PEG bestimmt. Der PolyHIPE-Träger wird zunächst als Emulsion hergestellt, und dann polymerisiert. Diese Matrix, die eine niedrige Dichte und eine hohe Permeabilität hat, kann kovalent mit einem Harz verknüpft werden.

II. ALLGEMEINER TEIL

– Die Anknüpfung der ersten Aminosäure an den Träger - die Beladung:

Bei den Peptidamid-Ankern handelt es sich um primäre Amine - deshalb führt man die Beladung an das Amidharz mit der ersten Aminosäure wie eine gewöhnliche Peptidkupplung durch und zwar wird vom Carboxyende des gewünschten Peptids aufgebaut.

Es gibt viele verschiedene Kupplungsmethoden, die in der Festphasen-Peptidsynthese eingesetzt werden. Die derzeit häufigsten sind: Kupplungsreagenzien, Anhydride (symmetrische⁴² oder gemischte Anhydride^{43, 44}), wobei die symmetrischen Anhydride durch Anwendung von DCCI erzeugt werden), oder Aminosäure-Aktivester (-Opfp⁴⁵, -OTDO⁴⁶, -ODhbt⁴⁷).

In der ersten Festphasensynthese, die, wie schon erwähnt, von Merrifield durchgeführt wurde, bewährte sich die Kombination DCCI/HOBt, wobei DCCI als Kupplungsreagenz dient und HOBt die Funktion hat, die Kupplungsgeschwindigkeit zu erhöhen und unerwünschte Nebenreaktionen zu unterbinden. Der während der Kupplung entstehende schwer lösliche Dicyclohexylharnstoff, schliesst jedoch die Anwendung von DCCI im Durchflussverfahren aus. Diisopropylcarbodiimid bildet dagegen ein lösliches Produkt und wird im Durchflussverfahren bei der Festphasen-Peptid-Synthese eingesetzt.

Andere wichtige Kupplungsreagenzien sind BOP^{48, 49}, HBTU⁵⁰, BOP-Cl⁵¹. (Diese werden immer häufiger verwendet).

Kupplungsreaktionen verlaufen nie zu 100 % vollständig, obwohl sehr effektive Kupplungstechniken verwendet werden. Die Bestimmung des Umsatzgrades ist bei der Festphasensynthese von grosser Bedeutung da bereits geringfügig niedrigere Reaktionsausbeuten (98-99 %) bei der Synthese von längeren Peptiden zu unerwünschten Nebenprodukten führt. Am häufigsten wird der Ninhydrintest (Kaisertest)⁵² - ein qualitativer Test - eingesetzt, wobei Ninhydrin mit der freien Aminogruppe reagiert und einen intensiv blauen Farbstoff bildet. Es gibt aber auch z.B. die Umsetzung mit Pikrinsäure^{53, 54}, 4,4'-Dimethoxytritylchlorid⁵⁵ oder Bromphenol-Blau⁵⁶ (3',3'',5',5''-tetrabromphenolsulfophthalein), welches freie Aminogruppen protoniert. Die so entstandene ionisierte Form ist tief blau gefärbt. Mittels photometrischer Messung lässt sich die Aminogruppe auch quantitativ detektieren⁵⁷. Der Ninhydrintest ist eine irreversible Methode und das Harz ist daher nach der Messung nicht mehr verwendbar. Beim Fmoc-Durchflussverfahren kann die Abspaltung der Fmoc-Gruppe mittels UV-Messung als Kontrolle der Kupplung oder Abspaltung dienen.

II. ALLGEMEINER TEIL

– Nebenreaktionen:

1. kumulative Nebenreaktionen^{17-19, 22}:

Alle freien Aminogruppen der am Träger gebundenen Aminosäuren bei jedem Kupplungsschritt vollständig zu acylieren und danach die temporären N^α-Schutzgruppen wieder abzuspalten, ist das Hauptproblem der Festphasen-Peptidsynthese.

Bei nicht quantitativer Kupplung bzw. Abspaltung können sich nämlich Rumpfsequenzen ausbilden. Reagieren solche Rumpfsequenzen unter Auslassung einer oder mehrerer Aminosäuren weiter, kommt es zur Bildung von Fehlsequenzen. Die Abtrennung solcher, durch Rumpf- und Fehlsequenzen entstandenen Peptidnebenprodukte nach Beendigung der Synthese ist oft schwierig und aufwendig. Daher muss die Reaktion in der heterogenen Phase möglichst vollständig gestaltet werden. Um das zu erreichen, setzt man grosse Überschüsse an Reagenzien ein und wiederholt bei nicht vollständigem Umsatz die Reaktion oder blockiert die nicht umgesetzten Aminogruppen kovalent durch Acetylierung.

2. Racemisierung:

Bei Peptidsynthesen tritt unter den Kupplungsbedingungen Racemisierung hauptsächlich über den Mechanismus der intermediären Azlacton-Bildung⁵⁸ auf. Eine Racemisierung kann auch durch reversiblen α -Protonenentzug⁵⁹ erfolgen. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um die Racemisierung zurückzudrängen:

- bei Verwendung von Schutzgruppen des Urethan-Typs zum schrittweisen Aufbau von Peptidketten,
- durch Aktivierung von N-geschützten Peptidfragmenten mit C-terminalem Glycin oder Prolin (bei der Aktivierung der Carboxylgruppe von Prolin: keine Möglichkeit zur Azlactonbildung. Da Glycin kein chirales Zentrum enthält, entfällt auch hier die Racemisierungsgefahr bei der Aktivierung),
- und durch Anwendung des DCCI-Additiv-Verfahrens. (Der Racemisierungsgrad bei DCCI-Kupplungen wird durch HOBt⁶⁰ bzw. HOSu-Zusatz⁶¹ unterdrückt).

3. Dehydratisierung von Asn und Gln^{62, 63}:

Bei Anwendung der DCCI-Methode kann eine Dehydratisierung der Säureamidfunktion zum Nitril leicht erfolgen. Diese Nebenreaktion tritt auch bei der BOP-Kupplung⁶⁴ auf. Durch Zusatz von HOBt^{60, 63} bei der Kupplung wird diese Dehydratisierung unterdrückt.

II. ALLGEMEINER TEIL

4. Diketopiperazin-Bildung:

Das ist ein grosses Problem bei der Peptidsynthese. Diketopiperazinbildung tritt oft auf, wenn Aminosäuren als Benzylester an den Träger geknüpft sind, vor allem dann, wenn es sich bei den ersten zwei C-terminalen Aminosäuren um Glycin, Prolin, D-Aminosäuren oder N-Methyl-Aminosäuren handelt⁶⁵.

Die freie α -Aminogruppe eines bereits am Anker geknüpften Dipeptids kann intramolekular an der C-terminalen C=O-Gruppe nucleophil angreifen. So entsteht ein Diketopiperazin, welches vom Anker abgespalten wird⁶⁶. Dieser Nachteil kommt vor allem beim Einsatz von Fmoc-Aminosäuren in der Festphasen-Peptidsynthese zum Tragen, da Piperidin als Abspaltungs-Reagenz diese Reaktion sehr stark katalysiert⁶⁷. Die Diketopiperazinbildung kann reduziert oder verhindert werden durch:

- a) die Verwendung von Tetrabutylammoniumfluorid zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe anstelle von Piperidin/DMF⁶⁸,
- b) rasche Durchführung der Abspaltung und der folgenden Kupplung⁶⁷ oder
- c) Kupplung eines Dipeptids⁶⁹.

– Nebenreaktionen bei der Abspaltung:

Sowohl bei der Entfernung der temporären N^α -Aminoschutzgruppe als auch bei der Endabspaltung können Nebenreaktionen (z.B. Alkylierung, Acylierung oder Sulfonierung usw.) auftreten. Die Ursache ist häufig auf die während der Abspaltung entstandenen Carboniumionen zurückzuführen^{17-19, 21}. Gelegentlich stammen solche Carboniumionen auch von den Ankergruppen. Diese Nebenreaktionen können durch Zugabe von "Scavengern" unterdrückt werden. Andere mögliche sequenzabhängige Nebenreaktionen sind: Ornithin-Bildung von Arginin, Pyroglutaminsäure-Bildung von Gln, Succinimid-Bildung bei Asp-Gly-Sequenzen, Oxidation und Alkylierung von schwefelhaltigen Aminosäuren (Met und Cys), oxidativer Abbau von Trp und Tyr, Alkylierung an Tyr, usw.. Solche Nebenreaktionen sind bereits in der Literatur ausführlich diskutiert^{17-19, 21} und es wird hier nicht näher darauf eingegangen.

– Abspaltung des synthetisierten Peptides vom polymeren Träger:

Nachdem das gewünschte Peptid am Träger aufgebaut ist, muss es mit adäquaten Abspaltungsreagenzien vom polymeren Träger entfernt werden, um das Produkt in homogener Form zu erhalten. Die Durchführung der Abspaltung (Entfernung der Schutzgruppen des am

II. ALLGEMEINER TEIL

Harz aufgebauten Peptides und dessen Abspaltung vom Harz geschieht gleichzeitig) erfolgt wahlweise hydrogenolytisch, photolytisch, ammonolytisch oder hydrazinolytisch, in den meisten Fällen jedoch acidolytisch (HF oder TFMSA/TFA für die Boc-/Bzl-Strategie und TFA für die Adpoc/tBu-, p-Bumeoc/tBu- und die Fmoc/tBu-Strategie). Bei acidolytischen Abspaltungen werden fast ausschliesslich sog. "Scavenger" zugesetzt, um die während der Abspaltung entstandenen Carboniumionen abzufangen und damit Nebenreaktionen zu unterdrücken^{17-19, 21}, in manchen Fällen auch, um die Abspaltungsgeschwindigkeit zu beschleunigen⁷⁰⁻⁷². Die am häufigsten verwendeten Scavenger sind Thioanisol, Anisol, 1,2-Ethandithiol, Phenol, Wasser, Indol, m-Kresol u.a.. Die übrigen genannten Abspaltungsverfahren (hydrolytisch, photolytisch, ammonolytisch und hydrazinolytisch) dienen hauptsächlich zur Erhaltung einer besonderen Peptidstruktur.

– Peptidreinigung und Charakterisierung:

Das nach der Abspaltung erhaltene Rohpeptid muss gereinigt und charakterisiert werden, bevor es für biologische Tests eingesetzt werden kann. Die Umkehrphasen-HPLC stellt die grundsätzlich effektivste Reinigungsmethode für synthetische freie Rohpeptide dar. Diese Trennungsmethode ist aber für die Reinigung längerer Peptide weniger geeignet, wegen der relativ stabilen, sich langsam ändernden gefalteten Struktur der Peptidkette. Andere Trennungsmöglichkeiten sind CCD, Ionenaustausch-Chromatographie, Gel-Filtration, isoelektrische Fokussierung und Elektrophorese.

Durch Vergleich des synthetischen Peptids mit dem isolierten natürlich vorkommenden kann dessen Sequenz und Struktur bewiesen werden. Zahlreiche neu entwickelte Techniken bieten die Möglichkeit zur schnellen und zuverlässigen Charakterisierung eines Peptids. Die Aminosäurezusammensetzung kann mittels ASA bestimmt werden. Der automatisierte Edman-Abbau ermöglicht, die primäre Peptidstruktur zu bestimmen. Neue massenspektroskopische Ionisierungstechniken (z.B. MALDI-MS, FAB-MS, FD-MS, Ionenspray-MS) ermöglichen die Messung von Molekül-Massen bis zu 100.000 Dalton mit extrem hoher Empfindlichkeit. Die MALDI-MS-Spektroskopie (Matrix-unterstützte-Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie) wird hauptsächlich zur Massenbestimmung von Peptiden und Proteinen angewandt⁷³.

III. THEMENSTELLUNG - BEGRÜNDUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Eine Fülle von Erkenntnissen über die Therapie bei Störungen des Hormonsystems ist erst durch die synthetische Herstellung dieser Regulations-Hormone möglich geworden.

Die geringe Verfügbarkeit an biologischem Material erfordert daher Synthesewege, welche die Darstellung möglichst reiner, in guten Ausbeuten erhältlichlicher Mengen solchen Materials erlaubt. Die Synthese von biologisch aktiven Peptiden nach der Festphasenmethode führte oft zu schwierig abtrennbaren Nebenprodukten. Unter teilweise drastischen Abspaltungsbedingungen wurden die Moleküle partiell zerstört. Mit der säurelabilen Adpoc-Gruppe wurde erstmalig geprüft, ob sie sich auch, wie in der klassischen Peptidsynthese schon mehrmals bewiesen, für die Festphasen-Synthese eignet.

Als weitere Aufgabe sollte untersucht werden, ob sich 1-(4-tert-Butylphenyl)-1-methylethoxy-carbonyl-geschützte Aminosäuren synthetisieren und isolieren lassen, und ob diese für die Festphasen-Peptidsynthese geeignet sind.

Diese Schutzgruppe sollte in der Weise variiert werden, indem, unter Betrachtung des +I-Effektes der tert-Butylgruppe in para-Stellung am Phenylring, untersucht werden sollte, wie sich ein Austausch einer CH₃-Gruppe dieser tert-Butylgruppe gegen ein H-Atom (Isopropylgruppe) auf die Abspaltbarkeit dieser Schutzgruppe, bzw. auf die Stabilität dieser Verbindung auswirkt.

Diese neuen Schutzgruppen wurden besonders im Hinblick auf eine Alternative zur Einführung säurelabiler N^α-Schutzgruppen getestet, um auf die herkömmliche Methode, nämlich deren Einführung unter Einsatz von Phosgen bzw. Fluorphosgen (s. Einführung der Adpoc- bzw. t-Bumeoc-Schutzgruppe, Kap. IV., spez. Teil) verzichten zu können.

IV. SPEZIELLER TEIL

IV.1. Aminoschutzgruppen des Urethan-Typs

Urethane, relativ stabile Ester der Carbaminsäure, spalten aufgrund ihrer Labilität spontan CO_2 ab. Die Polarisierung der Urethan-Carbonylgruppe wird durch Elektronen der benachbarten O- und N-Atome ausgeglichen. Die Urethane konnten sich in der Peptidsynthese aufgrund folgender Eigenschaften als Aminoschutzgruppe durchsetzen:

- Urethane sind leicht in Form von aktivierten Kohlensäureestern nach Schotten-Baumann in Gegenwart von Basen in Aminosäuren einzuführen, sind jedoch resistent gegen Nukleophile, einschliesslich der Hydroxylionen. Dies erlaubt den selektiven Schutz des Carboxyl-Terminus in Form von Carbonsäureestern und Carbonsäureamiden.
- Aminoschutzgruppen, die als Urethane in Aminosäuren eingeführt werden, zeichnen sich durch geringe sterische Hinderung und durch geringe Racemisierungstendenz bei Peptidsynthesen aus. Vom synthetischen Standpunkt war daher eine Aminoschutzgruppe vom Urethantyp erwünscht, die unter sehr milden Bedingungen abspaltbar ist.
- Urethan-Schutzgruppen sind acidolytisch selektiv abspaltbar und eignen sich daher für den Temporärschutz von Aminogruppen bei Peptidsynthesen.

IV.2. Die 1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl(Adpoc)- N^α -Aminoschutzgruppe⁷⁴

IV.2.1. Chemische Struktur und Eigenschaft der Adpoc-Gruppe

Führt man in die ADOC-Gruppe⁷⁵ eine α,α -Dimethylgruppierung ein, so erhält man die 1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl (Adpoc)-Gruppe, die folgende Eigenschaften besitzt:

- Die Adpoc-Gruppe ist wesentlich säurelabiler als die ADOC-Gruppe.
- Die Einführung der Schutzgruppe gelingt mit Hilfe stabiler, kristalliner und reaktiver Verbindungen, wie dem Fluorameisensäureester (Adpoc-F)⁷⁴ (**6**), dem Oximinophenylacetonitril (Adpoc-ONC)⁷⁴ (**8**) oder dem Phenylcarbonat (Adpoc-OPh)⁷⁴ (**10**). Die Abspaltung der N^α -(2-Adamantan-(1)-isopropyl)-Maskierung gelingt im milden acidolytischen Medium, vorzugsweise 3 % Trifluoressigsäure in Ethylenchlorid innerhalb von 4-5 Minuten bei 0 °C oder innerhalb 1-2 Minuten bei Raumtemperatur. Mittels eines Essigsäure/83 % Ameisensäure/Wasser-Gemisches (7:1:2) gelingt die Abspaltung

IV. SPEZIELLER TEIL

innerhalb von 100 Minuten bei 40 °C. Hierbei wird eine weitestgehende Demaskierungsselektivität gegenüber Schutzgruppen vom tert-Butyltyp erreicht. Selbstverständlich bleiben auch N^α-Benzyloxycarbonyl-, O-Benzylether- sowie Estergruppierungen unangetastet.

- Die Schutzgruppe ist sowohl gegen Alkali als auch gegenüber Hydrogenolyse vollkommen stabil.
- Aufgrund der ausgeprägten Lipophilie besitzt der Adpoc-Rest insbesondere bei höheren Peptiden stark lösungsvermittelnde Eigenschaften.
- Die in der Peptidchemie üblichen Methoden (DCCI/HOBt-Kupplungen, Aktivesterkuppelungen, Verseifungen, Hydrierungen, Hydrazinolysen) können unter Erhaltung des Adpoc-Restes angewandt werden.
- Adpoc-Trp-OH⁷⁴ ist in hohen Ausbeuten darstellbar. Die Lagerung dieser Verbindung bei normalen Lichtverhältnissen und bei Raumtemperatur führt nach drei Monaten zu keiner Veränderung des Derivates.
- Im Gegensatz zu den Ddz-Aminosäuren, welche lichtsensitiv sind (Lagerung und Reaktionen mit Ddz-Aminosäuren müssen unter Lichtausschluss durchgeführt werden), zeigen Adpoc-Aminosäuren sowohl in freier Form als auch in Lösung sehr gute Haltbarkeit. Gegen Lichteinwirkung sind Adpoc-Aminosäuren völlig stabil.
- Die Adpoc-Gruppe spaltet gegenüber der N^ε-Boc-Gruppe im sauren Medium etwa 700 bis 1000 mal schneller ab, wodurch günstige Voraussetzungen für eine selektive Abspaltung von N^α-Adpoc in Anwesenheit einer N^ε-Gruppe gegeben sind.

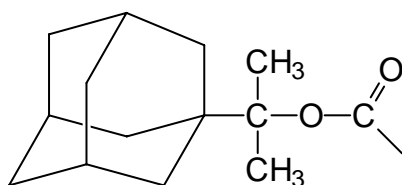


Abb. 9. Chemische Struktur des Adpoc-Restes.

IV.2.2. Synthese der Ausgangsverbindung und Einführungsreagenzien

Das Syntheschema des zur Darstellung der Adpoc-Einführungsgruppe benötigten Alkohols 2-(1-Adamantyl)-2-propanol (Adpoc-OH) (**4**) ist in Abb. 10 skizziert. Als Ausgangsverbindung dient die leicht zugängliche 1-Adamantancarbonsäure (**1**), die zunächst

IV. SPEZIELLER TEIL

über das entsprechende Säurechlorid **2** in den Methylester **3** überführt wird, der anschliessend mit CH_3MgI zu 2-(1-Adamantyl)-2-propanol (**4**) reagiert.

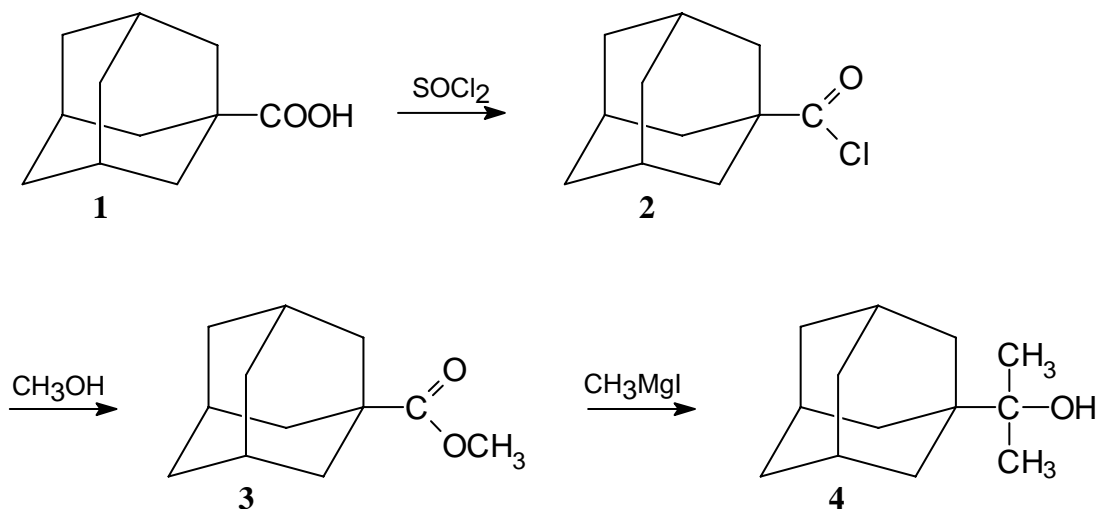


Abb. 10. Syntheschema von 2-(1-Adamantyl)-2-propanol (**4**).

IV.2.3. Einführung der Adpoc-Gruppe in die Aminosäuren

In Abb. 11 sind die verschiedenen Einführungsreagenzien aufgeführt, mit denen der Adpoc-Rest in Aminosäuren eingeführt werden kann.

Für die Einführung des Adpoc-Restes haben sich die Reagenzien **6** und **10** bewährt. Dabei gibt es einmal die Möglichkeit, die Benzyltrimethylammonium (Triton-B)-salze der Aminosäuren in absolutem Dimethylformamid mit den Reagenzien **6** und **10** umzusetzen. Durch anschliessendes Ansäuern mit Zitronensäure erhält man mit Reagenz **6** die geschützten Aminosäuren in hoher Ausbeute.

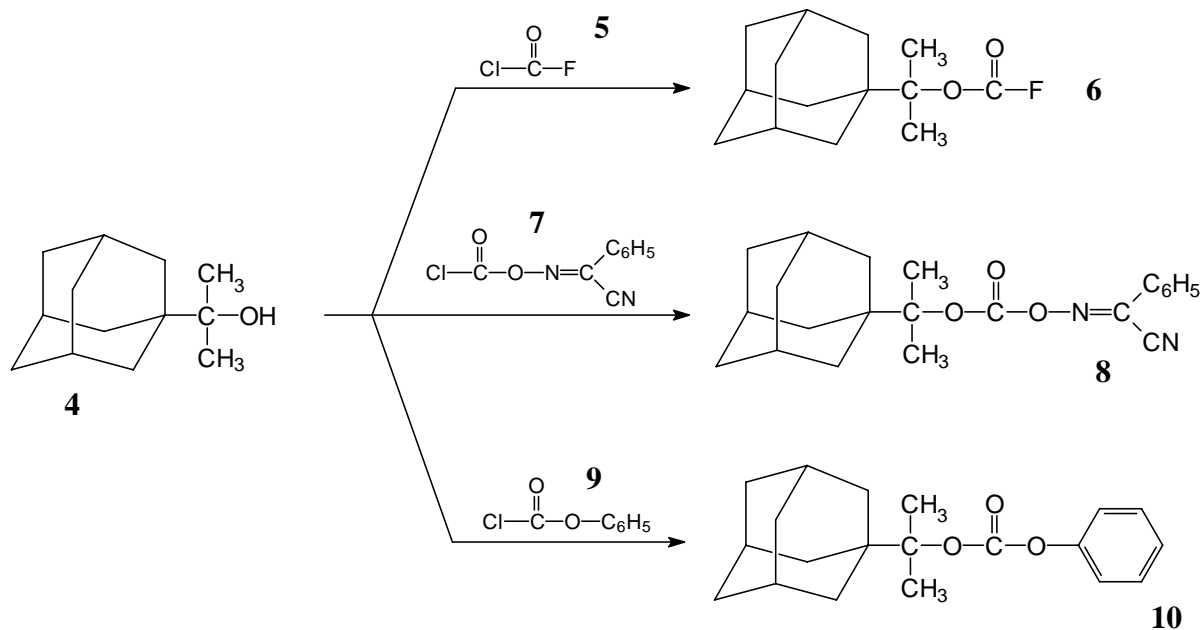
Bei der anderen Methode werden die Natriumsalze der Aminosäuren (wässrig/alkalisches Milieu) mit Reagenz **6** umgesetzt. In dieser Arbeit wurden die Adpoc-geschützten Aminosäuren hauptsächlich nach diesem Verfahren hergestellt.

Das Einsetzen von 1-(1-Adamantyl)-1-methylethyl-phenylcarbonat (**10**) ist problematisch, da der käufliche Chlorameisensäurephenylester (**9**) als Verunreinigung Phenol enthält, was unter den Reaktionsbedingungen oft zu erheblichen Mengen an Diphenylcarbonat führt, welches die Aufarbeitung erschwert. Ausserdem fällt bei der Umsetzung mit Aminosäuren schwer abtrennbares Phenol an, wodurch die Reindarstellung der Aminosäurederivate erschwert ist. Höhere Temperatur $> 50\text{ }^\circ\text{C}$ während drei Stunden kann zu einem thermischen Zerfall der

IV. SPEZIELLER TEIL

gebildeten Produkte führen. Ausserdem erfolgt die Umsetzung mit einer sehr geringen Ausbeute. Im Gegensatz dazu ist Adpoc-F (**6**) ein hochreaktives Reagens zur Einführung der Adpoc-Gruppe in Aminosäuren.

Abb. 12 zeigt die Apparatur, mit der Adpoc-F (**6**) synthetisiert wird. Sie wurde in dieser Arbeit entsprechend verändert, indem die drei Gaswaschflaschen über einen aus einem Stück bestehenden Glasaufsatz miteinander verbunden wurden. Früher wurden die drei Gaswaschflaschen mit Kunststoffschläuchen verbunden. Nach einer gewissen Zeit mussten diese ausgewechselt werden, da sie sich zersetzten. Dabei musste jedesmal die Apparatur auseinandergebaut werden, was ein erhebliches Sicherheitsrisiko darstellte, da giftiges Fluor-Phosgen austreten konnte.



Adpoc-F (6)	Fluorameisensäure-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethyl]-ester
Adpoc-ONC (8)	[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyloxyimino]-2-phenylacetonitril
Adpoc-OPh (10)	[1-(1-(Adamantyl)-1-methylethyl)]-phenylcarbonat

Abb. 11. Darstellung von Adpoc-Einführungsreagenzien.

Tab. 3 gibt eine Übersicht der dargestellten Adpoc-Aminosäuren.

IV. SPEZIELLER TEIL

Tab. 3. Zusammenstellung der mittels Adpoc-F (6)synthetisierten Adpoc-Aminosäuren und deren physikalischen Eigenschaften.

Adpoc-Derivat von	Ausbeute [%]	Schmp. [°C]	$[\alpha]_D^{23}$	R _{fD}	Summenformel (Molmasse)		C	H	N
Arg(Mtr)-OH	63.74	135	-1.7	0.61	C ₃₀ H ₄₇ N ₄ O ₇ S (607.72)	Ber.	59.38	7.70	9.23
						Gef.	58.88	7.49	8.79
Arg(Tip)-OH	72.66	165	-2.3	0.61	C ₃₅ H ₅₆ N ₄ O ₆ S (660.91)	Ber.	63.60	8.35	8.47
						Gef.	63.15	8.78	9.05
Gly-OH ⁷⁴	88.88	179	---	0.59	C ₁₆ H ₂₅ NO ₄ (295.38)	Ber.	65.06	8.53	4.74
						Gef.	64.93	8.59	5.00
His(Trt)-OH	58.50	182	+4.25	0.62	C ₃₉ H ₄₃ N ₃ O ₄ (617.78)	Ber.	75.82	7.01	6.80
						Gef.	75.48	6.76	6.85
His(Bum)-OH	63.00	177-178	+3.89	0.60	C ₂₅ H ₃₉ N ₃ O ₅ (461.59)	Ber.	65.05	8.50	9.10
						Gef.	64.63	9.03	8.70
Leu-OH ⁷⁴	83.95	176	-12.0	0.60	C ₂₀ H ₃₃ NO ₄ (351.49)	Ber.	68.34	9.46	3.98
						Gef.	68.05	9.50	3.65
Lys(Boc)-OH•DCHA ⁷⁶	70.00	229	-2.8	0.46	C ₃₇ H ₆₅ N ₃ O ₆ (647.92)	Ber.	68.59	10.11	6.48
						Gef.	68.51	10.05	6.54
Pro-OH ⁷⁴	70.68	131	-31.91	0.61	C ₁₉ H ₂₉ NO ₄ (335.44)	Ber.	68.03	8.71	4.17
						Gef.	67.97	8.90	4.46
Ser(tBu)-OH ⁷⁷	58.80	146-147	+11.06	0.60	C ₂₁ H ₃₅ NO ₄ (381.51)	Ber.	66.11	9.24	3.67
						Gef.	65.43	9.01	3.55
Trp-OH ⁷⁴	82.00	116	-6.8	0.61	C ₂₅ H ₃₂ NO ₄ (424.54)	Ber.	70.53	7.60	6.60
						Gef.	70.82	7.84	6.72
Tyr(tBu)-OH	57.70	138.5	+4.12	0.61	C ₂₇ H ₃₉ NO ₄ (457.61)	Ber.	70.86	8.59	3.06
						Gef.	70.80	8.57	3.19

IV. SPEZIELLER TEIL

In dieser Arbeit wurden zwei neue Adpoc-geschützte Aminosäurederivate, nämlich Adpoc-L-Arg(Tip)-OH (**11**) und Adpoc-L-His(Bum)-OH (**15**) erstmalig synthetisiert.

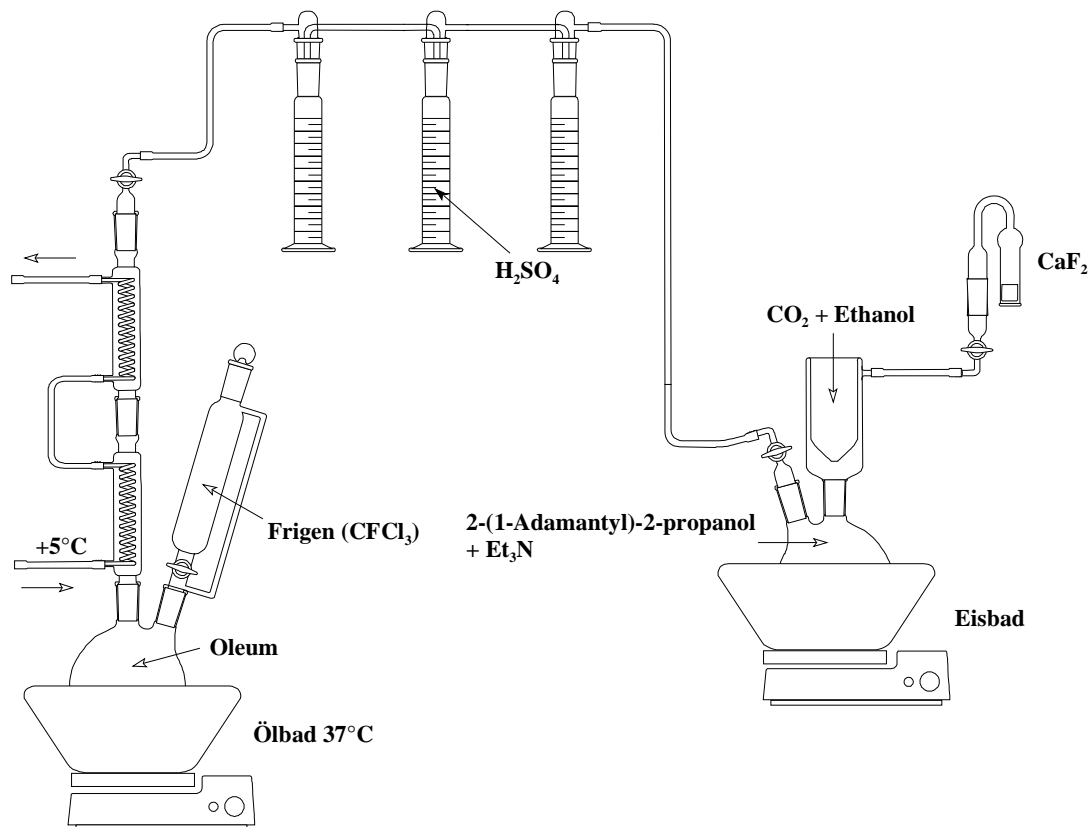


Abb. 12. Apparatur zur Darstellung von Fluorcarbonylchlorid (**5**) und gleichzeitiger Umsetzung mit 2-(1-Adamantyl)-propanol(**2**) (**4**).

IV.2.4. N^α -Adpoc- N^0 -2,4,6-triisopropylbenzylsulfonyl-L-arginin (Adpoc-Arg(Tip)) (**11**)

Für den Schutz der Guanidinofunktion des Arginins sind in der Peptidchemie eine ganze Reihe von Schutzgruppen bekannt, wie z. B. die p-Toluolsulfonylschutzgruppe⁷⁸ hat aus Kostengründen und aufgrund der Stabilität der Schutzgruppe unter den üblichen Kupplungs- und Abspaltungsbedingungen eine breite Anwendung gefunden. Drastische Abspaltungsbedingungen, die häufig zu Nebenprodukten führen⁷⁹⁻⁸³ verdrängte die Bedeutung dieser Schutzgruppe immer mehr. Durch Umsetzung von Argininderivaten mit Chlorameisensäurebenzylester werden zwei Benzylloxycarbonylreste in die Guanidinogruppe eingeführt, wodurch ein vollständiger Schutz derselben erzielt wird. Allerdings sind solche Verbindungen nur in mässiger Ausbeute zugänglich. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurden in den letzten

IV. SPEZIELLER TEIL

Jahren insbesondere von japanischen Arbeitsgruppen Schutzgruppen vom Arylsulfonamidtyp, wie die p-Methoxybenzolsulfonyl (Mbs)-⁸⁴, die 4-Methoxy-2,6-dimethylbenzolsulfonyl (Mds)-⁸⁵, die Mesitylsulfonyl (Mts)-^{86, 87}, die 4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzolsulfonyl (Mtr)-⁸⁸, sowie weitere multisubstituierte Arylsulfonamidschutzgruppen mit dem Ziel entwickelt, eine grössere Säurelabilität und damit eine schonendere Abspaltung zu erreichen.

Die in unserem Arbeitskreis entwickelte Triisopropylbenzolsulfonyl(Tip)-Schutzgruppe⁸⁹, dient zum Seitenkettenschutz von Arginin und Histidin. Es handelt sich hierbei um eine Sulfonamidmaskierung. Eine Anhäufung von Substituenten mit +I-Effekt am Benzolkern erleichtert offensichtlich die Abspaltung. Besonders durch die drei Isopropylreste in der Tip-Schutzgruppe zeigt sich dieser Effekt. Durch die Lipophilie der Schutzgruppe verleiht sie den Peptiden lösungsvermittelnde Eigenschaften. Zudem ist die Tendenz zu Nebenreaktionen, wie z.B. Lactambildung während der Kupplung, aus sterischen Gründen weitgehend eingeschränkt. Das zur Darstellung dieser Sulfonamidmaskierung benötigte 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid, lässt sich aus Triisopropylbenzol und Chlorsulfonsäure in 85%iger Ausbeute in farblosen Kristallen mit einem Schmelzpunkt von 97 °C gewinnen⁸⁹. Die Einführung in N^α-Z-Arginin gelingt racemisierungsfrei in guter Ausbeute mit Aceton als Lösungsvermittler nach der Schotten-Baumann-Reaktion.

H-Arg(Tip)-OH, die Ausgangsverbindung für die Herstellung von Adpoc-Arg(Tip)-OH (**11**), entsteht durch Umsetzung von N^α-Z-Arg(Tip)-OH mit 20%iger HBr in Essigsäure, indem die N^α-Z-Maskierung aufgehoben wird. H-Arg(Tip)-OH wird nach der üblichen Methode mit Adpoc-F (**6**) in das N^α-Adpoc-N^ω-2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-Arginin (**11**) überführt. Mittels DC-Kontrolle konnte gezeigt werden, dass sich H-Arg(Tip)-OH schneller und vollständiger mit Adpoc-F (**6**) umsetzt, als mit H-Arg(Mtr)-OH. Die Ausbeute an Adpoc-Arg(Tip)-OH (**11**) liegt mit 72.66 % etwas höher als die des Adpoc-Arg(Mtr)-OH (**12**) mit 63.74 %. Die Tip-Schutzgruppe ist mit TFA leicht abspaltbar.

IV.2.5. N^α-Adpoc-N(π)-t-butoxymethyl-L-histidin (Adpoc-L-His(Bum)-OH) (**15**)

Die N(π)-t-Butoxymethyl-Schutzgruppe (Bum)⁹⁰, dient dem Histidin-Seitenkettenschutz. Die Imidazol-Schutzgruppe ist gegen Baseneinflüsse und Hydrogenolyse stabil, wodurch sie für die Fmoc/Bum- und Z/Bum-Strategie verwendet werden kann. Das kommerzielle Z-His(Bum)-OH (**13**) dient als Ausgangssubstanz für die Synthese des Adpoc-L-His(Bum)-OH (**15**). Die Z-Gruppe wird hydrogenolytisch (H₂, 10 % Pd-Aktivkohle) abgespalten. Es entsteht

IV. SPEZIELLER TEIL

H-His(Bum)-OH (**14**), welches nach der üblichen Methode mit Adpoc-F (**6**), bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu Adpoc-L-His(Bum)-OH (**15**) umgesetzt wird. Abb. 13 zeigt das Syntheschema zur Darstellung von Adpoc-L-His(Bum)-OH (**15**). Die Bum-Schutzgruppe zeichnet sich durch eine milde und schnelle Abspaltbarkeit aus (TFA oder HBr/Essigsäure).

Im Vergleich zur Umsetzung von H-L-His(Trt)-OH mit Adpoc-F (**6**), verläuft die Umsetzung von H-L-His(Bum)-OH genauso rasch. Die Ausbeute liegt mit 63 % sogar noch etwas höher als für Adpoc-L-His(Trt)-OH (**16**) mit nur 58.5 %. Die Bum-Schutzgruppe ist also eine gute Alternative zur Trityl-Schutzgruppe.

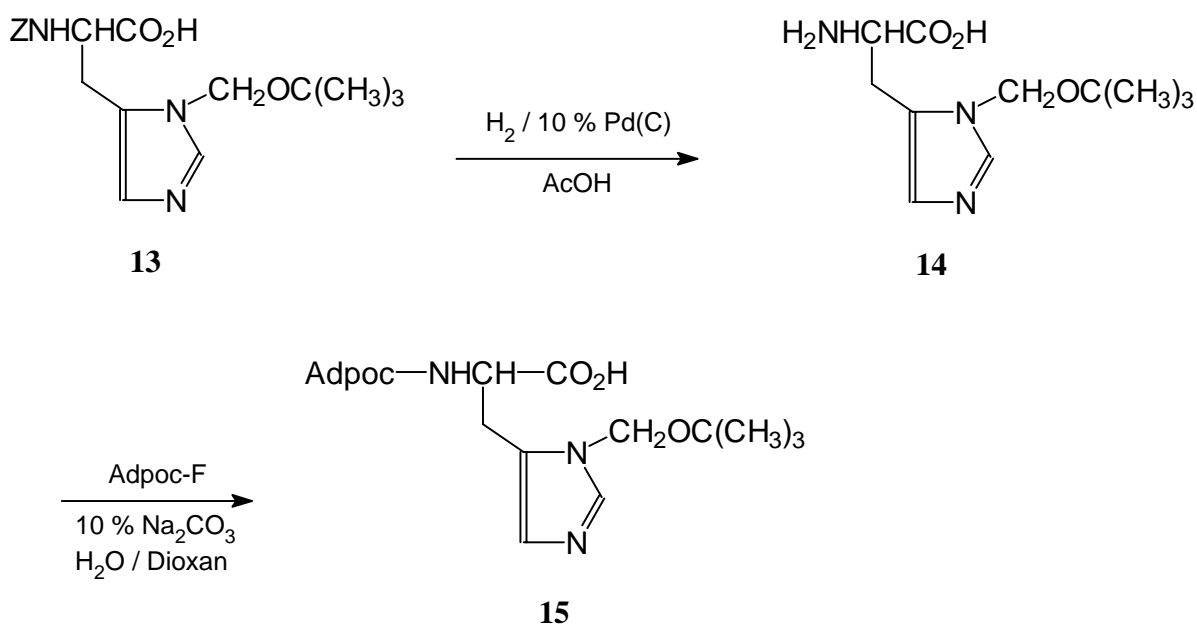


Abb. 13. Syntheschema zur Darstellung von Adpoc-L-His(Bum)-OH (**15**).

Abb. 14 zeigt das FD-MS von Adpoc-L-His(Bum)-OH (**15**). Der FD-MS-Peak bei m/z : 923 beweist die Fähigkeit des Moleküls unter den Messbedingungen zu dimerisieren. Der Peak bei m/z : 463.2 zeigt das Gesamtmolekül, nachdem ein Proton angelagert wurde ($[\text{MH}]^+$); das Gesamtmolekülion ($[\text{M}]^+$) wird detektiert (m/z : 462.2), nachdem ein Elektron herausgeschlagen wurde.

IV. SPEZIELLER TEIL

IV.2.6. 1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl-L-Pro-OH (17) und 1-(1-Adamantyl)-1-methyl-ethoxycarbonyl-L-Lys(Boc)-OH·DCHA (18)

Erstmalig ist es gelungen, von Adpoc-L-Prolin⁹¹ (17) und Adpoc-L-Lys(Boc)-OH·DCHA (18), Einkristalle zu erhalten und diese mittels Röntgenstrukturanalyse zu untersuchen. Die Molekülstrukturdaten der beiden Verbindungen, sowie die zugehörigen Bindungslängen- und -winkel sind im exp. Teil, Kap. V.6.5. und V.6.6. zusammengestellt. Die Urethan-Prolin-Bindung liegt wie bei tBoc-Pro-OH⁹² in der cis-Konformation vor.

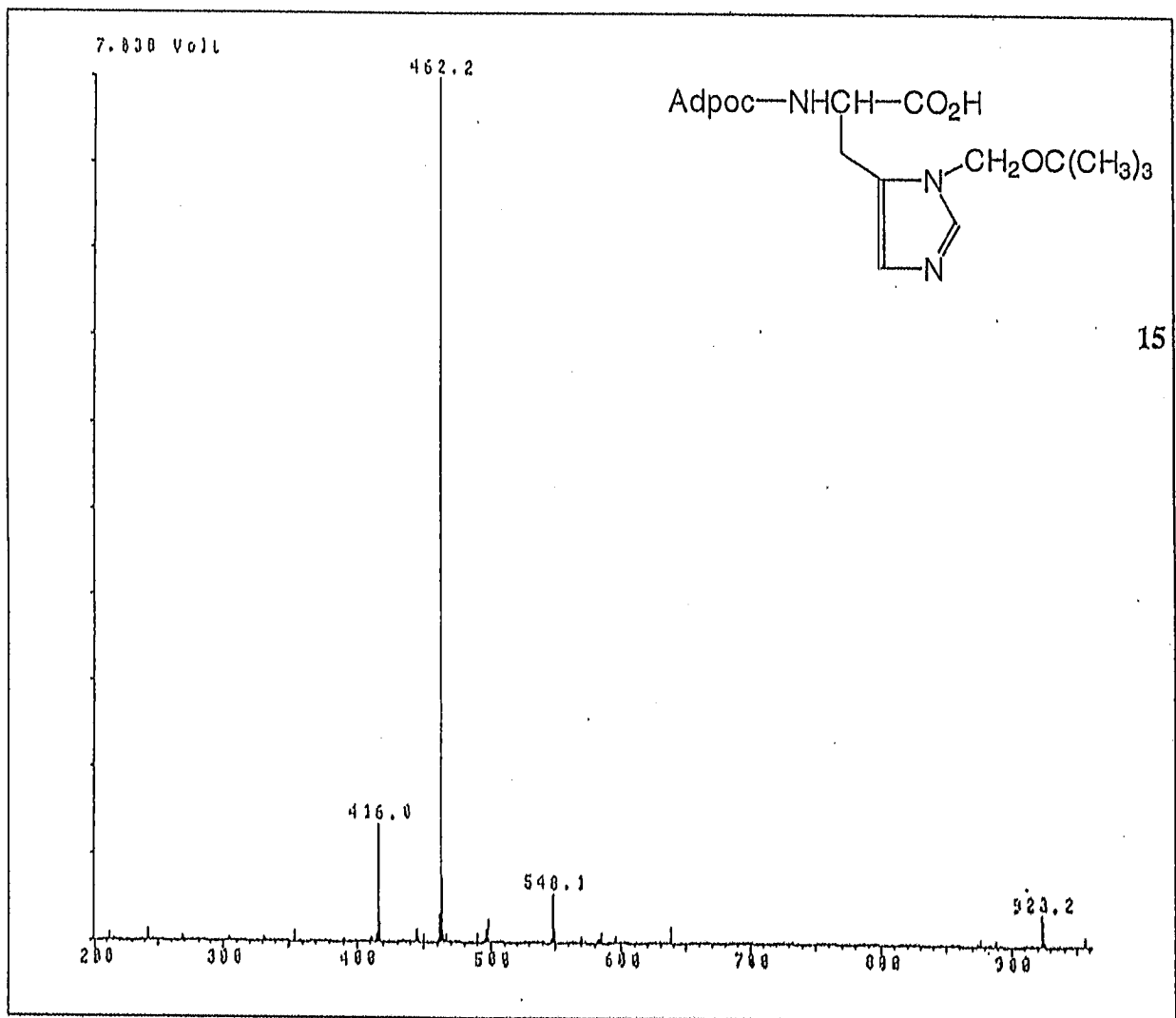


Abb. 14. FD-MS von Adpoc-L-His(Bum)-OH (15) (m/z : 923.2 ([Dimeres von Adpoc-L-His(Bum)-OH]⁺), 463.2 ([MH]⁺), 462.2 ([M]⁺). Temperatur der Ionenquelle: 35 °C.

IV.2.7. ^{13}C -NMR-Spektroskopie von Adpoc-Aminosäuren

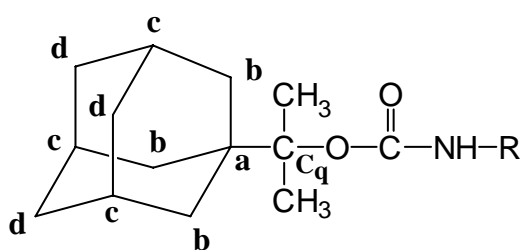
Seit Einführung der Puls-Fourier-Transform-Technik (PFT) entwickelte sich die ^{13}C -NMR-Spektroskopie für peptidchemische Untersuchungen zu einer Routinemethode. Nachteilig ist allerdings die relativ hohe Substanzmenge.

Bei der Kontrolle des Syntheseverlaufs von geschützten, höheren Peptiden ist die ^{13}C -NMR-Spektroskopie sehr hilfreich. Die Zuordnung erfolgt nach bestimmten Regeln der chemischen Verschiebung und durch Vergleich mit Spektren verwandter Verbindungen.

Die ^{13}C -NMR-Spektren von Adpoc-Aminosäuren zeigen deutlich vier Adamantanresonanzsignale im aliphatischen Bereich zwischen 28 und 40 ppm (Tab. 4). Die Signale der quartären C-Atome in Position (c) erscheinen gegenüber den Signalen der $-\text{CH}_2$ -Gruppen in Position (d) bei höherem Feld. Diese Abschirmung kann als Folge der Van-der-Waals-Kräfte zwischen dem Aminosäuresubstituent in Position (a) und den H-Atomen in Position (d) gedeutet werden. Gegenüber Boc-Aminosäuren erscheinen die Signale der Dimethylgruppen bei wesentlich höherem Feld (19-20 ppm, Boc: ca. 28 ppm), während das quartäre C-Atom deutlich nach tiefem Feld verschoben wird. (87-87 ppm; Boc: 78 ppm).

Von den Verbindungen **11**, **15**, **17** und **12**, **16**, **68-72** wurden ^{13}C -Spektren aufgenommen.

Tab. 4. ^{13}C -NMR-chemische Verschiebungen einiger Adpoc-Aminosäuren (gegen TMS als Standard aufgenommen).



Adpoc-Derivat von	CO_2H	$\text{C}\alpha$	$\text{C}\beta$	$\text{C}\gamma$	$\text{C}\delta$	Aromat	$\text{C}=\text{O}$	a	b	c	d	C_q	CH_3
Arg(Mtr)-OH	175.92	55.45	31.60	24.10	40.80	124.89	156.52	39.60	37.03	28.52	35.87	87.01	19.88
						138.58							
						136.75							
		($\text{OCH}_3=111.80$)	($\text{C}\epsilon=158.60$)										

IV. SPEZIELLER TEIL

Adpoc-Derivat von	CO ₂ H	C _α	C _β	C _γ	C _δ	Aromat	C=O	a	b	c	d	C _q	CH ₃
Arg(Tip)-OH	176.15	54.58	29.32	23.64	41.15	123.30	156.20	39.85	37.04	28.48	35.87	87.05	19.89
						148.95							
		(Isopropyl=24.83)			(Cε=158.05)								
Gly-OH	171.75	41.84					155.65	39.68	36.54	27.97	35.33	85.57	19.29
His(Trt)-OH	174.80	53.20	61.08			129.72	155.02	39.48	37.10	28.61	36.23	86.05	19.89
						128.35							
						128.24							
His(Bum)-OH	174.38	54.93	70.15			134.40	155.97	39.58	37.08	28.54	35.89	86.27	19.82
						129.66							
						121.58							
Leu-OH	178.22	52.01	41.51	22.75			156.04	39.53	37.02	28.48	35.88	86.78	19.77
				21.83									
Pro-OH	175.05	59.29	31.03	24.36	47.06		156.50	39.89	37.02	28.22	36.10	88.02	19.67
Ser(tBu)-OH	174.82	53.89	61.81				156.05	39.61	37.08	28.54	35.92	86.97	19.88
		(tBu: 74.32, 27.29)											
Trp-OH	176.06	54.51	27.85	110.5	123.14	136.12	156.50	39.56	37.02	28.50	35.86	87.20	19.83
						127.50							
						111.80							
						118.79							
						119.71							
Tyr(tBu)-OH	176.50	54.67	35.78			131.16	155.82	39.48	37.01	28.52	36.15	86.74	19.71
						129.84							
						124.12							
						154.14							
		(tBu: 24.06, 75.27)											

IV.2.8. Festphasensynthese von LH-RH (19) unter Verwendung der Adpoc-N^α-Aminoschutz-gruppe und der säurelabilen N-(Fluorenyl-9-methyl-oxycarbonyl)-[4-methoxy-4'-(γ-carboxypropyloxy)]-benzhydrylamin-Ankergruppe

IV.2.8.1. Schutzgruppentaktik für die eingesetzten Aminosäuren

Beim LH-RH (19) mit der Aminosäuresequenz p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ sind die trifunktionellen Aminosäuren Serin, Tyrosin und Arginin, sowie die zu Nebenreaktionen neigenden Aminosäuren Histidin und Tryptophan, die ebenfalls zu den trifunktionellen Aminosäuren zählen, enthalten. Aminosäuren mit funktionellen Seitengruppen müssen bei der Reaktion zur Peptidbindung geschützt werden, da die Drittfunktionen während der Acylierung aufgrund zum Teil stark ausgeprägter Nukleophilie mit der Aminokomponente in Konkurrenz treten können. Zur Unterdrückung unerwünschter Nebenprodukte ist daher die selektive Blockierung trifunktioneller Aminosäuren notwendig. Die in dieser Arbeit eingesetzten trifunktionellen Aminosäuren werden wie folgt geschützt: Histidin als His(Trt) bzw. als His(Bum), Arginin als Arg(Mtr) bzw. als Arg(Tip), Serin als Ser(tBu), Tyrosin als Tyr(tBu), Lysin als Lys(Boc). Tryptophan wird nur an der N^α-Aminofunktion geschützt, da die Nukleophilie des Nⁱⁿ-Systems zu gering ist, um unter Kupplungsbedingungen acyliert zu werden. Das LH-RH (19) wird zunächst mit der Adpoc-Strategie 1 synthetisiert, wobei Histidin als His(Trt) eingesetzt wird. Das FAB-MS-Spektrum (Abb. 17) zeigt ein Nebenprodukt, welches entsteht, wenn beim letzten Kupplungsschritt der LH-RH-Synthese die Adpoc-Schutzgruppe des Histidin mit 3 % TFA/DCM abgespalten wird, um anschliessend die Kupplung mit pGlu-OTcp durchführen zu können. Es wird vermutet, dass die Trt-Schutzgruppe an der Histidin-Seitenkette teilweise durch 3 % TFA/DCM abgespalten und die freie Imidazolgruppe in der anschliessenden Kupplung von pGlu-OTcp acyliert wird.

Aus ökonomischer Sicht werden im Molekül mehrfach auftretende Aminosäuren als identische Derivate eingesetzt.

IV.2.8.2. Synthesestrategie für die Festphasensynthese

Die Adpoc-geschützten Aminosäurederivate werden schrittweise zum Decapeptid gekuppelt. Die Kondensation erfolgt mittels N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol (DCCI/HOBt). Durch den Einsatz der säurelabilen Adpoc-Aminoschutzgruppe ist bei acidolytischer Deblockierung mildes, substanzschonendes Arbeiten gewährleistet. Dabei werden die tryptophanhaltigen Peptidfragmente durch Zusatz von Kationenfängern unter Stickstoffatmosphäre deblockiert. Bei der Festphasensynthese des LH-RH (19) wird die

Säureamidfunktion durch Abspaltung des Decapeptids von einem Trägerharz, das Peptide in Form ihrer Amide freisetzt, erhalten.

IV.2.8.3. Bestimmung der Beladung des Harzes an Fmoc-Amid

Als zuverlässige Methode zur Bestimmung des Stickstoffgehalts dient die HPLC-Messung von Fmoc-Amid. Das Harz wird zunächst mit 95 % TFA behandelt, wobei Fmoc-Amid freigesetzt wird. Durch Vergleich mit einer Probe bekannter Fmoc-Konzentration kann der Stickstoffgehalt ermittelt werden.

IV.2.8.4. Festphasen-Synthese von LH-RH (19) mit der Adpoc-Strategie

Die Adpoc-Schutzgruppe⁷⁴ ist, wie bereits erwähnt, eine TFA-labile Schutzgruppe für den temporären Schutz der N^α-Aminogruppe. Mit 3 % TFA/DCM-Abspaltungslösung lässt sich die Adpoc-Gruppe von Aminosäuren und Peptiden abspalten, wobei die säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen (z. B. Boc-, -OtBu, -tBu) relativ stabil sind. Die Anwendbarkeit dieser Gruppen hatte sich sowohl in der klassischen Peptidsynthese, als auch in der Festphasen-Peptidsynthese bewährt. Allerdings ist diese Schutzgruppe in der Festphasensynthese bisher in keinem kritischen Fall getestet worden: Die Synthese eines Peptids in Kombination mit TFA-lablen Seitenketten-Schutzgruppen und TFA-labilem Anker. Zu diesem Zweck wird das Decapeptidamid LH-RH (19) gewählt, welches die trifunktionellen Aminosäuren Tyrosin, Serin, Arginin, Histidin und Tryptophan enthält. Die Seitenketten werden, wie bereits erwähnt, mit TFA-lablen Schutzgruppen während der Kettenverlängerung blockiert.

Die Festphasensynthese wird am Merrifield-Harz mit dem N-Fmoc-4-methoxy-4'-(γ -carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Anker durchgeführt⁹³. Der Stabilitätstest (s. exp. Teil, Kapitel V.6.7.), bei dem die Stabilität von Fmoc-Gly am 4-Methoxy-4'-(γ -carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Anker gegen 3 % TFA/CH₂Cl₂ getestet wird, zeigt, dass der Peptidverlust mit dem 4-Methoxy-4'-(γ -carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Anker akzeptabel ist. Die chemische Struktur der säurelabilen Ankergruppe zeigt Abb. 15. Vor Beginn der Synthese wird zunächst die Fmoc-Gruppe vom Anker mit 20 % Piperidin/DMF abgespalten. Die Kupplung der Adpoc-geschützten Aminosäurederivate erfolgt mit DCCI unter HOBt-Zusatz⁶⁰. Vom Aminosäure- bzw. Peptidharz wird die Adpoc-Gruppe mit 3 % TFA/DCM abgespalten und die Aminogruppe mit 5 % DIEA/DCM freigesetzt, die dadurch der Kupplung zugänglich gemacht wird. Die Endabspaltung wird mit TFA/Thioanisol/EDT/Anisol (90/60/3/1) durchgeführt. Bei dem ersten Versuch (Adpoc-Synthese 1) wird die Seitenkette von Histidin

IV. SPEZIELLER TEIL

mit der Tritylgruppe geschützt. Das HPL-Chromatogramm (Abb. 16 A) des Rohprodukts weist darauf hin, dass neben dem LH-RH-Peptid (RT = 18,23 min) ein unbekanntes Produkt (RT = 19.01 min) entstanden ist (Verhältnis: 52:40). Nach Auftrennung und Reinigung mittels RP-HPLC liefern ASA und FAB-MS-Spektroskopie (Abb. 17) den Hinweis, dass es sich um das LH-RH (2-pGlu)-Peptid (**20**) handelt. Diese Vermutung wird durch folgenden Versuch bestätigt: nach längerer TFA-Abspaltung und verlängerter Acylierungsdauer mit pGlu-OTcp steigt der Gehalt an LH-RH (2-pGlu)-Peptid (**20**) deutlich an (Abb. 16 B, Verhältnis: 9.9:66.8).

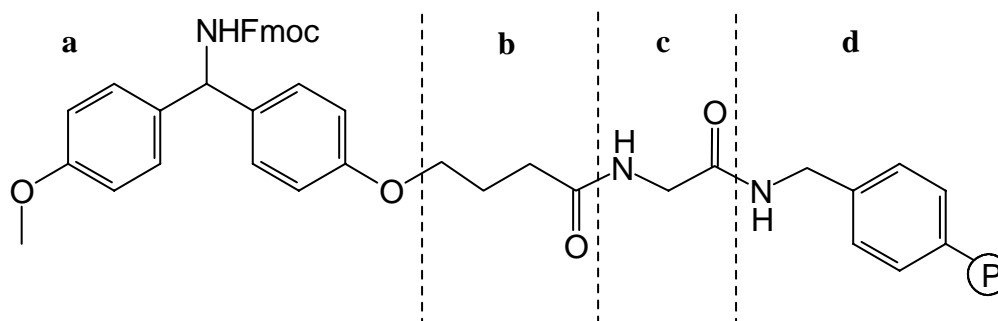


Abb. 15. Chemische Struktur des säurelabilen Ankers N-(Fluorenyl-9-methyloxycarbonyl)-[4-methoxy-4'-(γ -carboxypropyloxy)]-benzhydrylamin (a = N-(Fluorenyl-9-methyloxycarbonyl)-[4-methoxy-4'-oxy]-benzhydrylamin (Ankerfunktion); b = Buttersäurerest (Spacer); c = Glycinrest (interner Standard z.B. für ASA); d = Amino-Merrifield-Harz (aminomethyliertes Polystyrol (IRAA = internal reference amino acid)); Fmoc = Aminoschutzgruppe).

In einem zweiten Versuch (Adpoc-Synthese 2) wird die Bum-Imidazolgruppe (Adpoc-L-His(Bum)-OH) (**15**) eingesetzt. Nach der Abspaltung wird die Kupplungsdauer mit p-Glu-OTcp auf eine halbe Stunde begrenzt. Das HPL-Chromatogramm (Abb. 18 A) zeigt ein zufriedenstellendes Ergebnis.

IV.2.8.4.1. Abspaltung und Reinigung von LH-RH (**19**)

Im experimentellen Teil (Kap. V.6.8.) dieser Arbeit findet man die Abspaltung, die in TFA/Thioanisol/EDTA/Anisol erfolgt, und die Reinigungsschritte beschrieben.

IV.2.8.5. Festphasensynthese von LH-RH (19) mit der Fmoc-Strategie

Im Vergleich dazu wurde das LH-RH (19) mit der Fmoc-Strategie am N-Fmoc-4-methoxy-4'-(γ -carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Anker synthetisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse beider Synthesen gut vergleichbar sind. Die Vorgehensweise ist folgende: wie bei den Adpoc-Synthesen wird zunächst die Fmoc-Gruppe vom Anker mit 20 % Piperidin/DMF abgespalten.

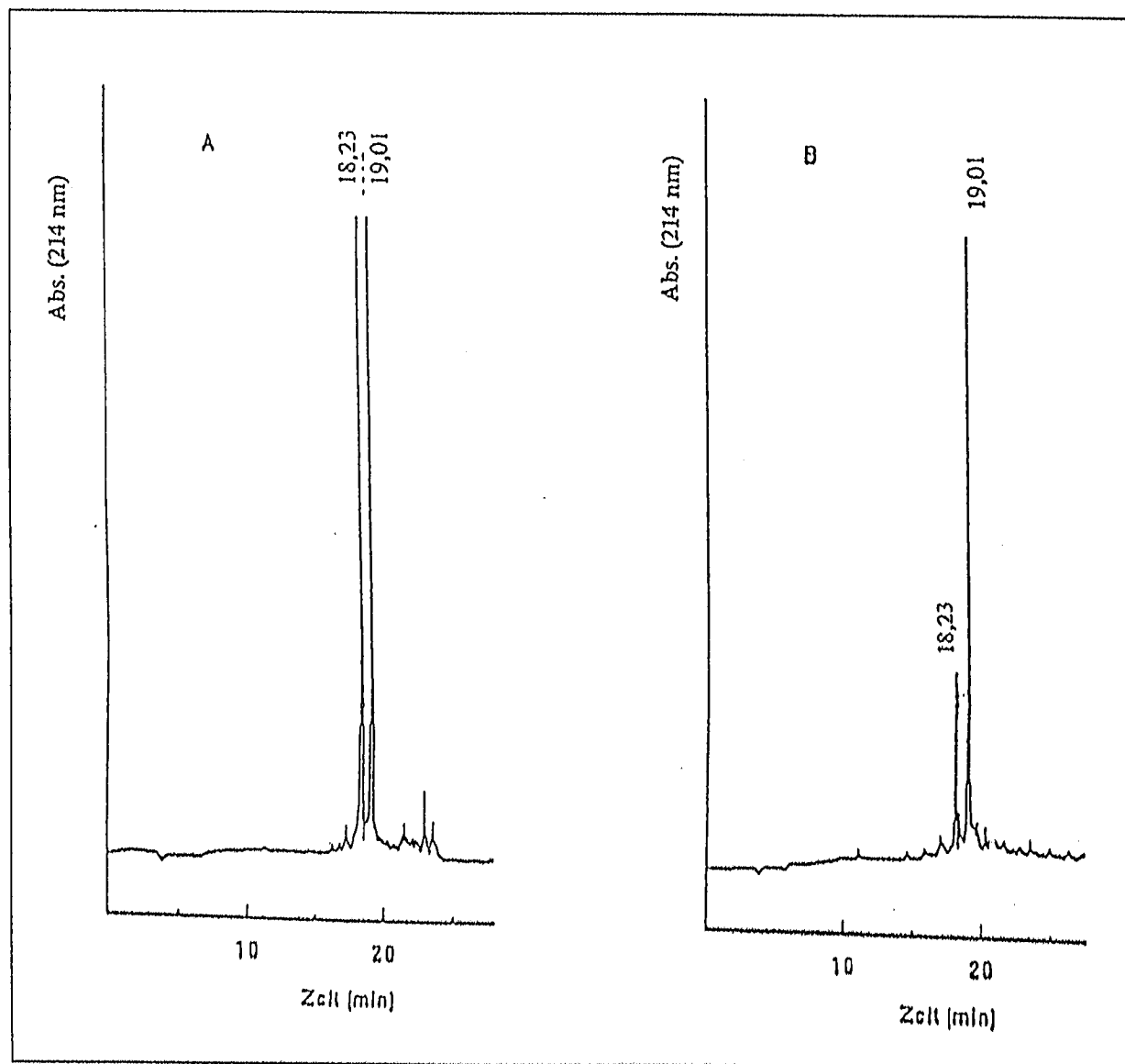


Abb. 16. HPL-Chromatogramm von LH-RH (19) (mit Adpoc-Strategie 1 synthetisiert).

(A): rohes Abspaltungsprodukt, (B): rohes Abspaltungsprodukt nach erneuter Abspaltung und Kupplung. Chromatographische Bedingungen: Eluens: A: 0.058 % TFA in H₂O; B: TFA/H₂O/CH₃CN: 0.5/400/600; Gradientenelution: 0-1 min 95 % A, 1-31 min 95-5 % A; Flussrate: 1.0 ml/min; Detektion: UV bei $\lambda = 214$ nm.

IV. SPEZIELLER TEIL

Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit 50 % Piperidin/DMF und nach mehrmaligem Waschen mit DMF, MeOH und DCM erfolgt die Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäurederivate mit DCC/HOBt⁶⁰. Das Entstehen eines Nebenproduktes wie bei der Adpoc-Synthese 1 konnte hier nicht beobachtet werden, da die Fmoc-Gruppe basisch entfernt wird, und die Trt-Schutzgruppe unter diesen Bedingungen nicht abspaltet.

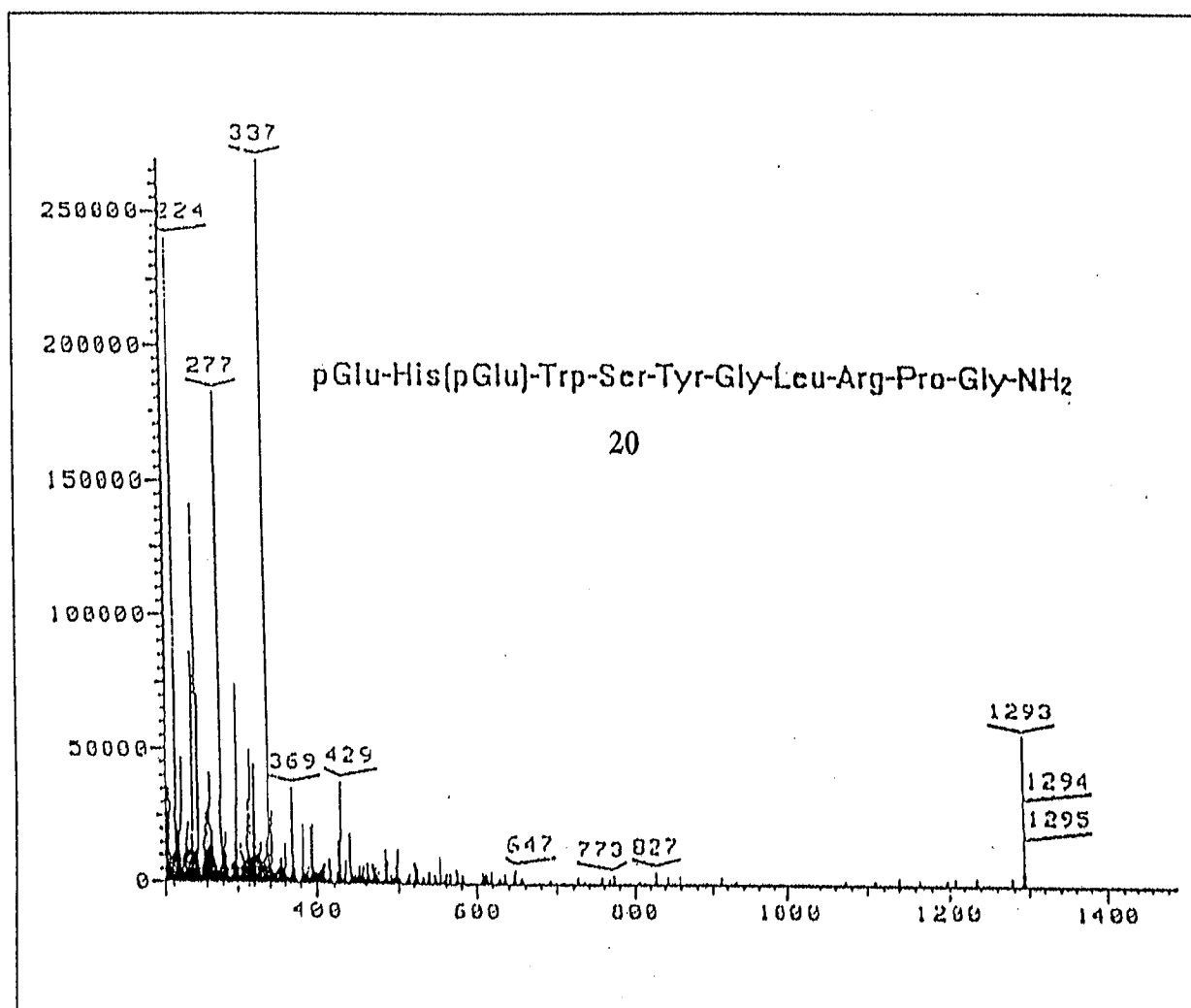


Abb. 17. FAB-MS-Spektrum des Nebenprodukts LH-RH (2-pGlu)-Peptid (20), welches bei der Adpoc-LH-RH-Synthese 1 entstanden ist. m/z : 1293 = 112+1180+1, [p-Glu + LH-RH + H]⁺.

IV.2.8.5.1. Abspaltung und Reinigung von LH-RH (19)

Nach dem Peptidaufbau erfolgt die Aufarbeitung des LH-RH-Harzes (s. exp. Teil, Kapitel V.6.8.).

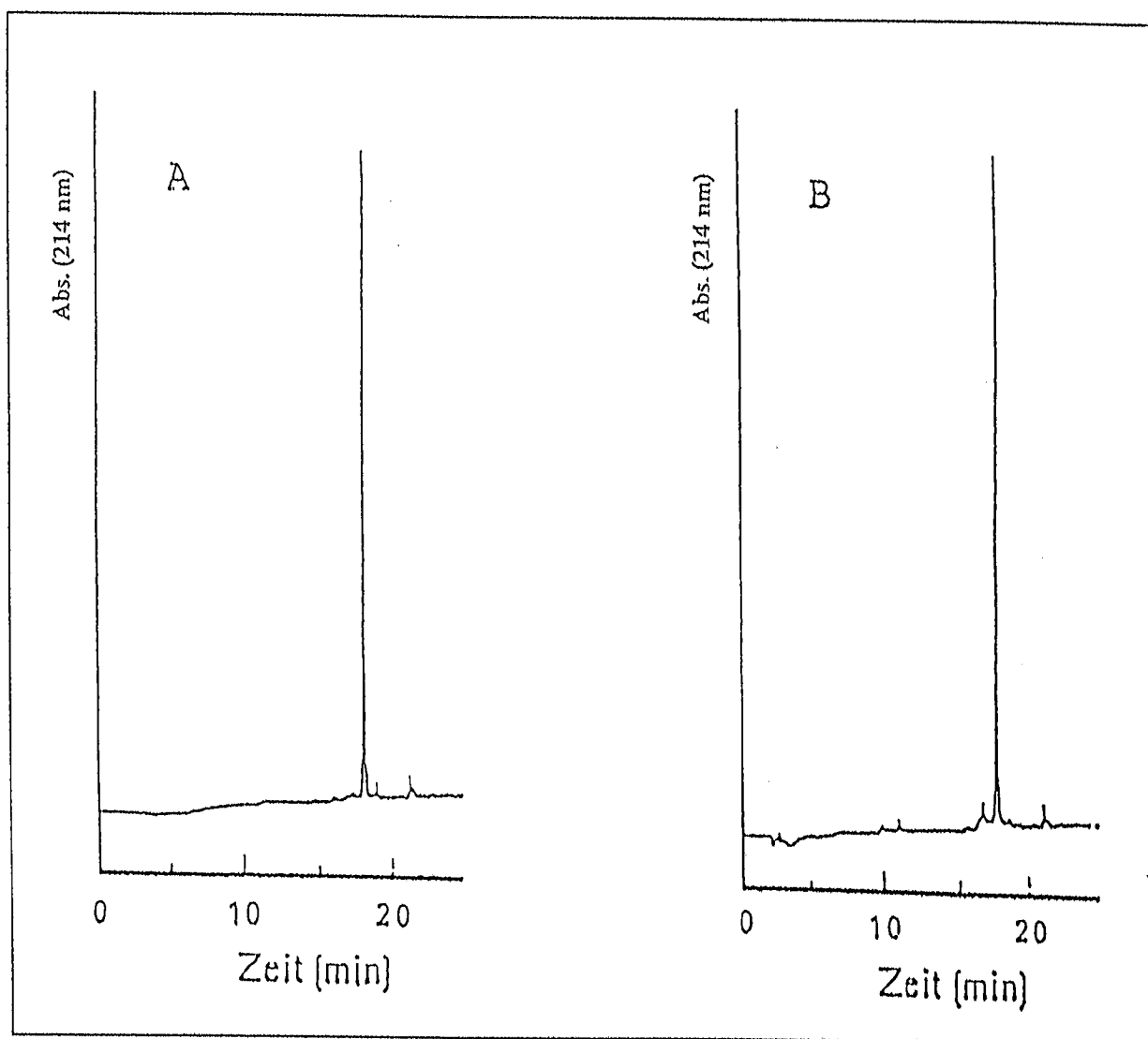


Abb. 18. HPL-Chromatogramm von LH-RH (19) (mit Adpoc-Strategie 2 synthetisiert).

(A): rohes Abspaltungsprodukt von Adpoc-Synthese-2; (B): rohes Abspaltungsprodukt der Fmoc-Synthese. Chromatographische Bedingungen: Eluens: A: 0.058 % TFA in H₂O; B: TFA/H₂O/CH₃CN: 0.5/400/600; Gradientenelution: 0-1 min 95 % A, 1-31 min 95-5 % A; Flussrate: 1.0 ml/min; Detektion: UV bei $\lambda = 214$ nm.

IV.3. Die 1-(4-tert-Butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl(p-Bumeoc-)-N^α-Aminoschutzgruppe

Die p-Bumeoc-Gruppe, die chemisch in die Klasse der Urethane einzuordnen ist, dient dem temporären Schutz der N^α-Funktionen von Aminosäuren und Peptiden. Als Grundvoraussetzung für eine grosse acidolytische Labilität der schon bekannten säurelabilen Gruppen wird die α,α -Dimethylfunktion angesehen. Diese neue Schutzgruppe besitzt in para-Stellung eine tert-Butylgruppe mit einem +I-Effekt, was die Säurelabilität und die Lipophilie erheblich steigert. Neben der α,α -Dimethylfunktion enthält die Schutzgruppe im Phenyl-1-methylethoxy-carbonyl-Teil eine para-ständige tert-Butylgruppe mit einem +I-Effekt, welche die Lipophilie zusätzlich erhöht und die Acidolyse deutlich beeinflusst.

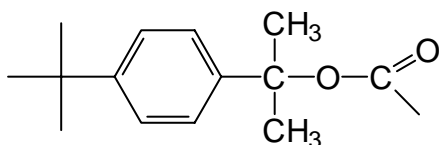


Abb. 19. Struktur der 1-(4-tert-Butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl (p-Bumeoc)-Schutzgruppe.

IV.3.1. Abhängigkeit der Säurelabilität der Urethan-Aminoschutzgruppen von der Molekülstruktur

Bei der acidolytischen Abspaltung einer Aminoschutzgruppe vom Urethantyp erfolgt zunächst ein elektrophiler Angriff eines Protons an das nukleophile Zentrum des Bindungssystems. Dabei hängt die Reaktionsgeschwindigkeit der Protonierung im Falle urethan-geschützter Aminosäuren und Peptide von der Nukleophilie der Carbonyl-Gruppe des Carbamidsäureesters ab. Abb. 20 zeigt den acidolytischen Spaltungsmechanismus der p-Bumeoc-Schutzgruppe.

Im Vergleich zur Benzyloxycarbonyl-Gruppe lassen sich die am α -C-Atom durch Methylgruppen substituierten Analoga leichter abspalten. Bereits die Ppoc-Gruppe^{94, 95}, die sich lediglich durch die beiden Methylgruppen am α -C-Atom von der Z-Gruppe unterscheidet, lässt sich mit 80%iger Essigsäure entfernen, während die Z-Gruppe nur unter drastischen Bedingungen, wie HBr/Eisessig, abgespalten werden kann. Der Einfluss der Methylgruppen auf die Säurelabilität von Urethan-Schutzgruppen ist dadurch erkennbar. Beispielsweise ist die Ppoc-Gruppe 700 mal reaktiver als die Boc-Gruppe (Tab. 8). Es besteht

also ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Säurelabilität einer Aminoschutzgruppe des Urethan-Typs und der Struktur.

Der Mechanismus der Acidolyse lässt sich durch sterische und elektronische Variation im Molekül steuern. Durch Substituenten am α -C-Atom, die einen +I-Effekt besitzen, wird die Schutzgruppe insofern durch Säuren destabilisiert, als das Carbonyl-C-Atom eine hohe Elektronendichte auf das benachbarte Sauerstoffatom der Carbonyl-Gruppe überträgt. Hier kann das Proton einer Säure gut angreifen. Substituenten mit einem +I-Effekt am aromatischen Ring bewirken eine Spaltung bevorzugt nach dem S_N^1 -Mechanismus (AA11) und begünstigen eine monomolekulare Reaktionskinetik⁹⁶. Die positive Ladung am Carbonyl-C-Atom wird so kompensiert und die Stabilität des Carbenium-Ions, das intermediär bei der Acidolyse entsteht, wird erhöht. Dagegen begünstigen Substituenten mit einem -I-Effekt im aromatischen System einen S_N^2 -Verlauf (AA12)^{97, 98}. Nach erfolgter Desacylierung von p-Bumeoc-Aminosäuren kann durch Extraktion mit einem apolaren Lösungsmittel, z.B. n-Hexan, die freigesetzte p-Bumeoc-Verbindung erhalten werden. Durch Massenspektrometrie und Infrarotspektroskopie kann man zeigen, dass sich das entstehende Carbenium-Ion **21** in wasserfreiem Reaktionsmedium (TFA/ CH_2Cl_2) zum 2-(4-tert-Butylphenyl)-1-propen (**22**), in wasserhaltigem Abspaltungsmilieu (Essigsäure/Ameisensäure/Wasser) zusätzlich zum entsprechenden Carbinol **23** stabilisiert ($X^- = OH^-$, Abb. 20).

IV.3.2. Quantifizierung der Säurelabilität in Abhängigkeit der Substituenten in aromatischen Urethan-Systemen

Bei elektrophilen Substitutions-, Additions- und Eliminierungsreaktionen kann mit der sogenannten "linearen freien Energiebeziehung" die Wirkung der Substituenten an Benzolderivaten quantifiziert werden. Die lineare freie Energiebeziehung besagt, dass zwischen der freien Enthalpie und der Reaktionsgeschwindigkeit vieler Reaktionen eine lineare Beziehung besteht⁹⁹.

Durch die Hammett-Gleichung wird der Einfluss der Substituenten beschrieben. Sie stellt den proportionalen Zusammenhang der relativen Geschwindigkeit mit einem Substitutionsparameter σ und einem Reaktionsparameter ρ her. Eine hohe Elektronendichte am Reaktionszentrum begünstigt eine Reaktion und man erhält negative ρ -Werte. Als Maß für die elektronischen Effekte von Substituenten in m- und p-Stellung dient die Substitutionskonstante σ , welche die Induktions- und Mesomerieeffekte wiedergibt. Die Abspaltung der Urethan-Schutzgruppen wird bei elektrophilen Reaktionen durch

IV. SPEZIELLER TEIL

Elektronendonatoren im aromatischen System beschleunigt. Der negative σ -Wert¹⁰⁰ ist ein unmittelbares Mass für die Säurelabilität.

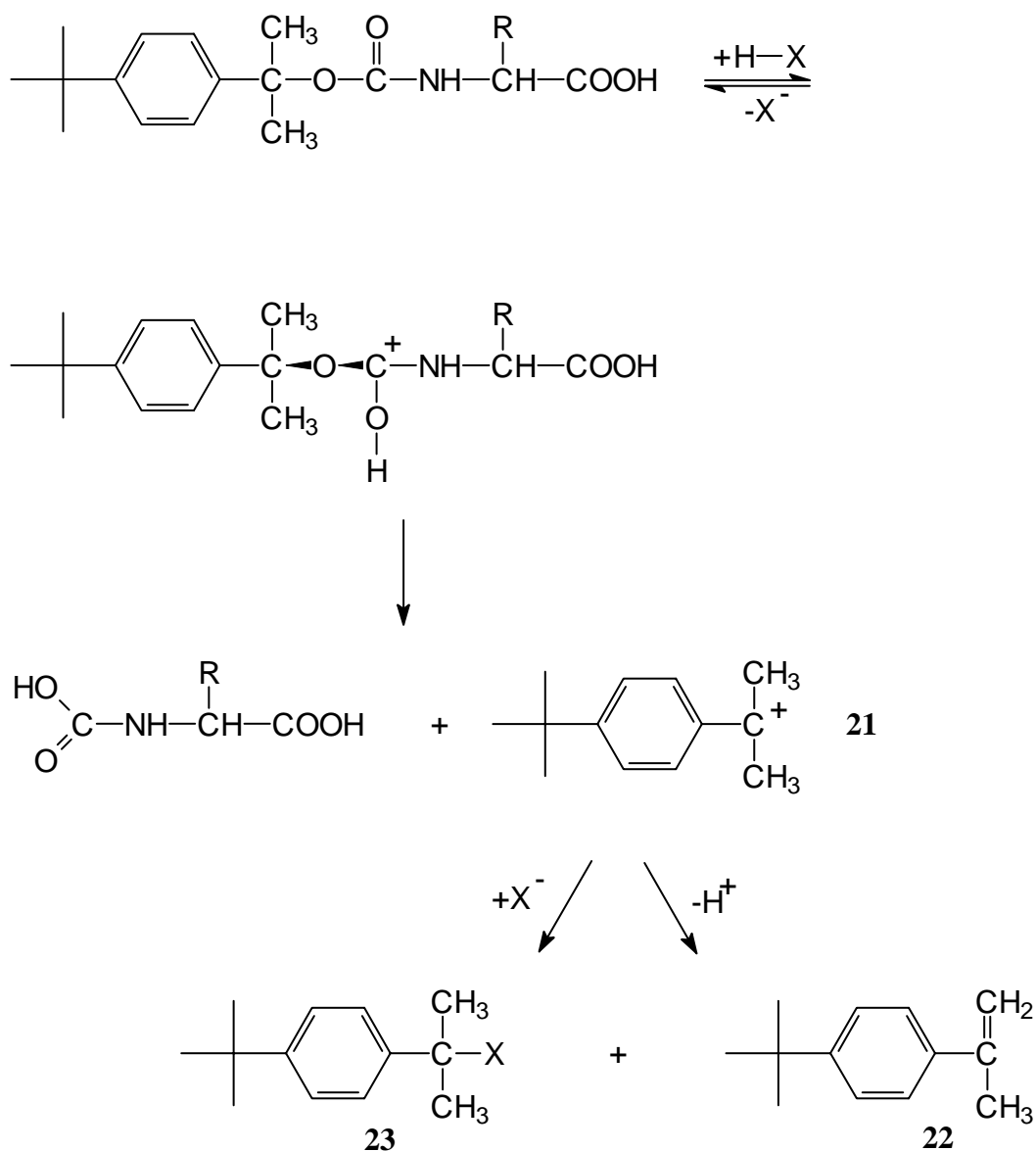
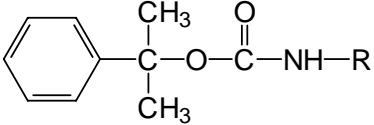
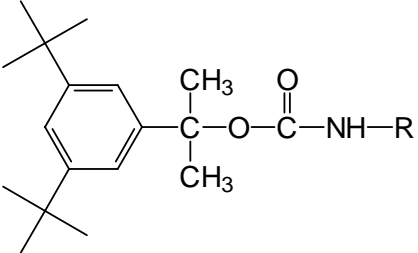
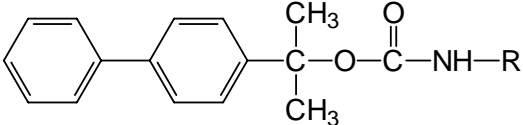
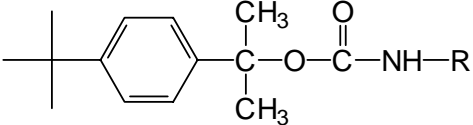
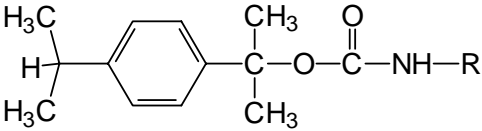
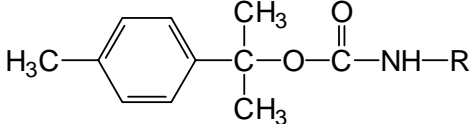


Abb. 20. Acidolytischer Spaltungsmechanismus der p-Bumeoc-Schutzgruppe.

In Tab. 5 sind die chemischen Strukturformeln säurelabiler aromatischer Urethanschutzgruppen, sowie die entsprechenden Substituentenkonstanten σ_m , σ_p der monosubstituierten Komponente aus der Hammett-Gleichung wiedergegeben. In 3,5-disubstituierten Systemen, wie bei t-Bumeoc-, können die Substituenteneffekte als Summe der individuellen σ -Werte ausgedrückt werden¹⁰⁰.

IV. SPEZIELLER TEIL

Tab. 5. Substituentenkonstanten σ der entsprechenden monosubstituierten Verbindungen^{100, 101}, von in meta- und para-Stellung substituierten Urethan- Schutzgruppen.

Strukturformel	σ_m	σ_p
 <p>1-(Phenyl)-1-methylethoxycarbonyl(Ppoc)</p>	0.000	0.000
 <p>1-(3,5-Di-tert-butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl(t-Bumeoc)</p>	- 0.100	
 <p>1-(1-Biphenyl)-1-methylethoxycarbonyl(Bpoc)</p>		- 0.179
 <p>1-(4-tert-Butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl(p-Bumeoc)</p>		- 0.256
 <p>1-(4-Isopropylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl(Iso-Meoc)</p>		nicht bekannt
 <p>1-(Tolyl)-1-methylethoxycarbonyl</p>		- 0.311 instabil

IV. SPEZIELLER TEIL

Mono- bzw. dialkylsubstituierte Aromaten aktivieren den Carbonyl-Kohlenstoff des Reaktionszentrums. In meta-Stellung befindliche elektronenliefernde Substituenten bewirken ebenfalls eine Polarisierung der Carbonylbindung und erleichtern somit die Protonierung. Dies wirkt sich auf die Säurelabilität der Urethan-Schutzgruppe aus und kann zur Vorhersage und Konstruktion neuer säurelabiler Schutzgruppen verwendet werden. Die aussergewöhnliche Säurelabilität der p-Bumeoc-Schutzgruppe kann somit erklärt werden.

In Tab. 8, Kapitel IV.3.7., sind die absoluten und relativen Geschwindigkeitskonstanten extrem säurelabiler Schutzgruppen zusammengestellt. Verwendet werden für die Acidolyse die üblichen Spaltmedien.

IV.3.3. Synthese der Ausgangsverbindung und Einführungsreagenzien der p-Bumeoc-Schutzgruppe

Das Schema des zur Darstellung der p-Bumeoc-Einführungsgruppen benötigten Alkohols 2-(4-tert-Butylphenyl)-2-propanol¹⁰² (p-Bumeoc-OH) (**27**) ist in Abb. 21 skizziert. Als Ausgangsverbindung dient die 4-tert-Butylbenzoesäure (**24**).

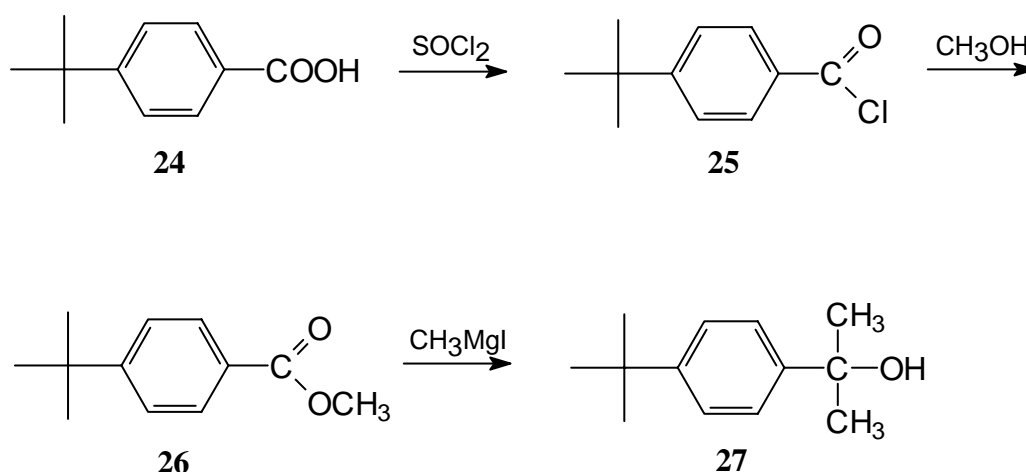


Abb. 21. Syntheschema zur Darstellung von 2-(4-tert-Butylphenyl)-2-propanol (**27**).

Zunächst wird die 4-tert-Butylbenzoesäure (**24**) nach üblicher Vorschrift^{102, 103} mit Thionylchlorid zum entsprechenden Säurechlorid **25**, welches dann über den Methyl ester **26** mit Methylmagnesiumiodid (Grignard-Reaktion) zu 2-(4-tert-Butylphenyl)-2-propanol (**27**) umgesetzt wird. Diese verhältnismässig einfache Herstellungsweise ist ein weiteres Kriterium

IV. SPEZIELLER TEIL

für die praktische Anwendung dieser Schutzgruppe. In dieser Arbeit sollte vor allem gezeigt werden, dass die Einführung der p-Bumeoc-Schutzgruppe nicht, wie sonst üblich, über den entsprechenden Fluorameisensäureester 29, dessen Herstellung über das gesundheitsschädliche Fluorphosgen (5) unter Beachtung besonderer Vorsichtsmassnahmen, sondern alternativ durch ein anderes, gut handhabbares Einführungsreagenz, dem entsprechenden Phenylcarbonat 28, möglich ist. Von den Verbindungen 26, 27 und 28 wurden $^1\text{H-NMR}$ -bzw. $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren aufgenommen.

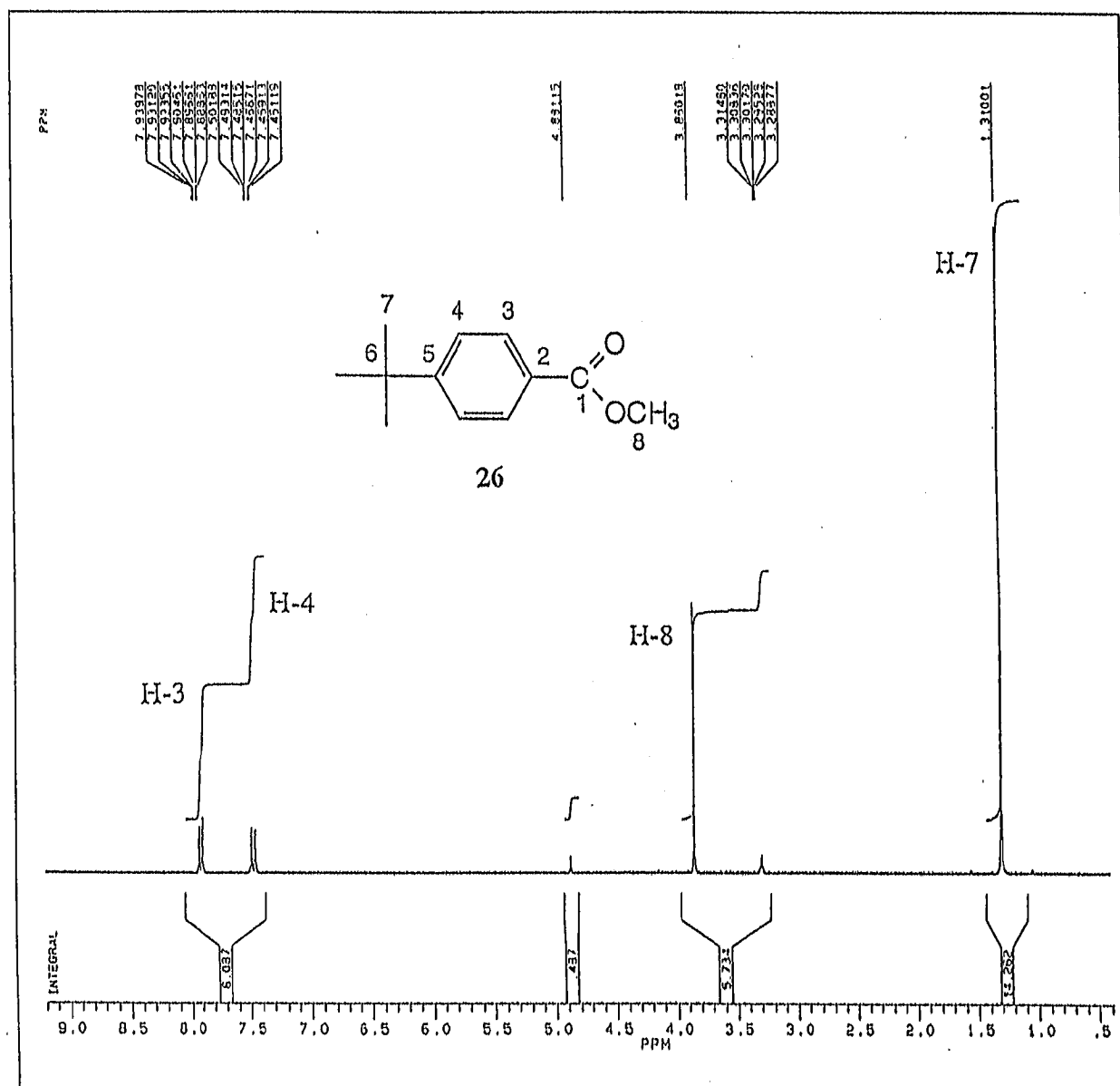


Abb. 22. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 4-tert-Butylbenzoesäuremethylester¹⁰⁴ (26) (100 mg in 1 ml MeOH, 250.134 MHz) mit Signalzuordnung (δ , ppm): ($\delta = 7.88-7.93$ (d, 2 H, C_6H_4 , H-3, H-

IV. SPEZIELLER TEIL

3'), 7.45-7.49 (d, 2 H, C₆H₄, H-4, H-4'), 3.86 (s, 3 H, -OCH₃, H-8), 1.31 (s, 9 H, tert-Butyl-, H-7)).

Im ¹H-NMR-Spektrum des Methylesters **26** (s. Abb. 22) sieht man, dass die vier Ringprotonen bei 7.88-7.93 ppm (H-3, H-3') und bei 7.45-7.49 ppm (H-4, H-4') jeweils in ein Dublett aufspalten.

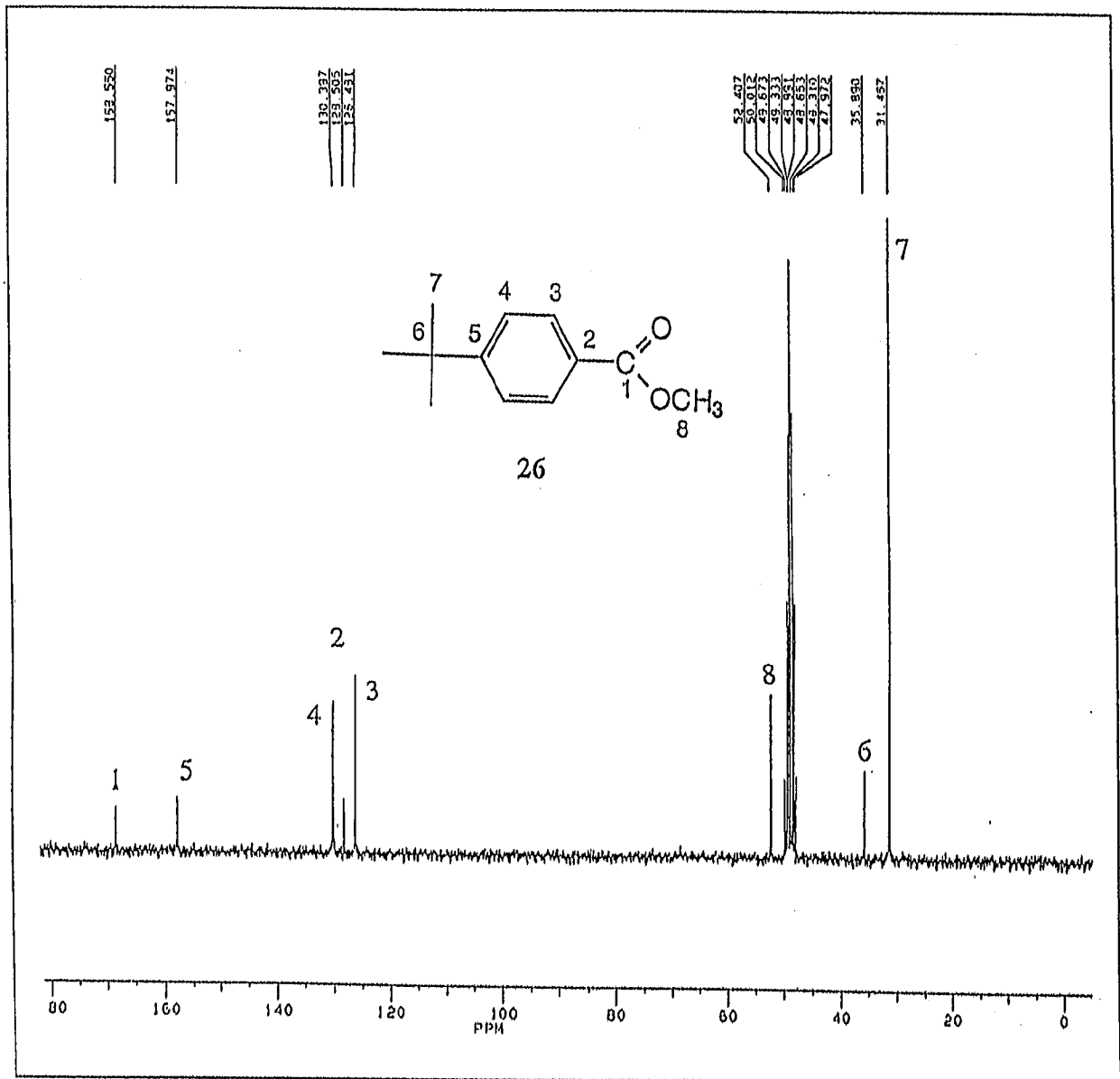


Abb. 23. ¹³C-NMR-Spektrum von 4-tert-Butylbenzoesäuremethylester (**26**) (100 mg in 1 ml MeOH, 62.896 MHz, protonenbreitbandenkoppelt) mit Signalzuordnung (δ , ppm): ($\delta = 31.46$ (C-7, tert-Butyl), 35.89 (C-6, Cq), 52.40 (C-8), 126.48 (C-3, C-3'), 128.50 (C-2), 130.39 (C-4, C-4'), 157.97 (C-5), 168.55 (C-1)).

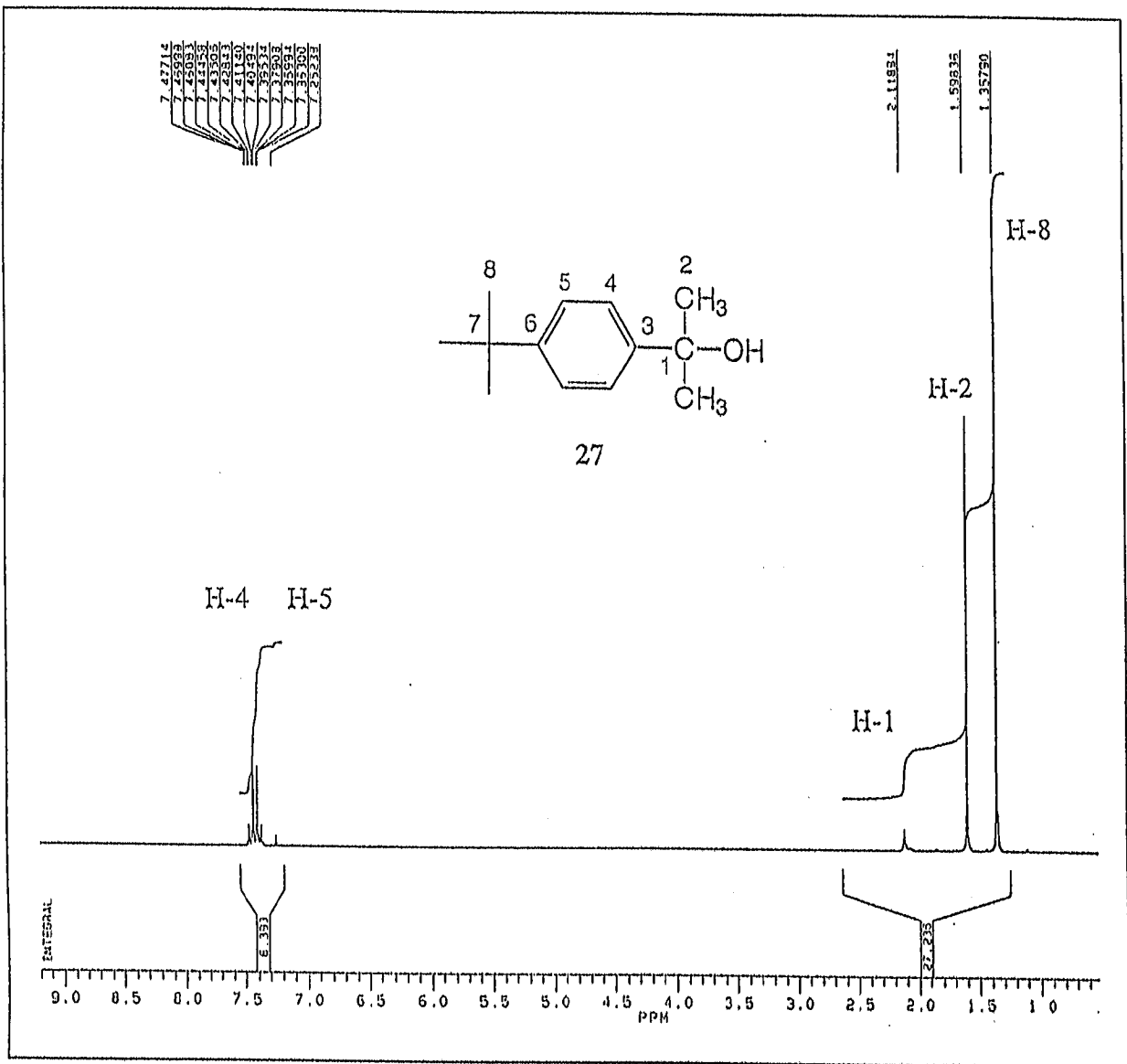


Abb. 24. ^1H -NMR-Spektrum von 2-(4-tert-Butylphenyl)-propanol (27) (100 mg in 1 ml CDCl_3 , 250.133 MHz). Interpretation der wichtigsten Signale(δ , ppm) ($\delta = 7.36\text{--}7.47$ (d, d, 4 H; H-4, H-4', H-5, H-5'); C_6H_4), 2.11 (s, 1 H, H-1; -OH), 1.59 (s, 6 H, H-2; CH_3), 1.35 (s, 9 H; H-8)). (80 MHz, CDCl_3 , $\delta = 7.38$ (s, 4 H), 1.73 (s, 1 H), 1.57 (s, 6 H), 1.31 (s, 9 H))¹⁰⁵.

Der Grund für diese Aufspaltung ist der Elektronenzug der beiden O-Atome am C-Atom-1, welches, bedingt durch die Polarisierung, die Elektronendichte an den C-Atomen 3 und 3' abzieht wodurch die Kerne H-3 und H-3' weniger abgeschirmt sind als die Kerne H-4 und H-4' und daher bei tieferem Feld erscheinen. Die vier Ringprotonen sind hier alle aufgrund des starken Elektronenzuges der Estergruppierung zu tieferem Feld verschoben.

IV. SPEZIELLER TEIL

Vergleicht man das ^1H -NMR-Spektrum des Esters **26** mit dem des entsprechenden Alkohols **27** (Abb. 24), so erkennt man eine deutliche Verschiebung der vier Ringprotonen nach höherem Feld, bedingt durch den +I-Effekt der beiden Methylgruppen am C-Atom-1. Dadurch ist der Elektronenzug am C-Atom-1 nicht so stark, wodurch eine grössere Abschirmung der Kerne H-4, H-4' und H-5, H-5' gegeben ist. Ausserdem sieht man hier, dass die beiden Dubletts (Bereich: $\delta = 7.36\text{-}7.47$ ppm) im Vergleich zu **26** sehr eng zusammenfallen. Die Abb. 23 und 25 zeigen die jeweiligen ^{13}C -NMR-Spektren von **26** bzw. **27**.

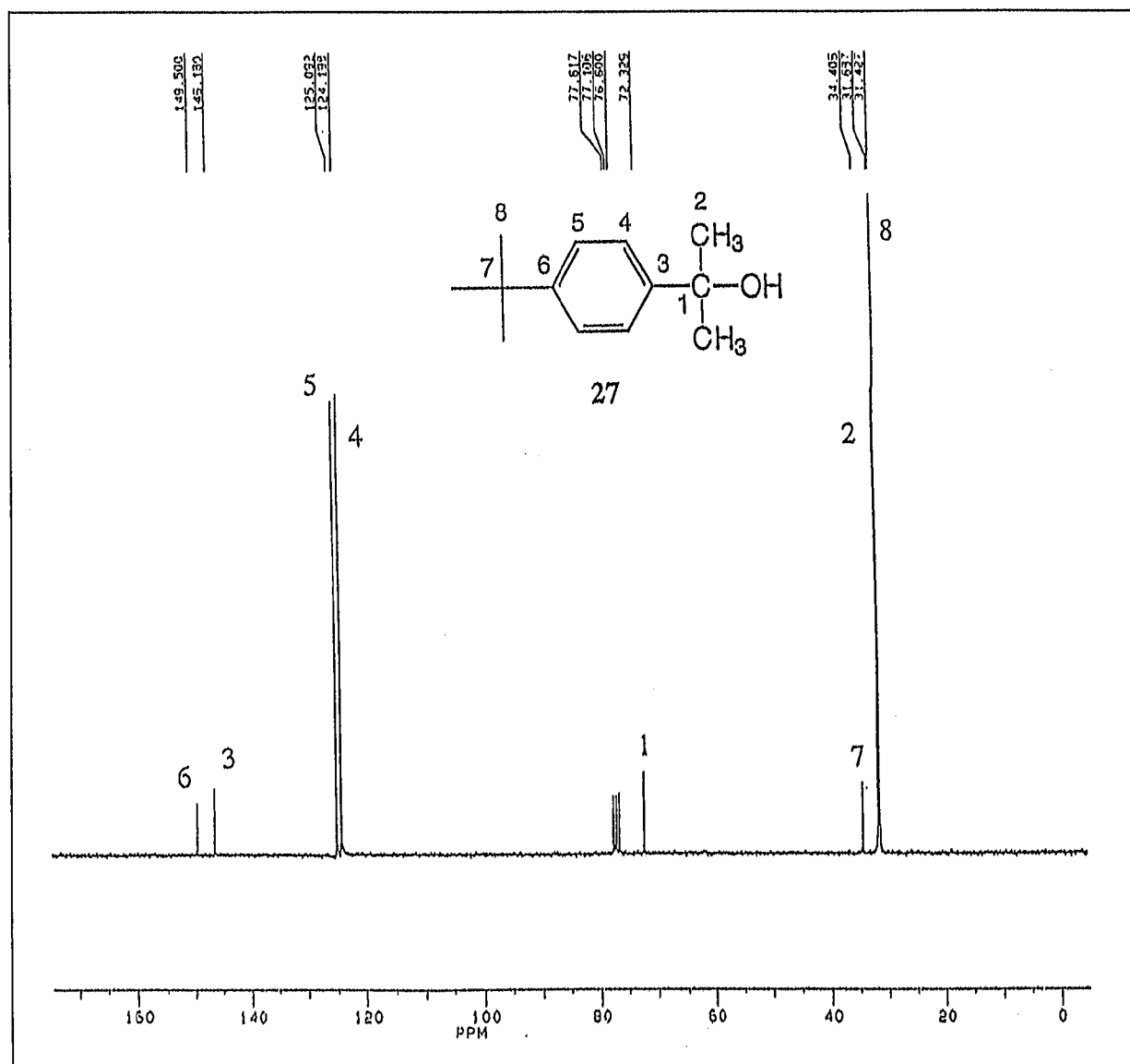
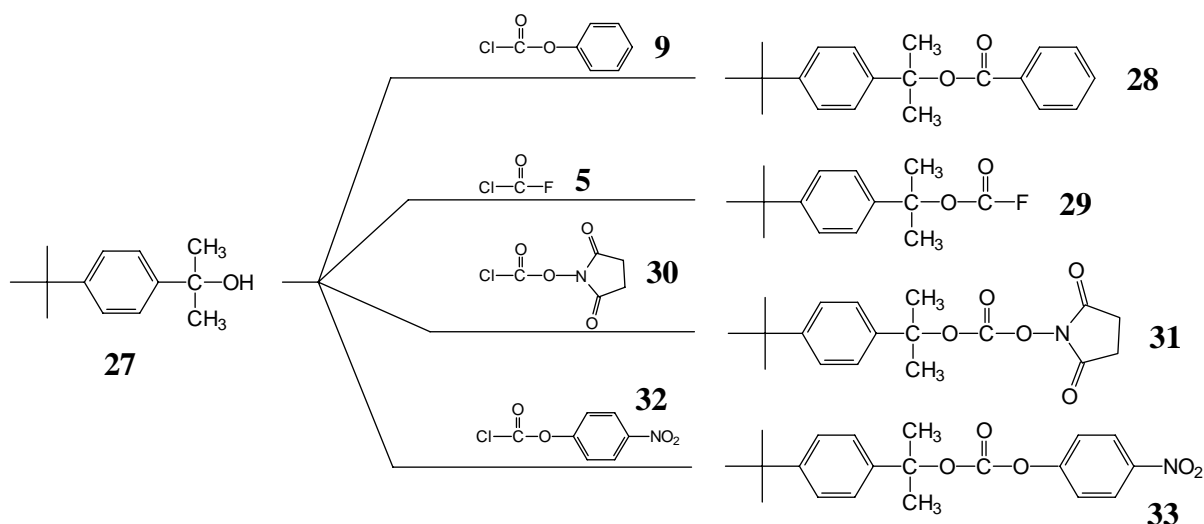


Abb. 25. ^{13}C -NMR-Spektrum von 2-(4-tert-Butylphenyl)-propanol (**27**) (100 mg in 1 ml CDCl_3 , 62.896 MHz, protonenbreitbandentkoppelt) mit Signalzuordnung (δ , ppm): ($\delta = 31.42$ (C-8, tert-Butyl), 31.68 (C-2), 34.40 (C-7, Cq), 72.32 (C-1), 124.19 (C-4, C-4'), 125.09 (C-5, C-5'), 146.18 (C-3), 149.50 (C-6)).

IV. SPEZIELLER TEIL

Die Einführung der Schutzgruppe erfolgt über das Phenylcarbonat **28** des p-Bumeoc-Restes. Der entsprechende Fluorameisensäureester **29**, der aus p-Bumeoc-Alkohol (**27**) und Fluorophosgen^{106, 107} (**5**) in Anwesenheit von Triethylamin oder Pyridin gewonnen wird, ist instabil, schwierig zu isolieren und eignet sich daher nur bedingt als Einführungsreagenz. Allerdings liegen die Ausbeuten bei der Umsetzung mit Aminosäuren etwas höher als bei dem entsprechenden Phenylcarbonat **28**. Der OSu-Ester **31** zersetzt sich bei der Aufarbeitung erheblich. Der entsprechende p-Nitrophenylester **33** zerfällt bei Raumtemperatur bereits in Lösung. Anhand der FD-MS-Spektren lässt sich zeigen, dass man über die Einführung der p-Bumeoc-Schutzgruppe mittels des Phenylcarbonats **28** auch die trifunktionellen Aminosäuren herstellen kann - allerdings mit geringerer Ausbeute. Abb. 26 zeigt eine Zusammenfassung der getesteten p-Bumeoc-Einführungsreagenzien.



p-Bumeoc-OPh (28)	[1-(4-tert-Butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl]-phenylester
p-Bumeoc-F (29)	Fluorameisensäure-[1-(4-tertbutylphenyl)-1-methylethyl]-ester
p-Bumeoc-OSu (31)	[1-(4-tert-Butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl]-N-hydroxy-succinimidester
p-Bumeoc-ONPh (33)	[1-(4-tert-Butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl]-p-nitrophenylester

Abb. 26. Schemata zur Darstellung von p-Bumeoc-Einführungsreagenzien.

IV. SPEZIELLER TEIL

Zur Einführung des p-Bumeoc-Restes werden die Benzyltrimethylammonium-(Triton-B)-Salze der Aminosäuren in abs. Dimethylformamid mit dem Reagenz 28 umgesetzt. Durch anschliessendes Ansäuern mit 5%iger Zitronensäure erhält man die geschützten Aminosäuren in zufriedenstellenden Ausbeuten.

Abb. 27/28 zeigt die ^1H -/ ^{13}C -NMR-Spektren des p-Bumeocphenylcarbonats (28).

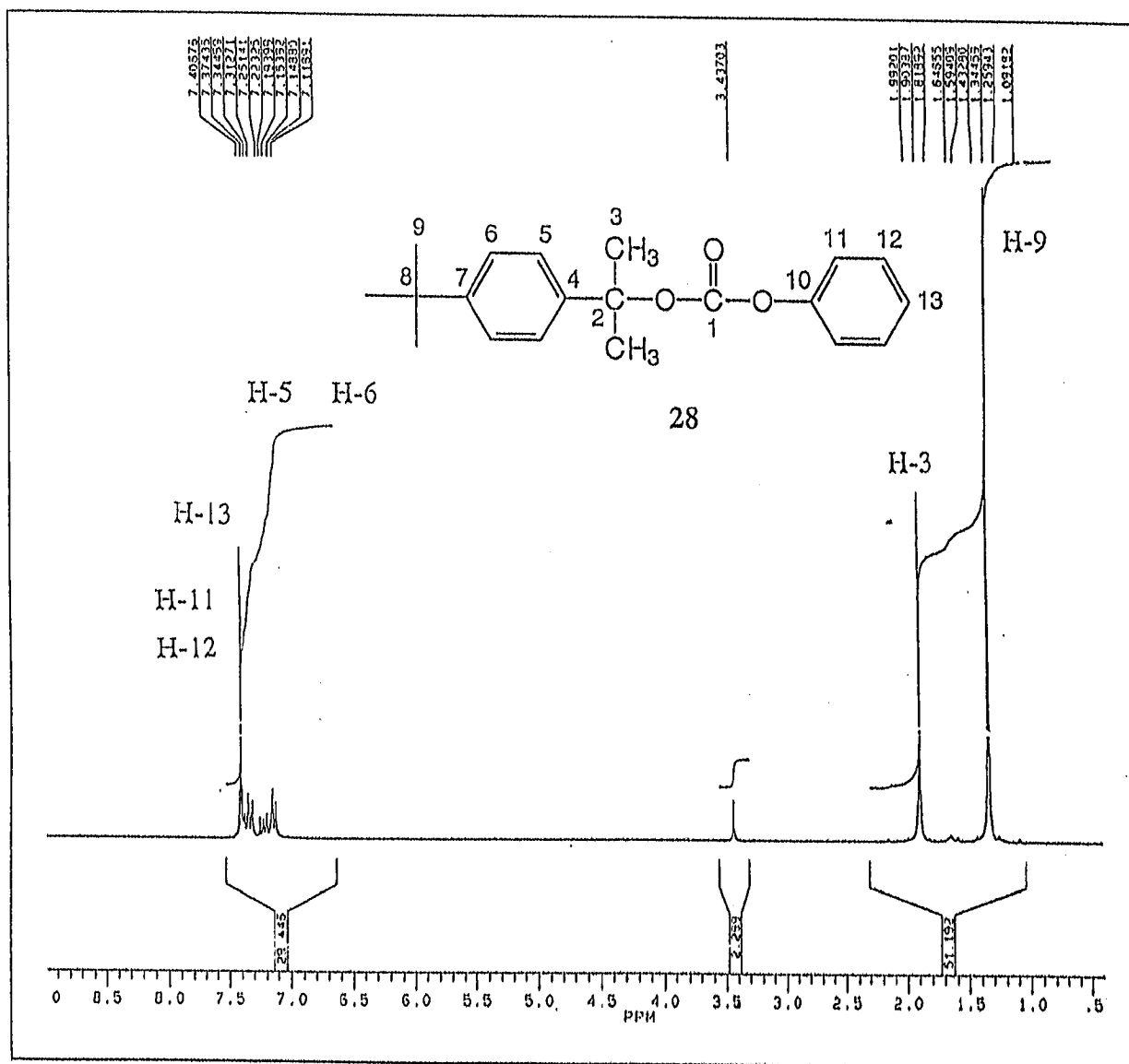


Abb. 27. ^1H -NMR von p-Bumeocphenylcarbonat (28) (100 mg in 1 ml CDCl_3 , 250.133 MHz). Interpretation der wichtigsten Signale(δ , ppm) ($\delta = 7.31-7.40$ (m, H-11, H-11', H-12, H-12', H-13), 7.11-7.22 (d, d, 4 H, H-5, H-5', H-6, H-6', C_6H_4), 1.90 (s, 6 H, H-3), 1.34 (s, 9 H, tert-Butyl, H-9)).

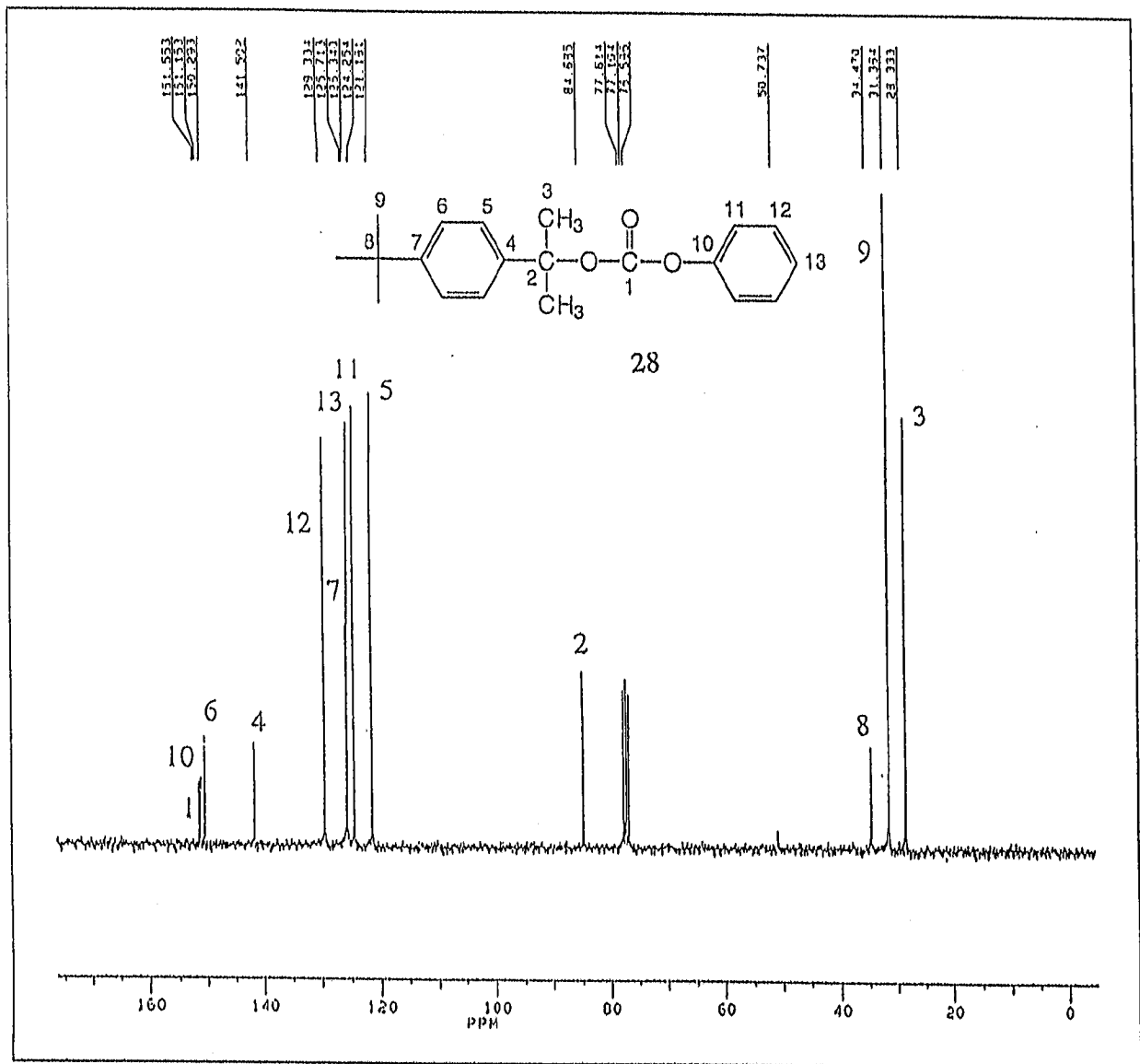


Abb. 28. ^{13}C -NMR-Spektrum von p-Bumeocphenylcarbonat (28) (100 mg in 1 ml CDCl_3 ; 62.896 MHz, protonenbreitbandentkoppelt). Interpretation der wichtigsten Signale (δ , ppm) ($\delta = 28.33$ (C-3), 31.36 (C-9), 34.47 (C-8, Cq), 84.68 (C-2), 121.18 (C-5, C-5'), 124.25 (C-11, C-11'), 125.34 (C-13), 125.71 (C-7), 129.33 (C-12, C-12'), 141.50 (C-4), 150.29 (C-6, C-6'), 151.15 (C-10), 151.55 (C-1, Cureth.)).

IV.3.4. Felddesorptions-Massenspektrometrie

In dieser Arbeit werden die Strukturen der neuen Verbindungen auch durch FD-MS bewiesen. Zunächst werden bei hoher Feldstärke Ionen erzeugt. Dazu wird die Probe auf der Emitteroberfläche, z. B. Wolframdraht, adsorbiert, und die Ionen durch den Kontakt mit der Emitteroberfläche gebildet. Durch das hohe elektrische Feld werden M^+ - und durch

IV. SPEZIELLER TEIL

feldinduzierte Oberflächenreaktionen M^+H^+ -Ionen gebildet. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, dass die Probe nicht separat verdampft werden muss und somit thermische Zersetzung unterdrückt werden. Dadurch sind die Spektren gegenüber denen der Elektronenstossionisation sehr vereinfacht. Diese Technik dient vor allem zur Untersuchung von schwer flüchtigen und thermisch labilen Substanzen. Die folgenden Abbildungen zeigen, dass auch Substanzen mit thermolabilen Gruppen und solche, die in Salzform vorliegen mit der FD-Methode aussagekräftige Massenspektren liefern. Von den Verbindungen 15, 28, 34-41, 47, 52, 53 und 57 wurden solche FD-MS-Spektren aufgenommen. So sieht man in Abb. 29 (Verbindung 28) bei m/z : 175.0 das Fragment $([C_4H_9(C_6H_4)C(CH_3)_2]^+)$, nach der Spaltung des Gesamtmoleküls (FD-MS-Peak bei m/z : 312.1 ($[M]^+$)).

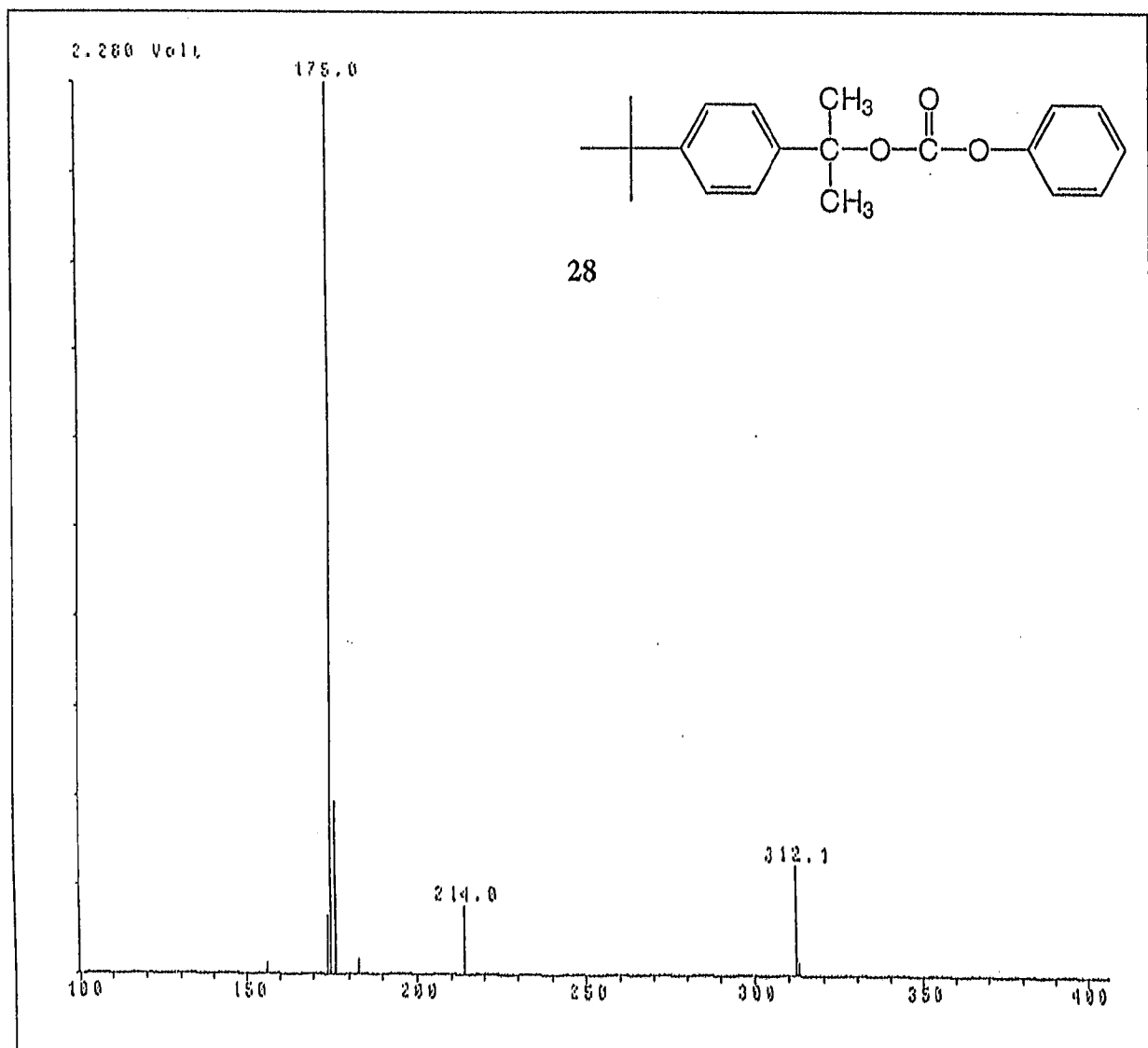


Abb. 29. FD-MS-Spektrum von *p*-Bumeocphenylcarbonat (28) (m/z : 313.1 ($[MH]^+$), 312.1 ($[M]^+$), 214.0 ($[Diphenylcarbonat]^+$), 175.0 ($[C_4H_9(C_6H_4)C(CH_3)_2]^+$)).

IV. SPEZIELLER TEIL

Es ist in diesem Spektrum auch zu erkennen, dass sich während der Synthese zum p-Bumeocphenylcarbonat (**28**) das Diphenylcarbonat bildet (Peak bei m/z: 214.0 ([Diphenylcarbonat]⁺)). Die Temperatur der Ionenquelle beträgt hier 35 °C.

Die Elementaranalyse des p-Bumeocphenylcarbonats (**28**) (s. exp. Teil) zeigt, dass man diese Verbindung in reiner Form isolieren kann. Um Verbindung **28** rein zu erhalten, wäscht man rasch mit kaltem Methanol, weil Verunreinigungen so entfernt werden können. Zusätzlich konnte mittels FD-MS dessen Existenz bewiesen werden (Abb. 29).

Von den p-Bumeoc-geschützten Aminosäuren **36-40** wurden die Verbindungen **36-38** (Abb. 35-37) und **40** (Abb. 39) in Form ihrer DCHA-Salze gemessen. Verbindung **39** (Abb. 38) lag in Form des CHA-Salzes vor. Abb 34 zeigt das FD-MS-Spektrum von p-Bumeoc-L-Leu-OH (**35**). Es handelt sich dabei um die freie Säure. Man sieht bei m/z: 350.0 den [MH]⁺-Peak, nachdem sich an das Gesamtmolekül ein Proton angelagert hat, neben dem [M]⁺-Peak bei m/z: 349.0 (durch Herausschlagen eines Elektrons entstanden). Aufnahmen vom FD-MS-Spektrum, im Messbereich von 100-1000 m/z, zeigt bei m/z: 175 das Carbokation ([C₄H₉(C₆H₄)C(CH₃)₂]⁺). Bei den Verbindungen **36-40**, die in Form ihrer Salze gemessen wurden, findet man jeweils zwischen 100 und 200 m/z noch zusätzlich einen Peak, durch [DCHA]⁺- bzw. [CHA]⁺ bei m/z: 181 bzw. 99 verursacht. Die Temperatur der Ionenquelle beträgt bei der Messung der Verbindungen **35-40** jeweils 35 °C.

Bei Raumtemperatur zersetzt sich das p-Bumeocphenylcarbonat (**28**) entsprechend Abb. 30 (analog zur Bpoc-Schutzgruppe)¹⁰⁸ unter Abgabe von CO₂ zum 2-Phenoxy-2-tert-Butylphenylpropan (p-Bumeoc-Phenylether) (**34**), der mittels ¹H-NMR-, ¹³C-NMR- und FD-MS-Spektroskopie (s. Abb. 31, 32 und 33), sowie CHN-Analytik (s. exp. Teil) bestätigt wurde.

Das p-Bumeocphenylcarbonat (**28**) ist thermisch so instabil, dass es sich innerhalb weniger Stunden bereits teilweise zersetzt. Bei 0 °C wurde diese Zersetzung innerhalb von Tagen ebenfalls beobachtet.

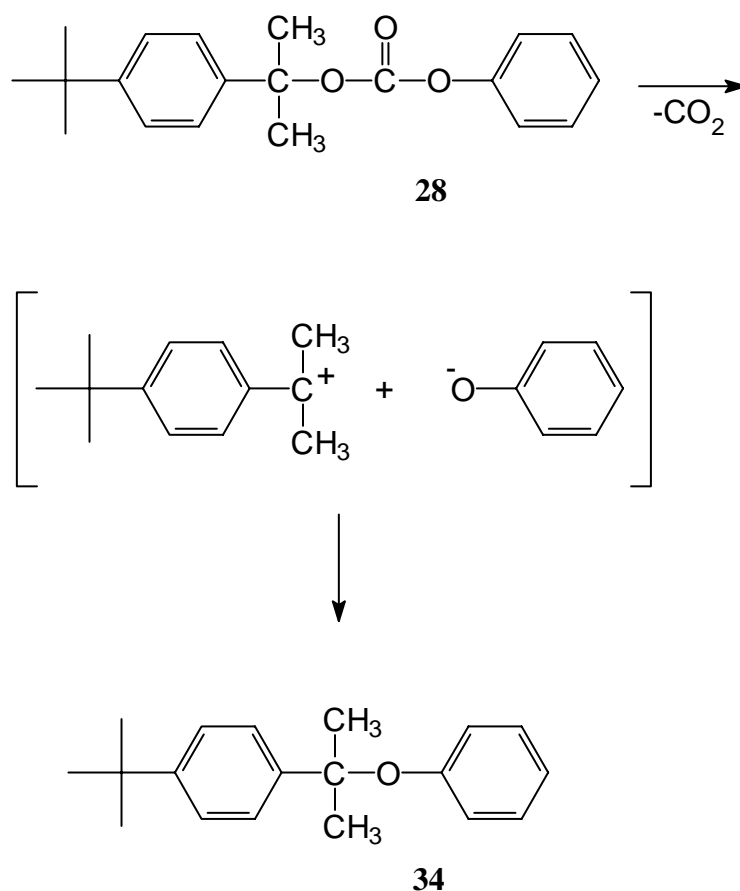


Abb. 30. Reaktionsschema der thermischen Zersetzung von p-Bumeocphenylcarbonat (28).

IV.3.5. Darstellung und chemische Eigenschaften p-Bumeoc-geschützter Aminosäuren

Die wesentliche Forderung für rasche und äusserst schonende acidolytische und folglich selektive Abspaltbarkeit erfüllen die bekannten säurelabilen Schutzgruppen nur bedingt. Die kommerziell zugänglichen und daher öfters eingesetzten Ddz- und Bpoc-geschützten Aminosäuren zersetzen sich leicht photolytisch bzw. bei längerer Lagerung und sind ausserdem bei katalytischen Hydrierungen nicht stabil. Diese Probleme können durch den alternativen Einsatz der p-Bumeoc-Gruppe zum Schutz der Aminofunktion von Aminosäuren und Peptiden umgangen werden.

- Die Einführung über den Fluorameisensäureester **29** gelingt sowohl über die Benzyltrimethyl-ammoniumsalze in organischen Lösungsmitteln, als auch in wässrig/organischer Lösung bei pH 8-10 und 0 °C in guten Ausbeuten. Allerdings ist der Fluorameisensäureester **29** schlecht handhabbar, da er sich relativ leicht zersetzt, so dass der Überführung der Aminosäuren in die entsprechenden Derivate mittels p-Bumeoc-

IV. SPEZIELLER TEIL

Phenylcarbonat (28) über die Benzyltrimethylammoniumsalze der Aminosäuren der Vorzug gegeben wird. Die Aminosäure Leu-OH konnte besonders gut mit dieser Methode in ihr Derivat umgesetzt werden. Dies zeigte sich bei der Aufarbeitung: Von allen Aminosäuren konnte p-Bromooc-L-Leu-OH (35) als einzige sofort ohne DCHA-Zusatz kristallin erhalten werden. Die anderen Aminosäuren mussten erst in ihr DCHA-Salz überführt werden, bevor sie nach dem Waschen mit 10%iger Zitronensäure dann ebenfalls kristallin erhalten werden konnten.

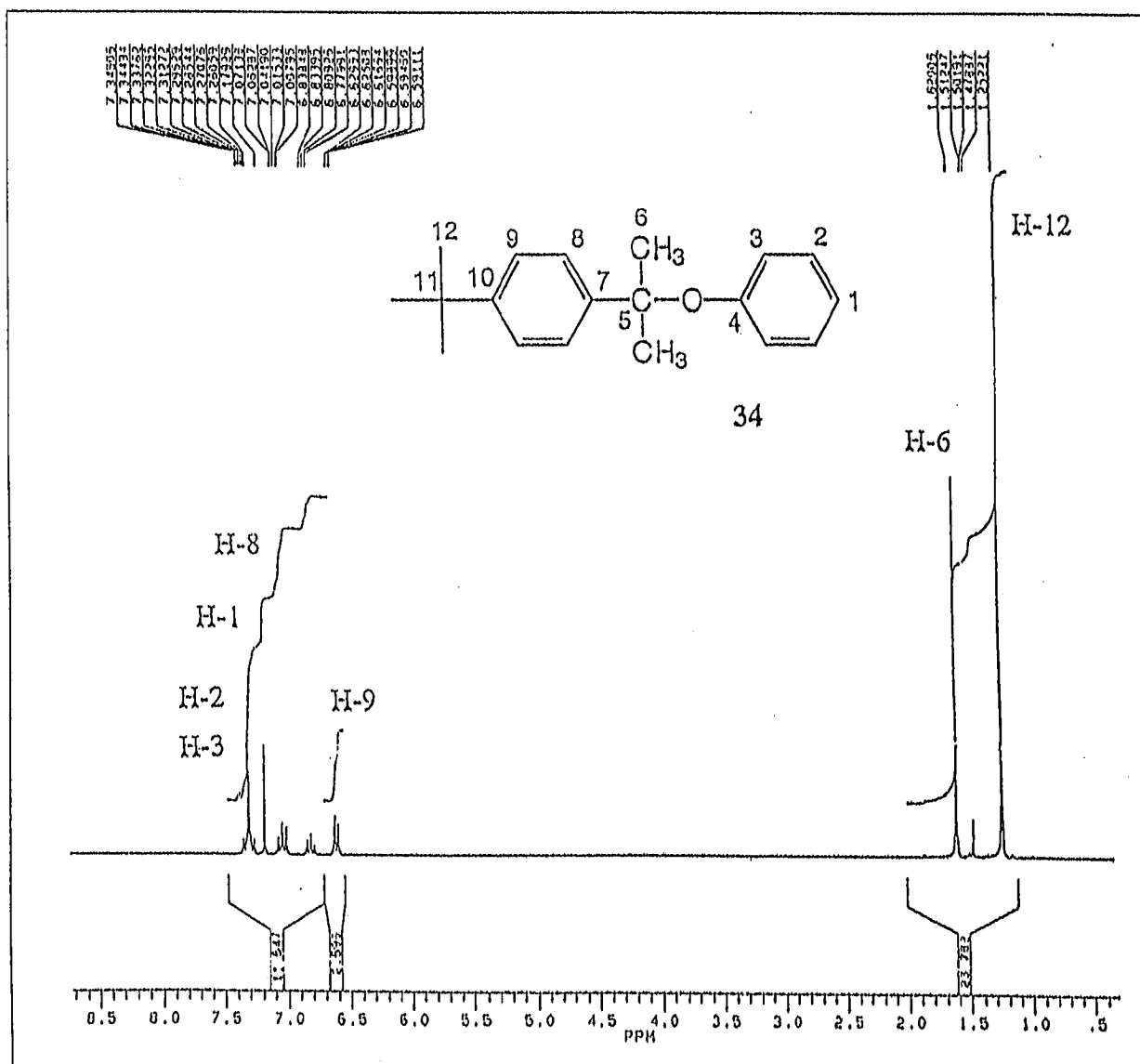


Abb. 31. $^1\text{H-NMR}$ von 2-Phenoxy-2-tert-butylphenyl-propan (34) (100 mg in 1 ml CDCl_3 , 250.134 MHz). Interpretation der wichtigsten Signale(δ , ppm) ($\delta = 7.26-7.34$ (m, 4 H, H-2, H-2', H-3, H-3'), 7.17 (s, 1 H, H-1), 7.00-7.07 (m, 2 H, H-8, H-8'), 6.59-6.62 (m, 2 H, H-9, H-9'), 1.62 (s, 6 H, H-6), 1.25 (s, 9 H, H-12)).

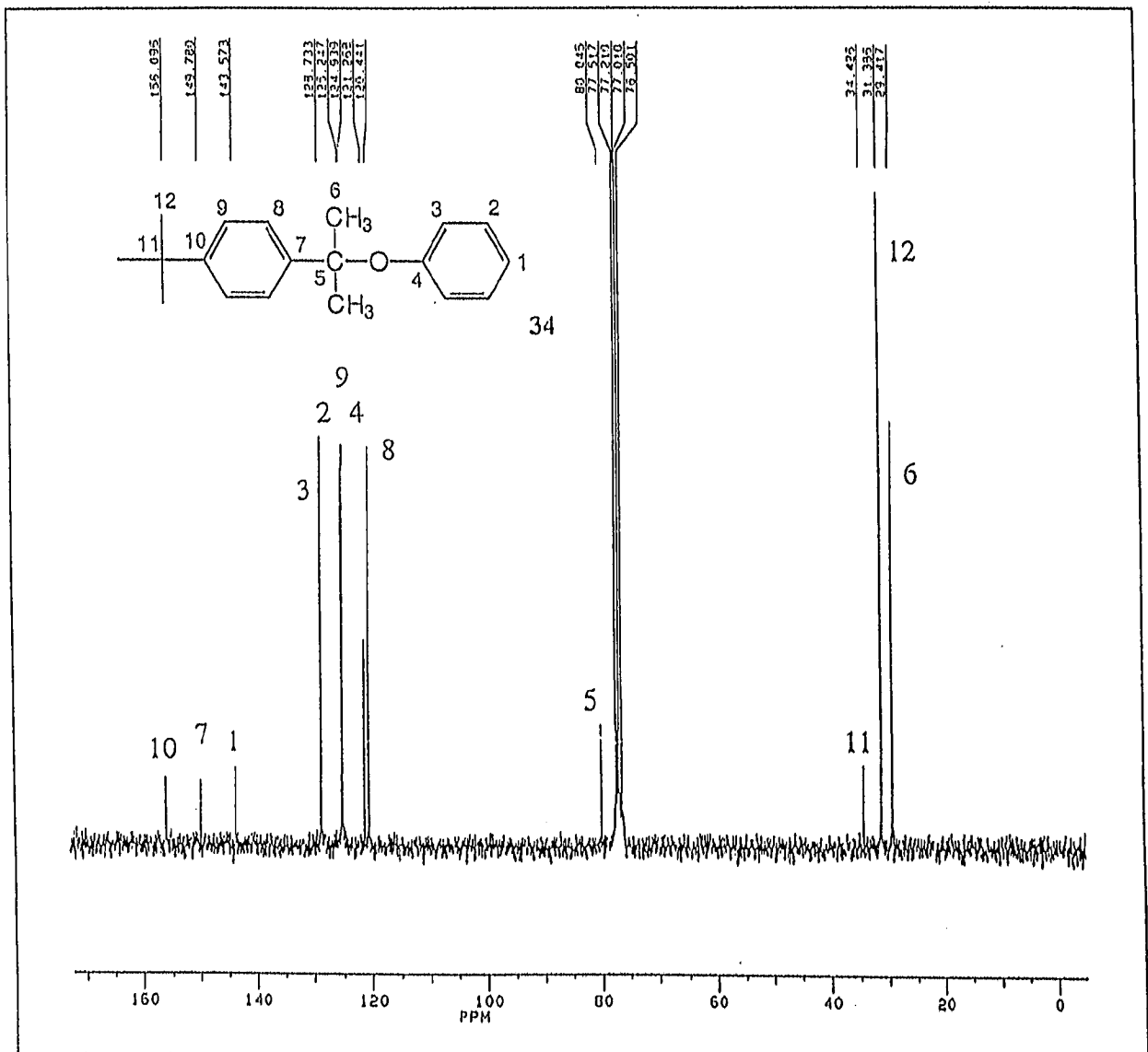


Abb. 32. ^{13}C -NMR-Spektrum von 2-Phenoxy-2-tert-butylphenyl-propan (34) (100 mg in 1 ml CDCl_3 , 62.896 MHz, protonenbreitbandentkoppelt). Interpretation der wichtigsten Signale(δ , ppm) ($\delta = 29.41$ (C-6), 31.38 (C-12), 34.42 (C-11), 80.04 (C-5), 120.44 (C-8), 121.26 (C-4), 124.93 (C-9), 125.24 (C-2), 128.73 (C-3), 143.57 (C-1), 149.78 (C-7), 156.09 (C-10)).

- Es soll noch betont werden, dass der Waschvorgang mit Zitronensäure ebenso wie das Trocknen über Na_2SO_4 , sowie das Entfernen des Lösungsmittels so rasch wie möglich erfolgen sollte. Sofern diese Operationen zu langsam erfolgen, sieht man eine zwar geringe, aber deutlich erkennbare Zersetzung der p-Bumeoc-geschützten Aminosäuren (DC-Platte).

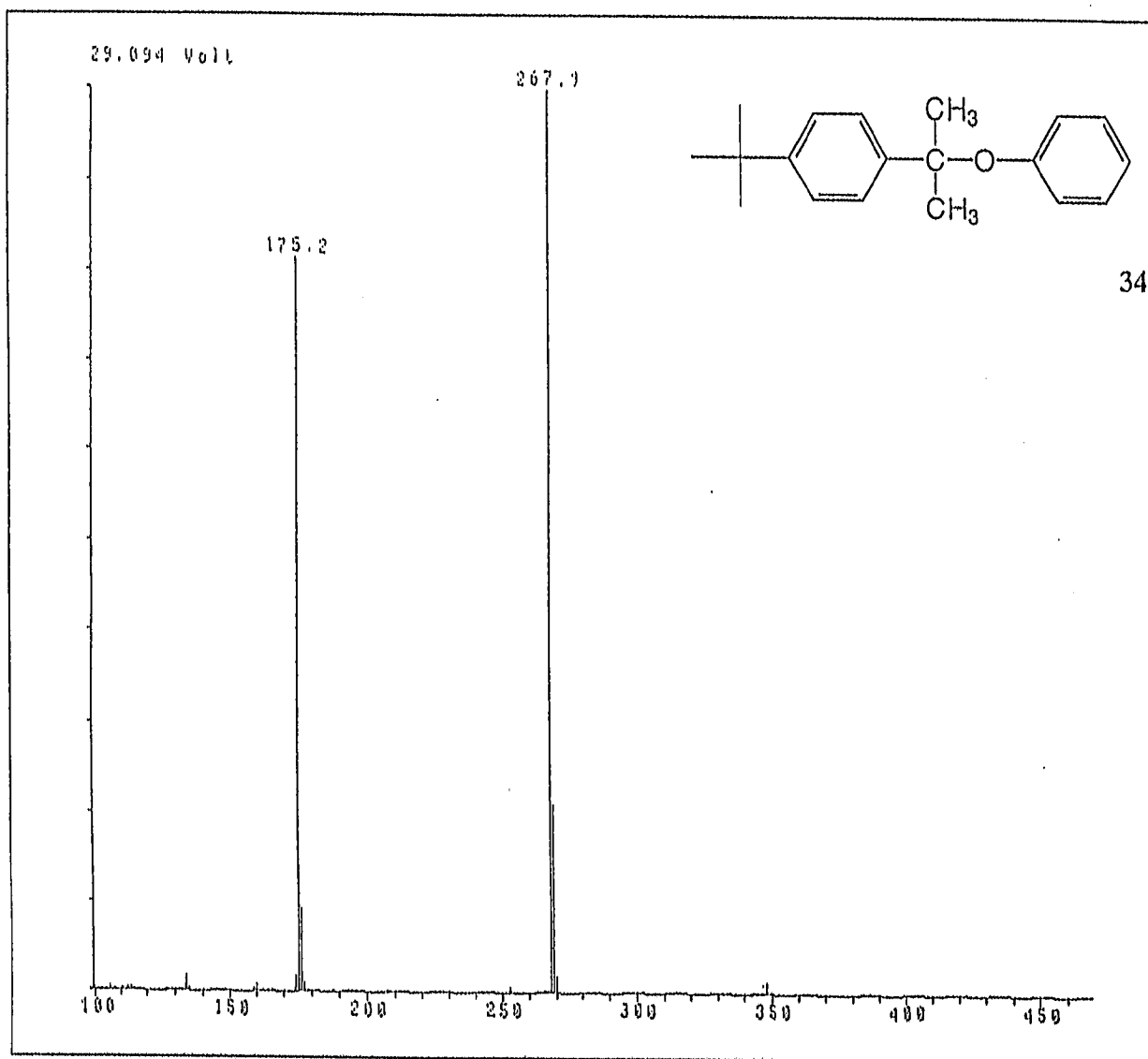


Abb. 33. FD-MS-Spektrum von 2-Phenoxy-2-tert-butylphenylpropan (34) (m/z : 268.9 ($[MH]^+$), 267.9 ($[M]^+$), 175.2 ($[C_4H_9(C_6H_4)C(CH_3)_2]^+$)). Temperatur der Ionenquelle: 33 °C.

- Bei der Umsetzung des p-Bumeoc-Phenylcarbonats (28) mit der Aminosäure Leucin nach beschriebener Methode konnten Einkristalle von p-Bumeoc-Phenylether (34) erhalten werden, der als Nebenprodukt anfällt (Kristallstruktur und Analyse s. Kapitel V.7.). Die geschützten Aminosäuren sind bei normalen Lichtverhältnissen stabil, sie sollten als DCHA-Salze gelagert werden, da sie auch in festem Zustand analog zu den Bpoc-Aminosäuren aufgrund ihrer Eigenacidität zur autokatalytischen Zersetzung neigen. Untersuchungen zeigten, dass die freien Säuren, p-Bumeoc-L-Leu-OH (35), p-Bumeoc-L-Pro-OH (45), p-Bumeoc-L-Gly-OH (44) und p-Bumeoc-L-Ala-OH (43) im kristallinen Zustand bei Raumtemperatur bis zu 36 h stabil sind.

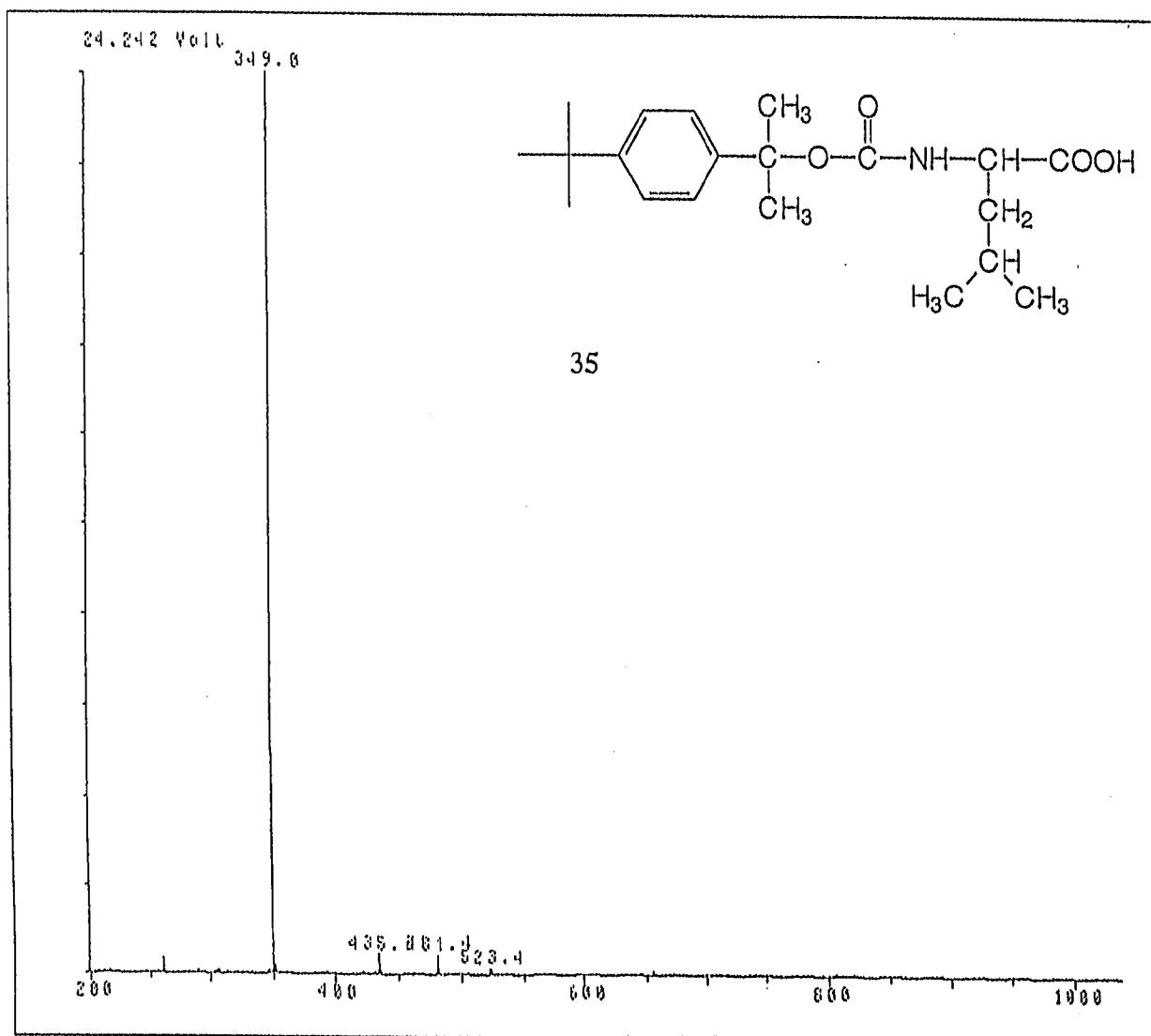


Abb. 34. FD-MS-Spektrum von p-Bumeoc-L-Leu-OH (35) (m/z : 350.0 ($[MH]^+$), 349.0 ($[M]^+$)). Temperatur der Ionenquelle: 35 °C.

– Desweiteren konnte über FD-MS gezeigt werden, dass während der Umsetzung von p-Bumeoc-OH (27) mit dem Chlorameisensäurephenylester (9) (zum p-Bumeoc-phenylcarbonat (28)) das symmetrische Diphenylcarbonat (s. Abb. 29, FD-MS-Peak bei m/z : 214.0) entstehen kann. Es konnte dabei beobachtet werden, dass diese Nebenreaktion hauptsächlich dann auftritt, wenn man den Chlorameisensäurephenylester (9) zu rasch und bei höherer Temperatur (> 35 °C) zugibt. So wurde unerwünschterweise die Verbindung N^α -Phenoxycarbonyl-L-Val-OH·DCHA (41) synthetisiert. Abb. 40 (FD-MS-Spektrum) zeigt den FD-MS-Peak bei m/z : 237, welcher $[N^\alpha\text{-Phenoxycarbonyl-L-Val-OH}]^+$ entspricht; Abb. 41 zeigt das ^{13}C -NMR-Spektrum dieser Verbindung 41.

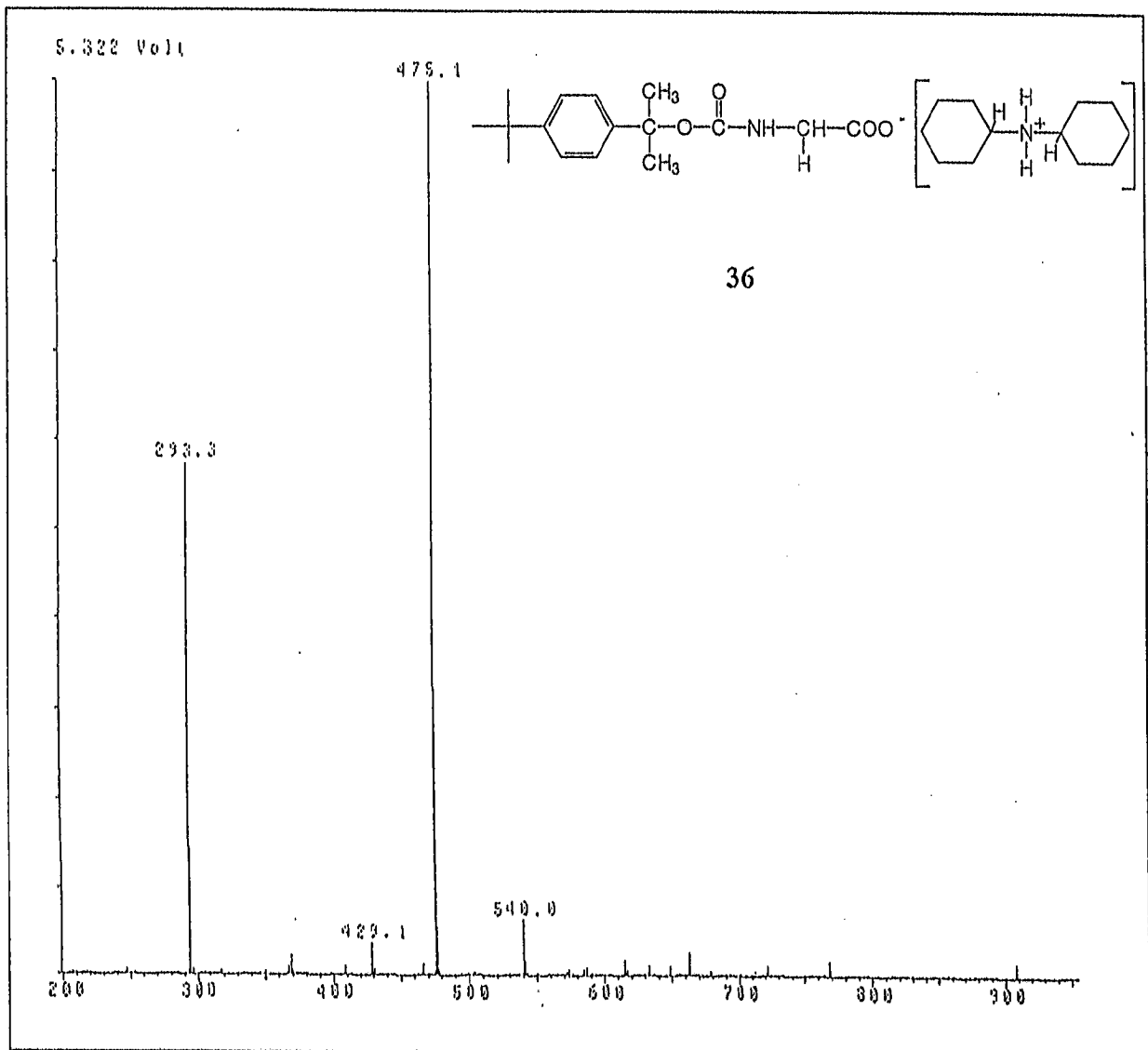


Abb. 35. FD-MS-Spektrum von p-Bumeoc-L-Gly-OH·DCHA (36) (m/z : 476.1 ($[MH]^+$), 475.1 ($[M]^+$), 294.1 ($[p\text{-Bumeoc-L-Gly-OH} + H]^+$), 293.1 ($[p\text{-Bumeoc-L-Gly-OH}]^+$)).

- Die Abspaltung der p-Bumeoc-Gruppe gelingt vollständig innerhalb von Sekunden/Minuten mit 0.25%iger Trifluoressigsäure in Methylenchlorid und anderen organischen Lösungsmitteln.
- Im Peptid vorhandene N^ε-Boc-, tert-Butylester- und tert-Butylethergruppen werden unter diesen Bedingungen nicht gespalten.
- Die bei einer Acidolyse gebildeten Carbokationen führen besonders dann zu unerwünschten Nebenreaktionen, wie z. B. zu Alkylierungen der Aminosäuren Tyrosin, Methionin, Tryptophan oder Cystein, wenn das gebildete Carbokation sehr stabil ist und über eine grosse elektrophile Aktivität verfügt. Es konnte durch die bei der TFA-

IV. SPEZIELLER TEIL

Abspaltung entstehenden Nebenprodukte gezeigt werden, dass das tert-Butylkation (Boc) eine recht hohe, das Benzylkation dagegen eine geringe Carbokationen-Aktivität besitzt¹⁰⁹.

- Die positive Ladung im Carbeniumion ist durch den +I-Effekt stark resonanzstabilisiert, wie von der Hammett-Beziehung abgeleitet werden kann. Der +I-Effekt der para-ständigen tert-Butylgruppe wirkt sich gegenüber den beiden meta-ständigen tert-Butylgruppen der t-Bumeoc-Gruppe noch stärker aus. Die p-Bumeoc-Gruppe ist eine im klassischen Sinne gute Abgangsgruppe.

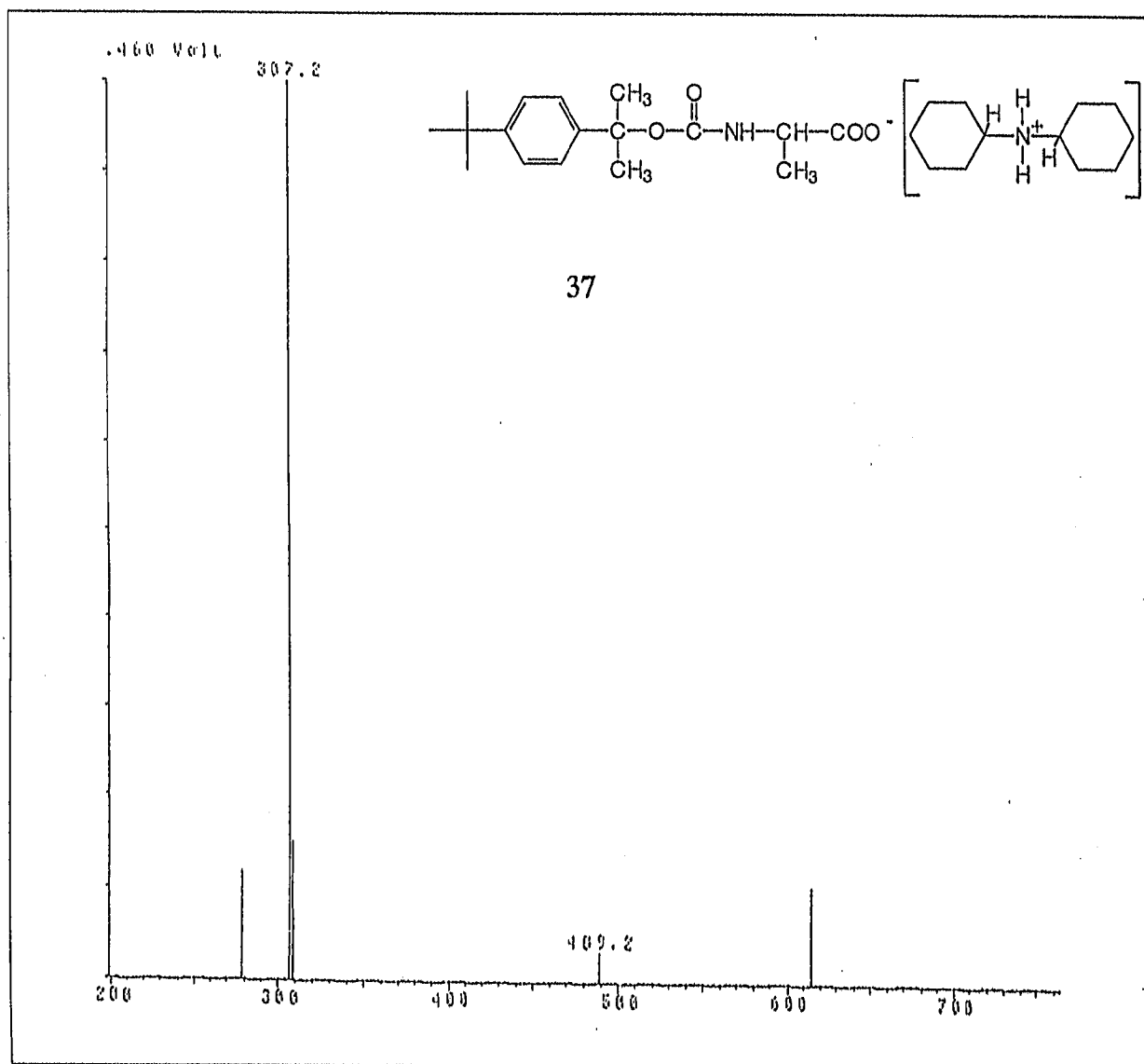


Abb. 36. FD-MS-Spektrum von p-Bumeoc-L-Ala-OH·DCHA (37) (m/z : 614 ([Dimeres von p-Bumeoc-L-Ala-OH]⁺, ohne DCHA), 489.2 ([MH]⁺), 308.2 ([p-Bumeoc-L-Ala-OH + H]⁺), 307.2 ([p-Bumeoc-L-Ala-OH]⁺)).

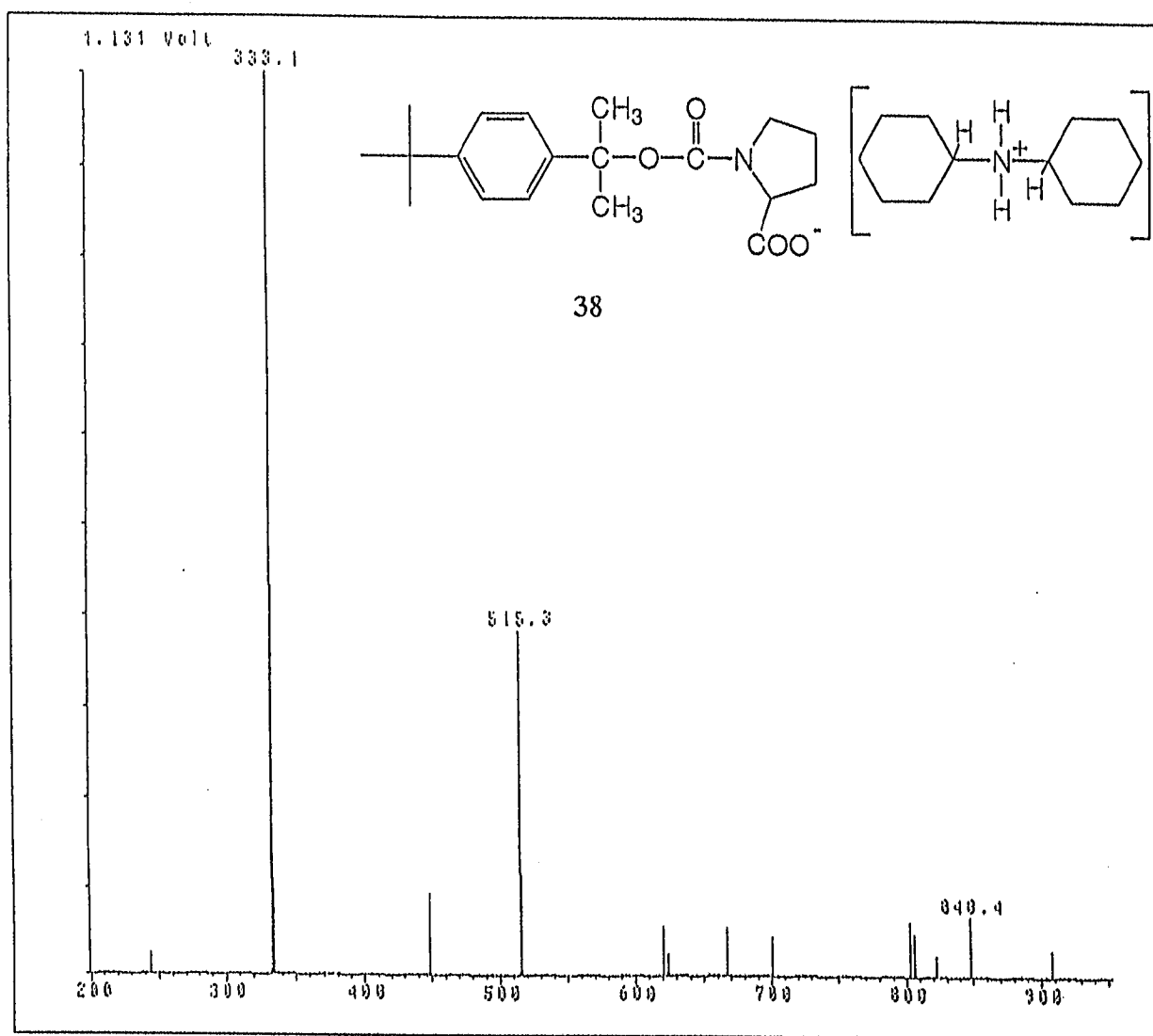


Abb. 37. FD-MS-Spektrum von p-Bumeoc-L-Pro-OH·DCHA (38) (m/z : 516.3 ($[MH]^+$), 515.3 ($[M]^+$), 334.1 ($[p\text{-Bumeoc-L-Pro-OH} + H]^+$), 333.1 ($[p\text{-Bumeoc-L-Pro-OH}]^+$)).

- Eine geringe elektrophile Aktivität ermöglicht die Diffusion des Carbeniumions durch das Reaktionsmedium. Es kann durch einen effektiven „Scavenger“ abgefangen bzw. zum Olefin deaktiviert werden.
- Bei der Acidolyse von p-Bumeoc-geschützten Aminosäuren und Peptiden entsteht je nach Spaltmedium überwiegend p-Bumeoc-Alkohol (in wässrigen Medien) oder die lipophile ungesättigte Verbindung 2-[4-tert-Butylphenyl]-propen-2 (22) in aprotischen Systemen. Das FD-MS-Spektrum von p-Bumeoc-OH (27) zeigt bei m/z : 192 den $[M]^+$ -Peak ($[p\text{-Bumeoc-OH}]^+$) und bei m/z : 175 das Carbokation ($[C_4H_9(C_6H_4)C(CH_3)_2]^+$) (21), nachdem die OH-Gruppe abgespalten ist. Somit zeigt der extrem säurelabile p-Bumeoc-Rest (s. Abb.

IV. SPEZIELLER TEIL

19) im wesentlichen alle Vorteile der strukturverwandten, leicht acidolytisch entfernbaren Schutzgruppen. Aufgrund der Lipophilie des p-Bumeoc-Restes besitzen die Aminosäurederivate extrem lösungsvermittelnde Eigenschaften. Dies ist besonders bei wachsender Peptidkette von Vorteil, da Kupplungen rasch, racemisierungsfrei und in guten Ausbeuten in Methylenchlorid auch unter Zusatz polarer Lösungsmittel, wie Dimethylformamid, durchgeführt werden können. Die am Carboxyende freien p-Bumeoc-Aminosäurederivate kristallisieren besonders gut in Form ihrer (Di-) Cyclohexylamin (DCHA-, CHA-)-Salze aus n-Hexan.

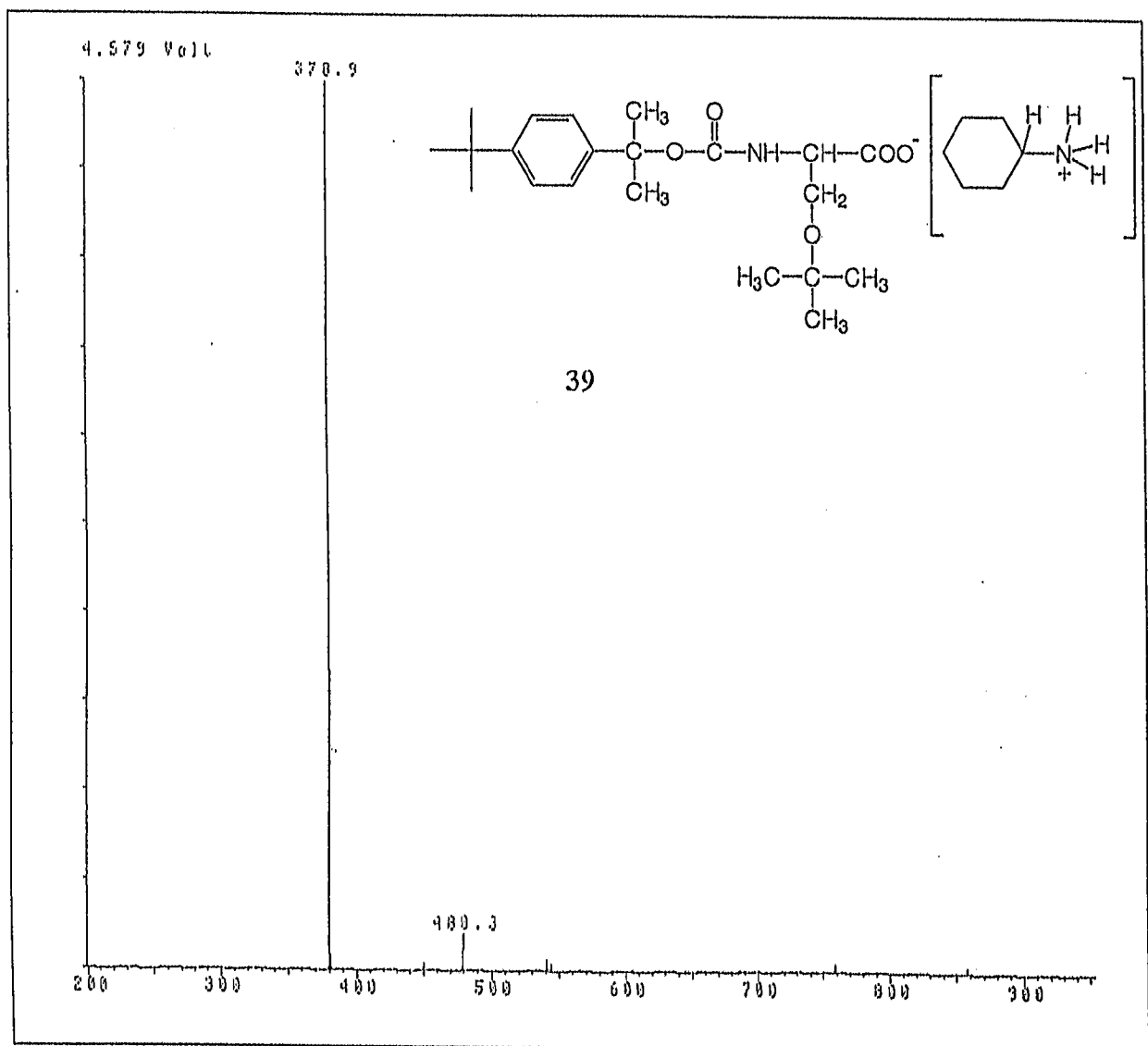


Abb. 38. FD-MS-Spektrum von p-Bumeoc-L-Ser(tBu)-OH·CHA (39) (m/z : 480.3 ($[MH]^+$), 479.3 ($[M]^+$), 379.9 ($[p\text{-Bumeoc-L-Ser(tBu)-OH} + H]^+$), 378.9 ($[p\text{-Bumeoc-L-Ser(tBu)-OH}]^+$)).

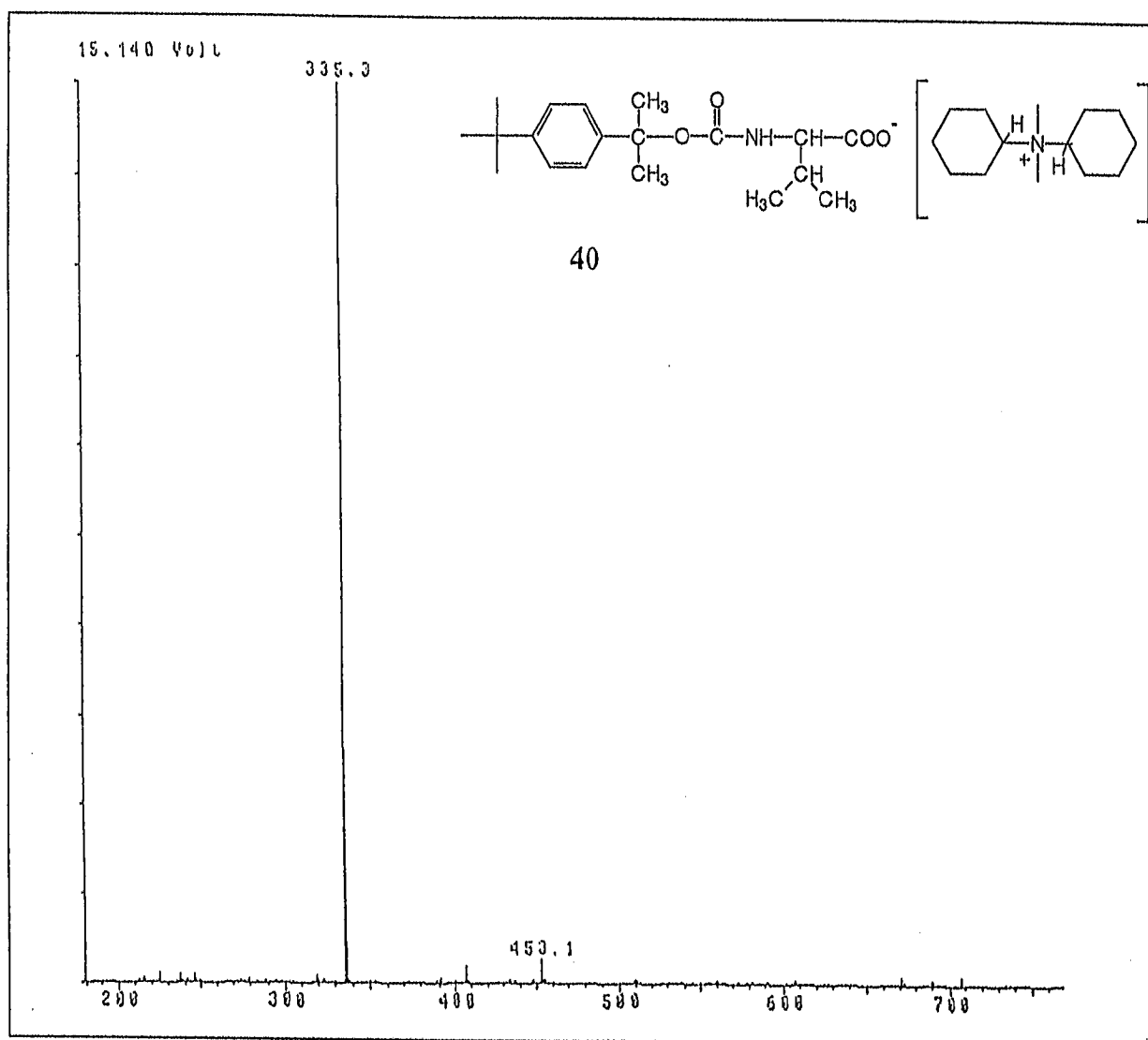


Abb. 39. FD-MS-Spektrum von p-Bumeoc-L-Val-OH·DCHA (40) (m/z : 336.3 ($[p\text{-Bumeoc-L-Val-OH} + \text{H}]^+$), 335.3 ($[p\text{-Bumeoc-L-Val-OH}]^+$)). Der $[\text{MH}]^+$ -Peak bei m/z : 517 wird bei Anlegen von 5.132 Volt beobachtet.

- Die Thermolabilität des p-Bumeoc-Restes schliesst Arbeiten bei erhöhten Temperaturen (ab 35 °C) aus. Andererseits können p-Bumeoc-geschützte Aminosäuren und Peptide dadurch sehr leicht mit Ninhydrin-Reagens bereits unter 110 °C detektiert werden. Das Ansäuern der Natriumsalze p-Bumeoc-geschützter Aminosäuren erfolgt mit stark verdünnten Säuren. Man kann z. B. 1 % Zitronensäure, 0.5 % HCl, oder Phosphorsäure verwenden, sollte aber einen pH-Wert von 3.5 nicht unterschreiten. In dieser Arbeit wurde die Schutzgruppe mit 5%iger Zitronensäure entfernt.

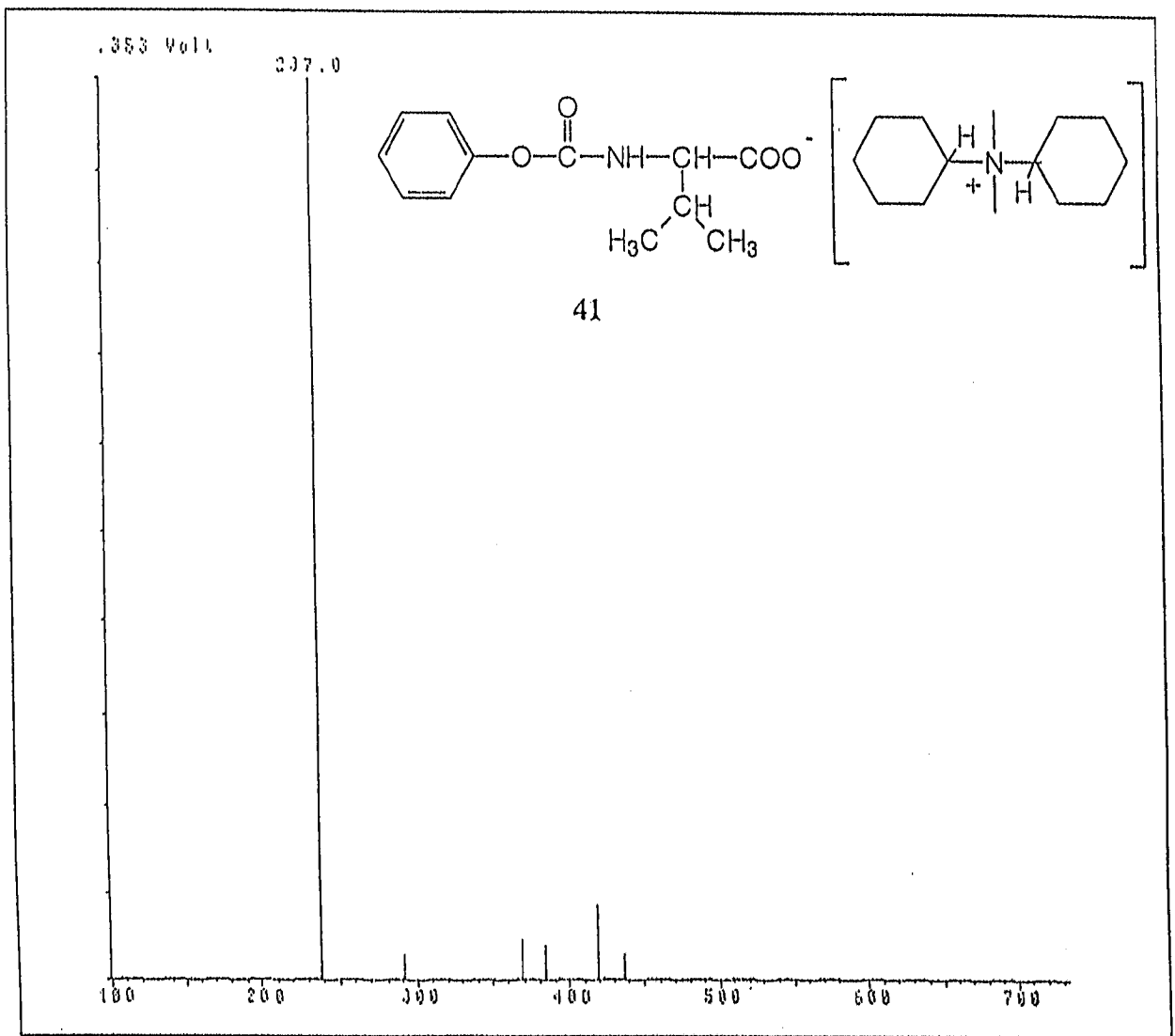


Abb. 40. FD-MS-Spektrum von N^α -Phenoxycarbonyl-L-Val-OH·DCHA (41) (m/z : 419.0 ($[MH]^+$), 238.0 ($[Phenoxycarbonyl-L-Val-OH + H]^+$), 237.0 ($[Phenoxycarbonyl-L-Val-OH]^+$)). Temperatur der Ionenquelle: 30 °C.

Von Verbindung 34 wurden, wie bereits erwähnt, Einkristalle erhalten. 34 wurde mittels FD-MS-Spektrometrie (s. Abb. 33; wie zu erwarten zeigt das Spektrum den $[MH]^+$ - und den $[M]^+$ -Peak, sowie einen Peak bei m/z : 175.2, welcher dem $[C_4H_9(C_6H_4)C(CH_3)_2]^+$ -Fragment entspricht), und durch 1H -NMR- (Abb. 31) bzw. ^{13}C -NMR-Spektrometrie (Abb. 32) nachgewiesen.

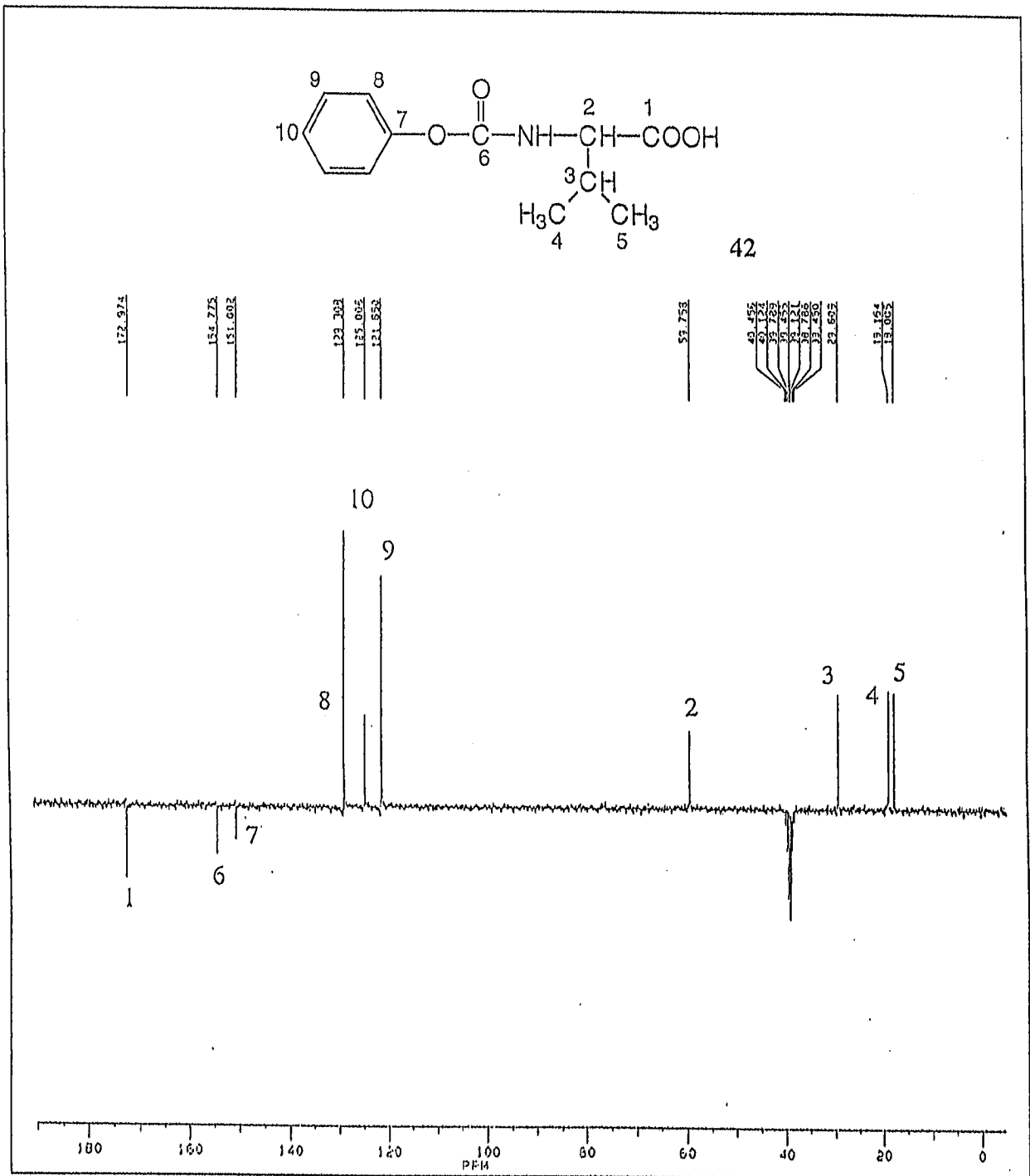


Abb. 41. ^{13}C -NMR-Spektrum von N^α -Phenoxycarbonyl-L-Val-OH (42) (80 mg in 1 ml DMSO, protonenbreitbandentkoppelt, 62.896 MHz). Interpretation der wichtigsten Signale(δ , ppm) ($\delta = 18.00$ (C-5), 19.16 (C-4), 29.60 (C-3), 59.75 (C-2), 121.65 (C-9), 125.00 (C-10), 129.30 (C-8), 151.00 (C-7), 154.77 (C-6), 172.97 (C-1)).

Tabelle 6 gibt eine Übersicht der Syntheseausbeuten und physikalischen Daten von p-Bumeoc-geschützten Aminosäuren.

IV. SPEZIELLER TEIL

Tab. 6. Ausgewählte p-Bumeoc-geschützte Aminosäuren mit Angaben der Syntheseausbeuten und physikalischen Daten.

p-Bumeoc-Derivat von	Ausbeute [%]	Schmp. [°C]	$[\alpha]_D^{23}$	R _{fD}	Summenformel (Molmasse)		C	H	N
Ala-OH•DCHA	43.0	138-139	+8.5	0.48	C ₂₉ H ₄₈ N ₂ O ₄	Ber.	71.27	9.89	5.73
					(488.708)	Gef.	71.31	10.06	7.76
Ala-OH	83.5	87	-3.1	0.54	C ₁₇ H ₂₅ NO ₄	Ber.	66.42	8.19	4.55
					(307.387)	Gef.	66.81	8.45	4.79
Asp(OtBu)-OH•CHA	25.0	159.5	+11.3	0.52	C ₂₈ H ₄₆ N ₂ O ₆	Ber.	66.37	9.15	5.53
					(506.679)	Gef.	65.67	9.23	5.37
Gly-OH•DCHA	49.3	130.5	---	0.46	C ₂₈ H ₄₆ N ₂ O ₄	Ber.	70.85	9.76	5.90
					(474.68)	Gef.	71.65	10.15	5.88
Gly-OH	86.4	98	---	0.53	C ₁₆ H ₂₃ NO ₄	Ber.	65.50	7.90	4.77
					(293.36)	Gef.	66.08	8.16	4.52
Leu-OH	61.0	93	+3.8	0.60	C ₂₀ H ₃₁ NO ₄	Ber.	68.74	8.94	4.00
					(349.467)	Gef.	67.91	9.32	3.72
Leu-OH•DCHA	92.0	149	-9.3	0.50	C ₃₂ H ₅₄ NO ₄	Ber.	72.41	10.25	5.27
					(530.79)	Gef.	72.88	10.68	5.25
Phe-OH•DCHA	43.5	143	+12.9	0.49	C ₃₅ H ₅₂ N ₂ O ₄	Ber.	74.43	9.28	4.96
					(564.807)	Gef.	73.96	8.82	5.33
Phe-OH	79.3	101.5	+9.8	0.54	C ₂₃ H ₂₉ NO ₄	Ber.	72.04	7.62	3.65
					(383.485)	Gef.	71.79	7.22	3.37
Pro-OH•DCHA	43.7	151.5	+10.7	0.49	C ₃₁ H ₅₀ N ₂ O ₄	Ber.	72.33	9.79	5.44
					(514.74)	Gef.	71.38	9.45	5.01
Pro-OH	81.7	71.5	+4.7	0.61	C ₁₉ H ₂₇ NO ₄	Ber.	68.44	8.16	4.20
					(333.425)	Gef.	68.98	8.58	4.64
Ser(tBu)-OH•CHA	28.0	206	+9.8	0.50	C ₂₇ H ₄₆ N ₂ O ₅	Ber.	67.75	9.68	5.85
					(478.669)	Gef.	68.97	10.36	5.93

IV. SPEZIELLER TEIL

p-Bumeoc- Derivat von	Ausbeute [%]	Schmp. [°C]	$[\alpha]^{23}_D$	Rf _D	Summenformel (Molmasse)		C	H	N
Ser(tBu)-OH	79.0	74.5	-13.8	0.61	C ₂₁ H ₃₃ NO ₅ (379.493)	Ber.	66.46	8.76	3.69
						Gef.	66.88	9.07	4.00
Tyr(tBu)- OH•CHA	33.8	155.0	+9.4	0.51	C ₃₃ H ₅₀ N ₂ O ₅ (554.767)	Ber.	71.44	9.07	5.05
						Gef.	71.87	8.73	4.68
Tyr(tBu)-OH	81.7	132	-10.8	0.56	C ₂₇ H ₃₇ NO ₅ (455.591)	Ber.	71.18	8.18	3.07
						Gef.	70.79	7.82	3.43
Val- OH•DCHA	37.8	138.5	-13.7	0.48	C ₂₇ H ₅₂ N ₂ O ₄ (468.717)	Ber.	69.19	11.18	5.97
						Gef.	70.46	10.58	6.34

IV.3.6. ¹³C-NMR-Spektroskopie von p-Bumeoc-Aminosäuren

Die beiden Signale der tert-Butylgruppe im aliphatischen Bereich bei ca. 31 ppm (CH₃) bzw. ca. 34 ppm (Cq) sind charakteristisch für die Spektren aller p-Bumeoc-Aminosäuren. Die Resonanzen der α,α-Dimethylgruppe bei ca. 29 ppm erscheinen im Bereich den der Methylresonanzen der Boc-Gruppe). Das quartäre C-Atom ist erwartungsgemäss gegenüber dem Boc-Rest¹¹⁰ minimal zu tieferem Feld verschoben, und liegt zwischen 79.68 und 80.76 ppm (s. Tab. 7).

Die Abb. 42-46 zeigen die aufgenommenen ¹³C-NMR-Spektren der Verbindungen **35** und **43-46**. Es ist zu sehen, dass das Signal von C-Atom-1 (-COOH) bei den meisten Verbindungen bei ca. 174 ppm erscheint. Das entsprechende Signal von Verbindung **44** erscheint am wenigsten tieffeldverschoben bei δ = 171.73 ppm, gefolgt von Verbindung **46** mit δ = 172.04 ppm. Das (-COOH)-Signal der Verbindung **43** mit δ = 174.58 ppm ist zu tieferem Feld verschoben, als es für das entsprechende Signal der Verbindung **46** der Fall ist.

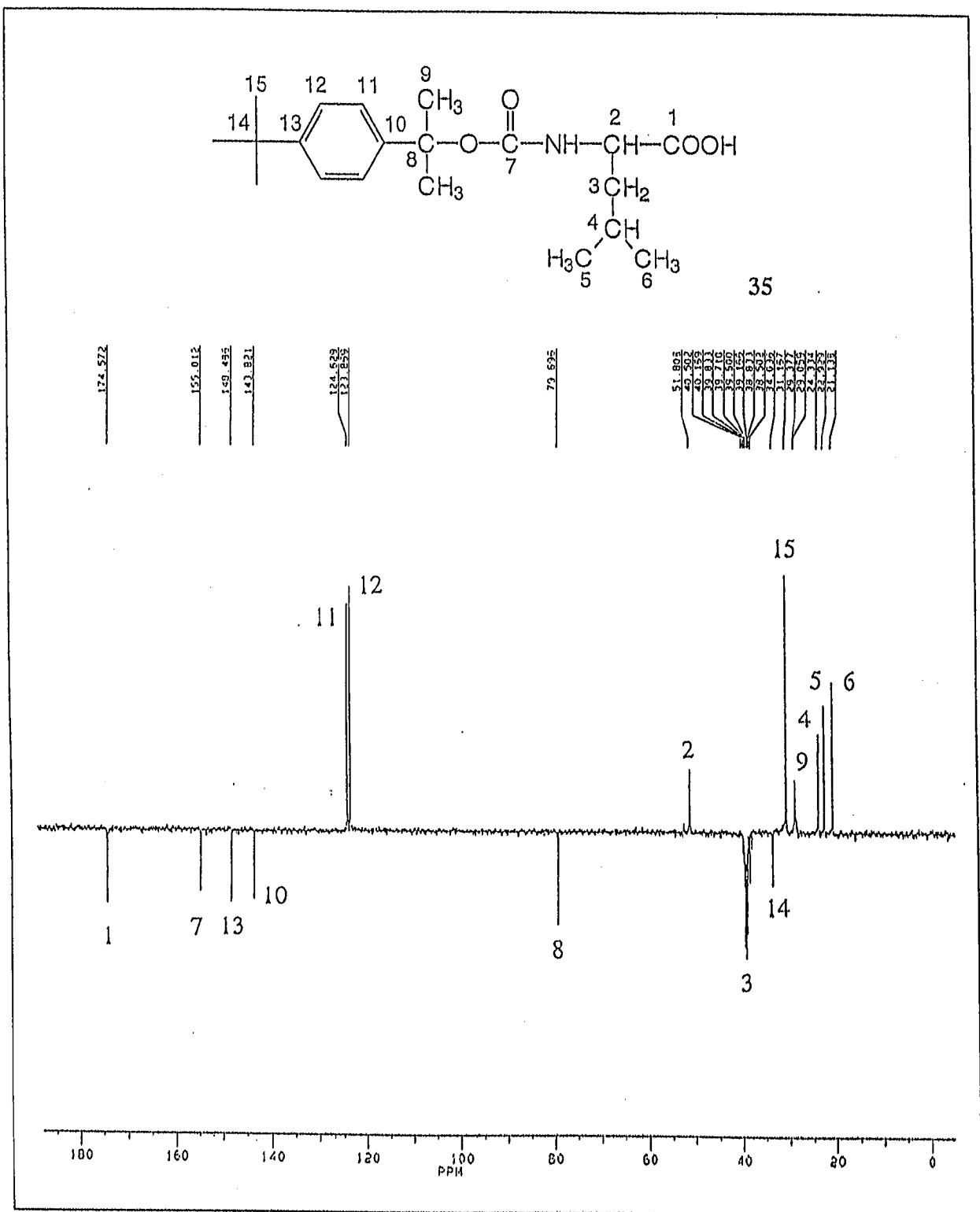


Abb. 42. ^{13}C -NMR-Spektrum von p-Bromo-L-Leu-OH (35) (80 mg in 1 ml DMSO; protonenbreitbandentkoppelt, 62.896 MHz). Interpretation der wichtigsten Signale(δ , ppm) (δ = 21.13 (C-6), 22.92 (C-5), 24.33 (C-4), 29.37 (C-9), 31.16 (C-15), 34.03 (C-14), 39.16 (C-3), 51.80 (C-2), 79.69 (C-8), 123.86 (C-12), 124.62 (C-11), 143.82 (C-10), 148.48 (C-13), 155.01 (C-7), 174.57 (C-1)).

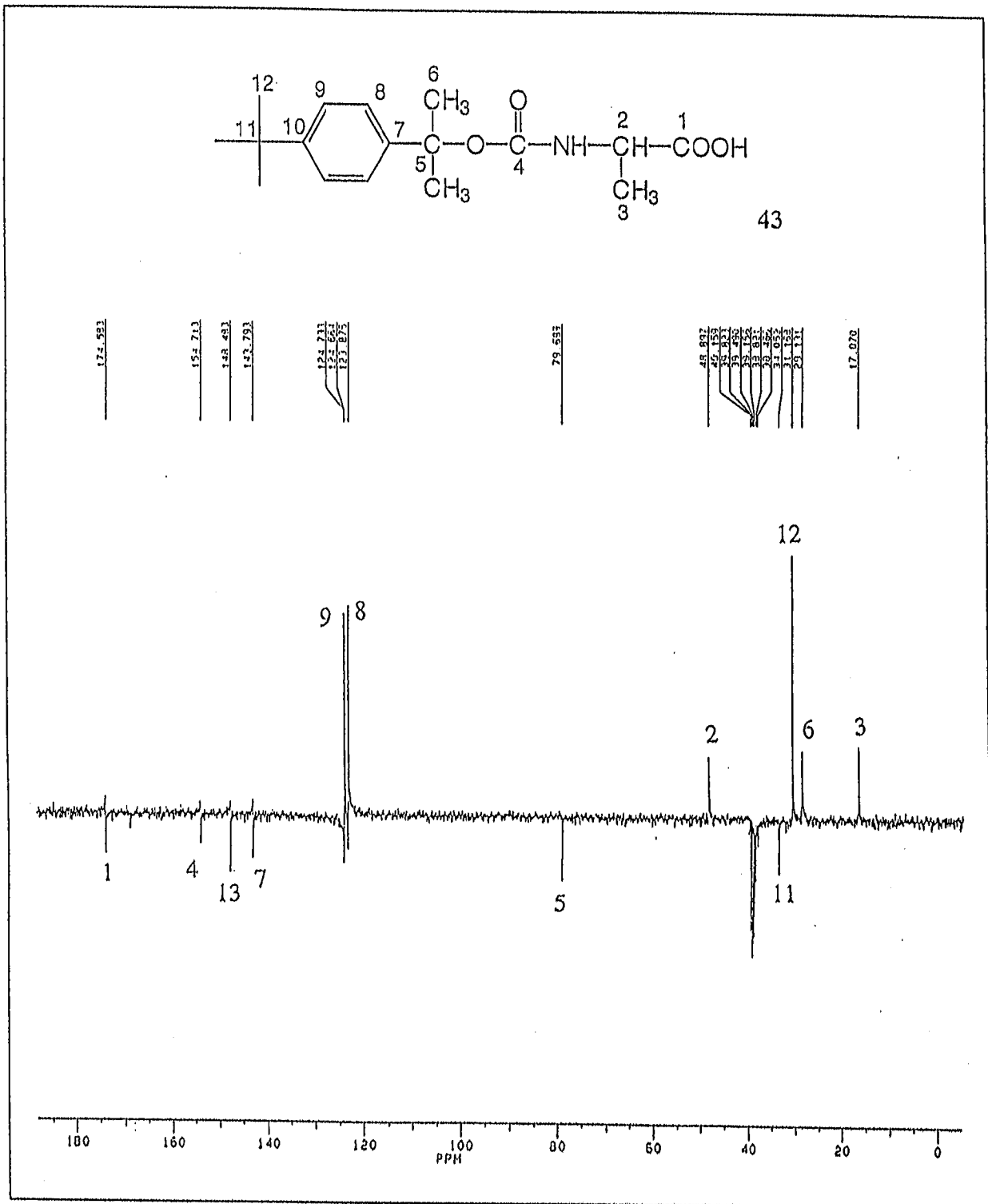


Abb. 43. ^{13}C -NMR-Spektrum von p-Bumeoc-L-Ala-OH (43) (50 mg in 1 ml DMSO, protonenbreitbandentkoppelt, 62.896 MHz). Interpretation der wichtigsten Signale(δ , ppm) ($\delta = 17.07$ (C-3), 29.13 (C-6), 31.16 (C-12), 34.05 (C-11), 48.89 (C-2), 79.68 (C-5), 123.87 (C-9), 124.66 (C-8), 143.79 (C-7), 148.48 (C-10), 154.71 (C-4), 174.58 (C-1)).

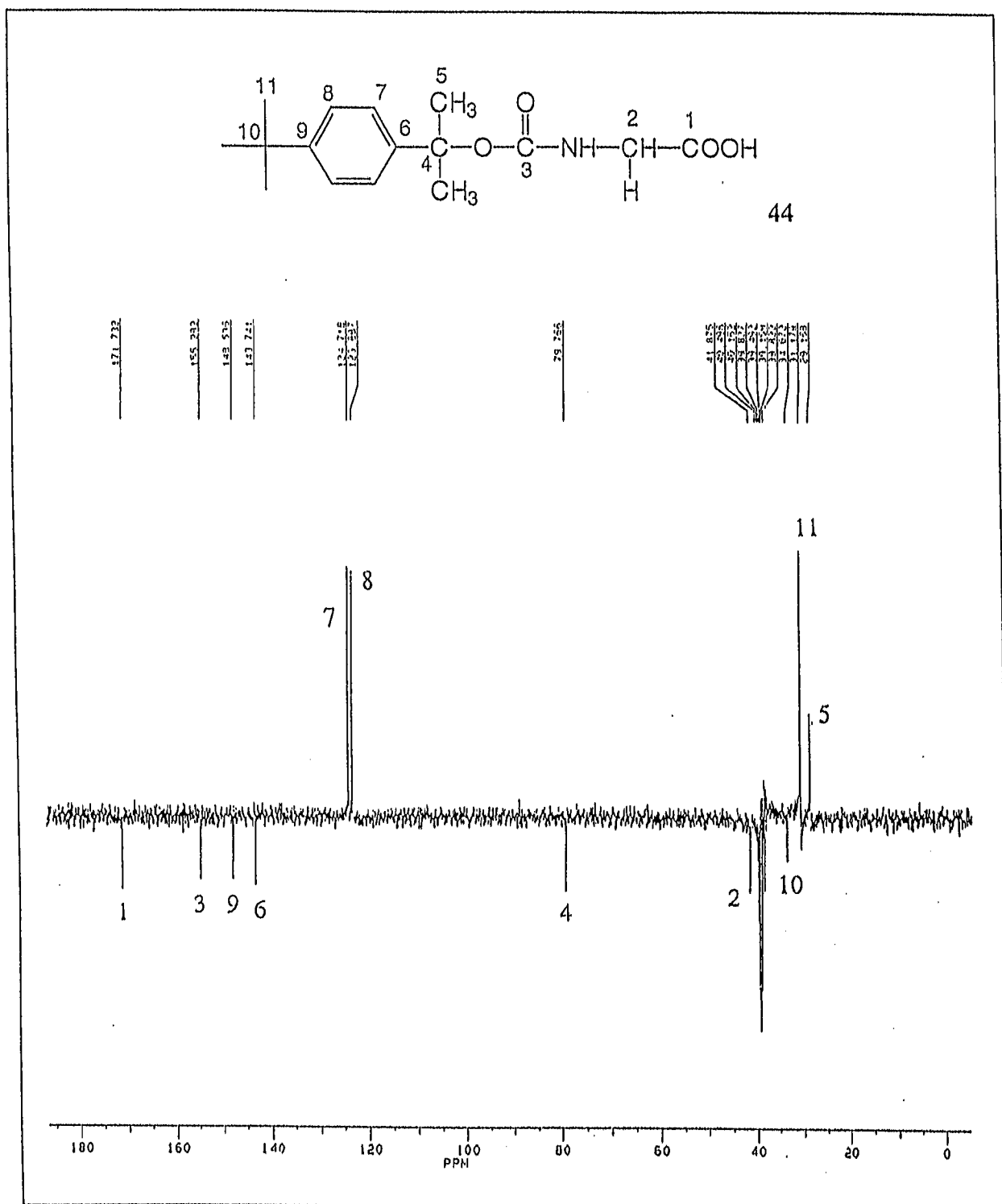


Abb. 44. ^{13}C -NMR-Spektrum von p-Bumeoc-L-Gly-OH (44) (40 mg in 1 ml DMSO, protonen-breitbandentkoppelt, 62.896 MHz). Interpretation der wichtigsten Signale(δ , ppm) (δ = 29.16 (C-5), 31.17 (C-11), 34.07 (C-10), 41.87 (C-2), 79.76 (C-4), 123.88 (C-8), 124.71 (C-7), 143.74 (C-6), 148.53 (C-9), 155.28 (C-3), 171.73 (C-1)).

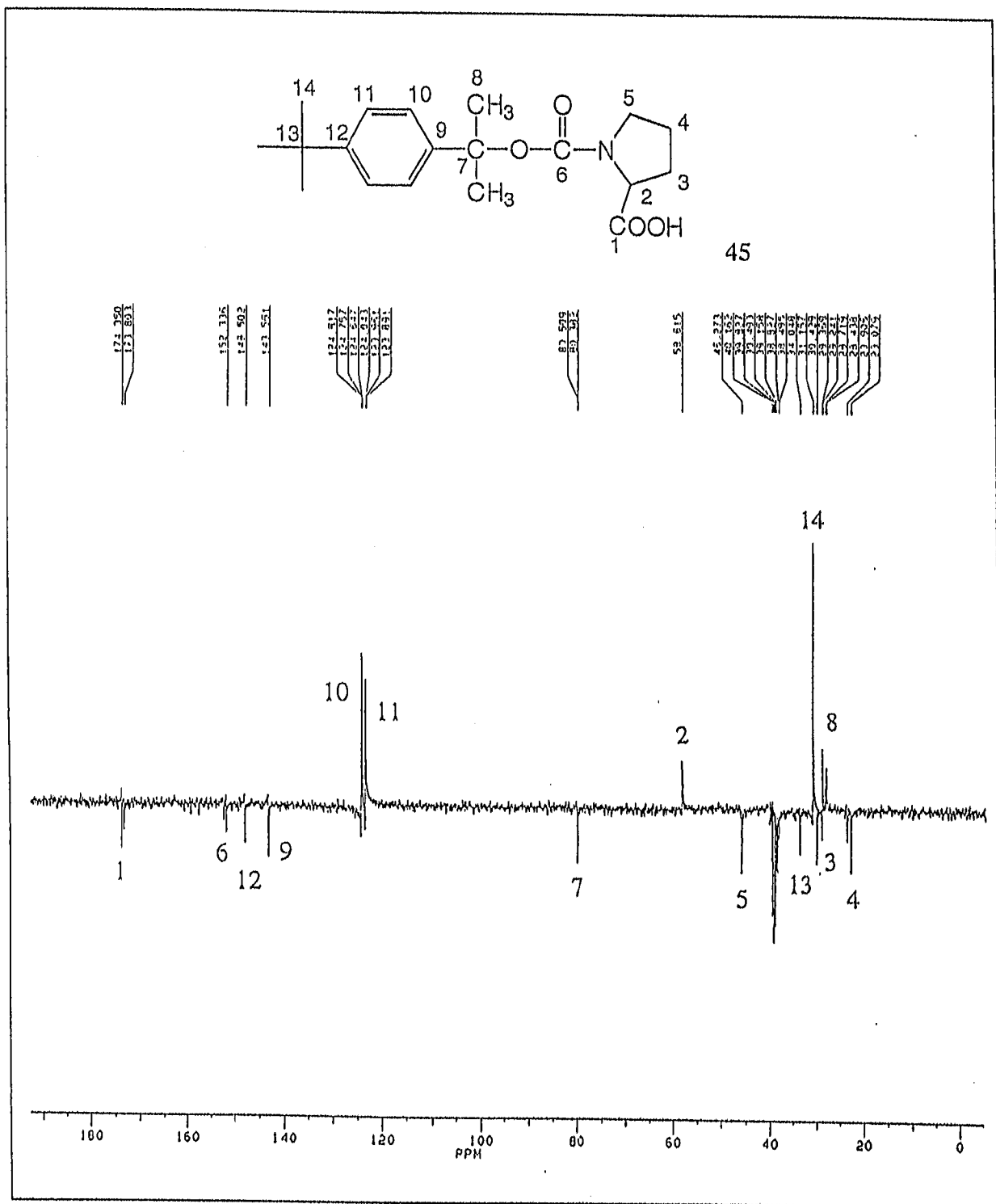


Abb. 45. ¹³C-NMR-Spektrum von p-Bumeoc-L-Pro-OH (45) (50 mg in 1 ml DMSO, protonenbreitbandentkoppelt; 62.896 MHz). Interpretation der wichtigsten Signale(δ, ppm) (δ = 23.07 (C-4), 29.36 (C-8), 30.42 (C-3), 31.15 (C-14), 34.04 (C-13), 46.27 (C-5), 58.61 (C-2), 80.38 (C-7), 124.04 (C-11), 124.64 (C-10), 143.56 (C-9), 148.50 (C-12), 152.33 (C-6), 174.35 (C-1)).

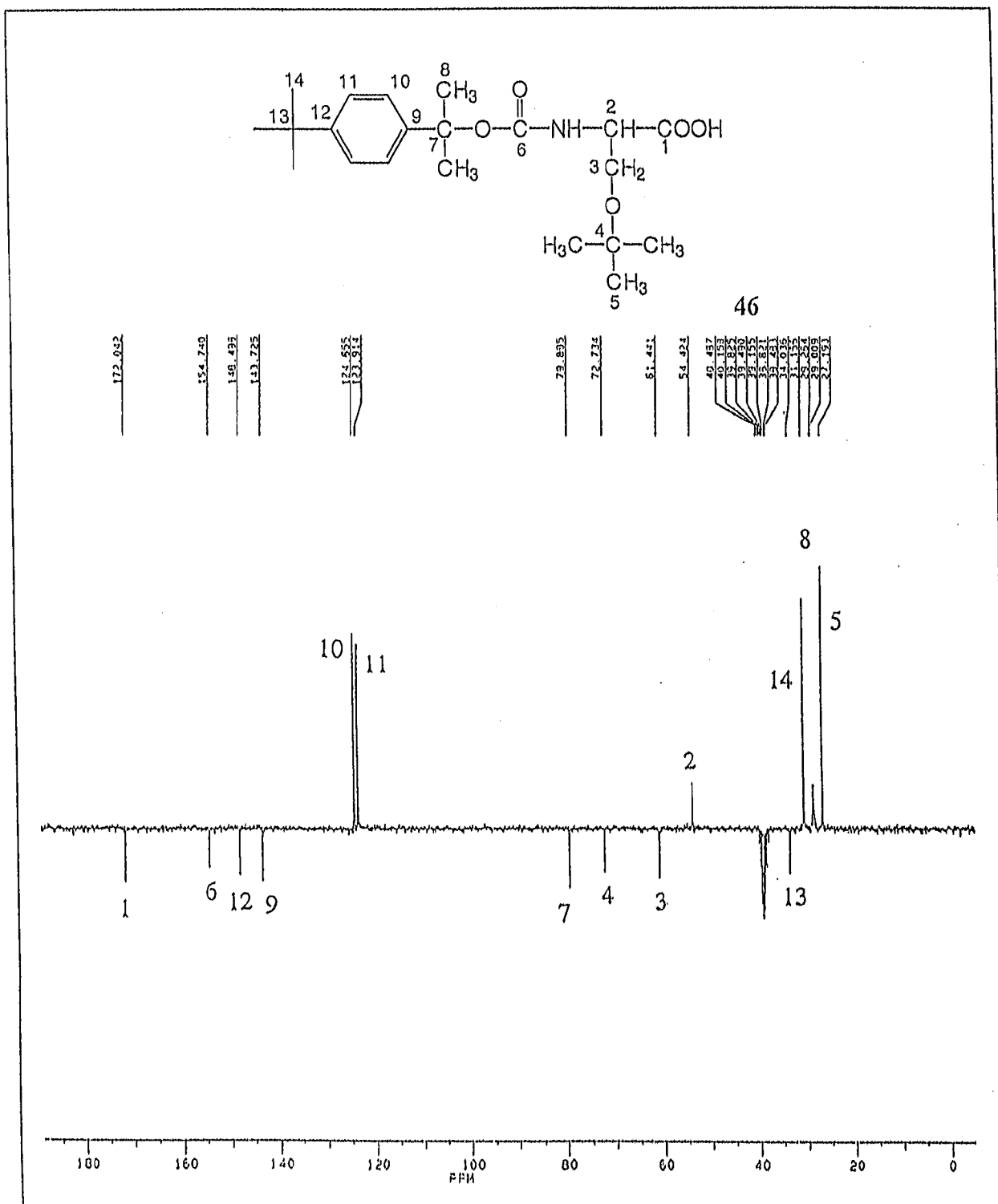
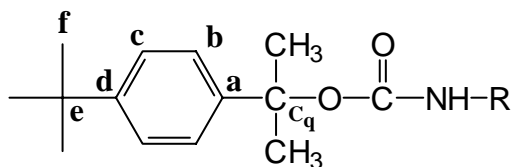


Abb. 46. ^{13}C -NMR-Spektrum von p-Bumeoc-L-Ser(tBu)-OH (46) (100 mg in 1 ml DMSO, protonenbreitbandentkoppelt, 62.896 MHz). Interpretation der wichtigsten Signale(δ , ppm) (δ = 27.19 (C-5), 29.26 (C-8), 31.15 (C-14), 34.03 (C-13), 54.42 (C-2), 61.44 (C-3), 72.73 (C-4), 79.88 (C-7), 123.91 (C-11), 124.65 (C-10), 143.72 (C-9), 148.49 (C-12), 154.74 (C-6), 172.04 (C-1)).

IV. SPEZIELLER TEIL

Tab. 7. ^{13}C -NMR-Daten einiger p-Bumeoc-geschützter Aminosäuren.



p-Bumeoc-Derivat von	CO ₂ H	C α	C β	C γ	C δ	C=O	C q	CH ₃	a	b	c	d	e	f
Ala-OH	174.58	48.89	17.07			154.71	79.68	29.13	143.79	124.66	123.87	148.48	34.05	31.16
Gly-OH	171.73	41.87				155.28	79.76	29.16	143.74	124.71	123.88	148.53	34.07	31.17
Leu-OH	174.57	51.80	39.16	24.33	21.13	155.01	79.69	29.37	143.82	124.62	123.86	148.48	34.03	31.16
					22.92									
Phe-OH	174.11	51.34	35.27			154.65	79.98	28.87	143.83	124.89	124.00	148.67	34.76	31.89
		(aromat: 136.87, 127.55, 130.34, 130.87)												
Pro-OH	174.35	58.61	30.42	23.07	46.27	152.33	80.38	29.24	143.56	124.64	124.04	148.50	34.04	31.15
Ser(tBu)-OH	172.04	54.42	61.44			154.74	79.88	29.26	143.72	124.65	123.91	148.49	34.03	31.15
		(tBu: 72.73, 27.19)												
Tyr(tBu)-OH	174.87	53.44	36.98			155.23	80.76	29.67	144.02	124.31	123.87	147.98	34.53	31.54
		(aromat: 147.87, 130.34, 136.77, 129.32)												
		(tBu: 81.56, 29.78)												

IV.3.7. Bestimmung der Abspaltungsgeschwindigkeit der p-Bumeoc-Gruppe

Die p-Bumeoc-Gruppe kann sehr leicht abgespalten werden unter folgenden Bedingungen:

- 0.25 % TFA in CH₂Cl₂,
- 80%iger Essigsäure,
- Gemisch aus Essigsäure/ 83-Gew. % Ameisensäure/H₂O (7:1:2, v/v) ab.

IV. SPEZIELLER TEIL

Mit b) und c) wurden bei 23 °C die Abspaltungsreaktionen am Beispiel von p-Bumeoc-Glycin (**44**) und p-Bumeoc-Phenylalanin (**43**) durchgeführt. Für die Abspaltung der t-Bumeoc-Gruppe verwendete man das Phenylalaninderivat - bei der Adpoc-Gruppe das Tryptophanderivat. Es wurde dann nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Bestimmung der Abspaltungskinetik vorgegangen. Die Detektion wurde mittels HPLC durchgeführt (s. exp. Teil, Kap. V.7.1.7.).

Tab. 8. Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten säurelabiler Schutzgruppen in den Abspaltungsmedien b) und c).

Schutzgruppe	k_1 [h^{-1}] b)	k_{rel}	k_1 [h^{-1}] c)	k_{rel}
Boc	$5.0 \cdot 10^{-4}$	1	$2.0 \cdot 10^{-3}$	1
Ppoc	0.35	700	1.5	750
Adpoc	1.2 (40 °C)	2400	1.2	600
Bpoc	1.4	2800	3.9	2000
t-Bumeoc	2.0	4000	16.0	8000
p-Bumeoc	4.3	8600	34.5	17250

b) 80 % ige Essigsäure,

c) Essigsäure/83 Gew.-% Ameisensäure/Wasser (7:1:2, v/v).

Aus Tab. 8 geht hervor, dass die Abspaltungsgeschwindigkeit von p-Bumeoc gegenüber Adpoc im Abspaltungsmedium b) ungefähr vier mal so gross, während sie im Abspaltungsmedium c) ungefähr 28 mal so gross ist. Daraus geht hervor, dass ausser der Dissoziationskonstanten der Säure auch das Reaktionsmedium eine wichtige Rolle spielt.

IV.3.8. Einfluss der Säurenatur- und Konzentration auf die Spaltgeschwindigkeit

Die Freisetzung p-Bumeoc-geschützter Aminosäuren und Peptide gelingt mit organischen Carbonsäuren in organischen Lösungsmitteln (s. Tab. 8). In der Praxis, besonders in der Festphasensynthese, haben sich Trifluoressigsäure und deren Mischungen mit organischen Lösungsmitteln bewährt. So überführt Trifluoressigsäure (Hammett-Aciditäts-Funktion^{111, 112} von $H_0 = -3.1$) die schwach basische C=O-Funktion der Peptidbindung ($pK_{BH^+} = -2.80$) in die konjugierte Säure. Für die Bildung des durch Protonierung entstehenden Carbeniumions sind dessen Struktur und die eingesetzte Säurekonzentration verantwortlich. Durch die Natur der Säure und des Lösungsmittels werden die Stabilisierung und Desaktivierung des

intermediären Kations zudem beeinflusst. In den verschiedenen Lösungsmitteln variiert der Grad des heterolytischen Bindungsbruchs und ist mit dem unterschiedlichen Solvolysievermögen^{113, 114} zu erklären. Folglich ist die Geschwindigkeitskonstante einer monomolekularen Reaktion lösungsmittelabhängig, vorausgesetzt, dass das Lösungsmittel selbst keinen Einfluss auf die absoluten σ -Konstanten der Substituenten im aromatischen Carbeniumion der Abgangsgruppe hat.

Riniker et al.¹¹⁵ beschrieben in Arbeiten zu Untersuchungen zur selektiven Abspaltung säurelabiler Aminoschutzgruppen den auffallenden Einfluss von Trifluorethanol auf die Geschwindigkeit der Entacylierung. Einerseits wenig nukleophil, andererseits von hoher Ionisierungskraft vermag dieses Lösungsmittel die nach dem AA11-Mechanismus intermediär gebildeten Carbeniumionen besonders gut zu solvatisieren und somit zu stabilisieren. Dieser Effekt lässt sich zur selektiven Deblockierung der Trityl-Gruppe in Gegenwart von Bpoc- und Ppoc-Gruppen nutzen.

IV.3.9. Synthese der p-Bumeoc-Aminosäure-N-Hydroxysuccinimidester

Nach allgemeiner Vorschrift¹¹⁶ werden die Hydroxysuccinimidester der p-Bumeoc-geschützten Aminosäurederivate der Aminosäuren, Glycin, Leucin und Alanin, synthetisiert. Dünnschichtchromatographisch kann gezeigt werden, dass eine rasche Umsetzung stattfindet. Bei der Aufarbeitung zersetzen sich die Produkte fast vollständig. Vom p-Bumeoc-Leucin-N-Hydroxysuccinimidester (**47**) konnten einige Kristalle erhalten werden, so dass mittels FD-MS (s. Abb. 47) und Elementaranalyse (s. exp. Teil) der Beweis für die Entstehung dieses Präparates erbracht werden konnte.

IV.3.10. Festphasensynthese von Leucin-Enkephalinamid (48) unter Verwendung der säurelabilen p-Bumeoc-N^α-Aminoschutzgruppe und des säurelabilen N-(Fluorenyl-9-methyl-oxycarbonyl)-[4-methoxy-4'-(γ -carboxypropyloxy)]-benzhydrylamin-Ankers

Durch die Synthese von Leucin-Enkephalin kann gezeigt werden, dass die neue p-Bumeoc-N^α-Schutzgruppe zur Peptidsynthese eingesetzt werden kann. In diesem Pentapeptid ist Tyrosin die einzige trifunktionelle Aminosäure und wird als Tyr(tBu)-OH eingesetzt. Die p-Bumeoc-Schutzgruppe dient als temporärer Schutz der N^α-Aminofunktion.

IV.3.10.1. Synthesestrategie und Kupplungsreagenzien

Die p-Bumeoc-geschützten Aminosäuren werden schrittweise zum Peptid mittels N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol (DCCI/HOBt) gekuppelt. Als polymerer

IV. SPEZIELLER TEIL

Träger dient das 4-Methoxy-4'-(γ -carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Harz (D-1600). Das Pentapeptid wird damit in Form seines Amids erhalten. In einem gemeinsamen Schritt wird die acidolytisch entfernbare tert-Butylgruppe des Tyrosins und das Peptid in Form seines Amids mit 95 % TFA abgespalten.

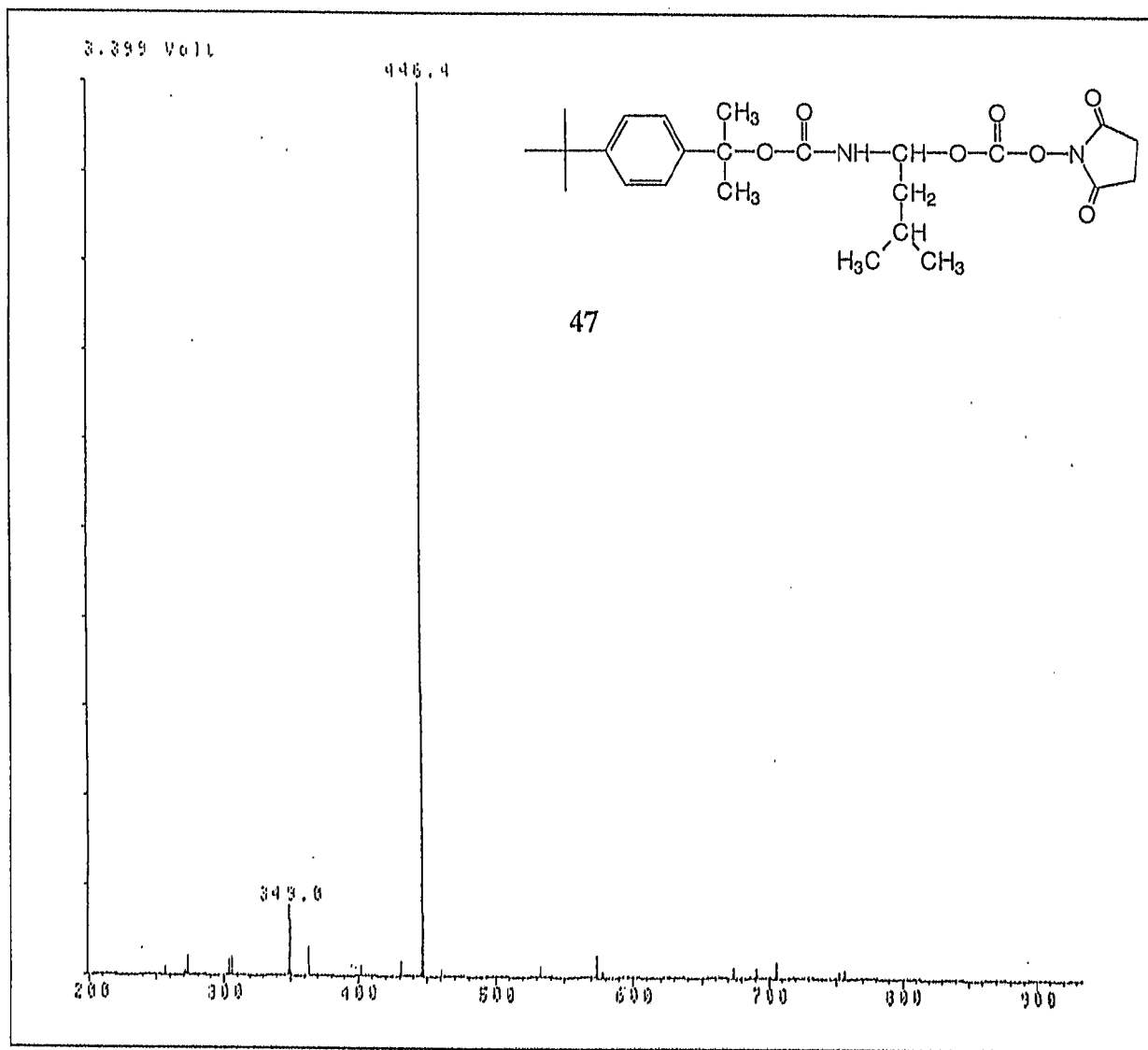


Abb. 47. FD-MS-Spektrum von p-Bumeoc-Leu-OSu (47) (m/z : 447.4 ($[MH]^+$), 446.4 ($[M]^+$), 350.0 ($[p\text{-Bumeoc-L-Leu-OH} + H]^+$), 349.0 ($[p\text{-Bumeoc-L-Leu-OH}]^+$)). Temperatur der Ionenquelle: 30 °C.

IV.3.10.2. Festphasensynthese mit p-Bumeoc-geschützten Aminosäuren

Die p-Bumeoc-geschützten Aminosäurederivate werden, nachdem zuvor die Fmoc-Gruppe mit 20 % Piperidin/DMF vom Harz (D-1600) abgespalten wurde, in dreifachem Überschuss

IV. SPEZIELLER TEIL

(1.5 mmol), und unter Verwendung von DCCI/HOBt in Dichlormethan an die Matrix gekuppelt. Nach Kupplung der ersten Aminosäure, p-Bumeoc-(L-Leucin-OH) (**35**), werden die restlichen freien Aminogruppen durch Acylierung mit Acetanhydrid/Pyridin innerhalb 30 Minuten blockiert, um unerwünschte Nebenprodukte zu vermeiden. Nach beendeter Reaktion wird je dreimal mit Methylenchlorid, Dimethylacetamid, Isopropanol und Methylenchlorid gewaschen. Anschliessend wird die p-Bumeoc-Schutzgruppe mit 0.25 % TFA/CH₂Cl₂ abgespalten. Anschliessend wird zweimal mit 10 % Diisopropylethylamin/Methylenchlorid neutralisiert. Die weiteren Syntheseschritte sind im experimentellen Teil dieser Arbeit beschrieben. Die vollständige Umsetzung pro Kupplungsschritt wird mit Bromphenolblau (Säure-Base-Indikator)⁵⁶ geprüft, indem man eine 1%ige Lösung dieses Indikators in Dimethylacetamid während jeder Kupplung zugibt. Die tiefblauen Harzpartikel ändern während dieser Reaktion ihre Farbe von blau über grün nach gelb, was die vollständige Kupplung anzeigt. Bei den p-Bumeoc-Aminosäuren beträgt die Kupplungsdauer 100 Minuten.

IV.3.10.3. Eigenschaften der p-Bumeoc-Schutzgruppe in der Festphasensynthese

Zunächst wird überprüft, ob sich die p-Bumeoc-Schutzgruppe von den trägergebundenen Aminosäurederivaten genauso leicht abspalten lässt, wie von den nicht fixierten Aminosäurederivaten. Dazu wird die C-terminale Aminosäure L-Leucin-OH in Form des p-Bumeoc-Derivates an das Harz gekuppelt. Danach behandelt man das Harz mit TFA/CH₂Cl₂-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen. Die Detektion der p-Bumeoc-Spaltprodukte erfolgt wie bereits erwähnt, mittels HPLC. Zum Vergleich wird die Abspaltung zusätzlich noch dünnschichtchromatographisch (starke UV-Aktivität) durchgeführt (s. exp. Teil, Kap. V.7.1.7.). Dabei wird festgestellt, dass die Ergebnisse der beiden Methoden vergleichbar sind. Die Schutzgruppe wird vom trägergebundenen Aminosäurederivat bei einer Säurekonzentration von 0.25 % TFA/CH₂Cl₂ innerhalb von 5 Minuten, bei einer Konzentration von 0.1 % TFA/CH₂Cl₂ innerhalb von 9 Minuten abgespalten (die Angaben beziehen sich auf die Messungen mittels HPLC). Unter den schonenden p-Bumeoc-Spaltbedingungen ist das Trägermaterial vollkommen stabil.

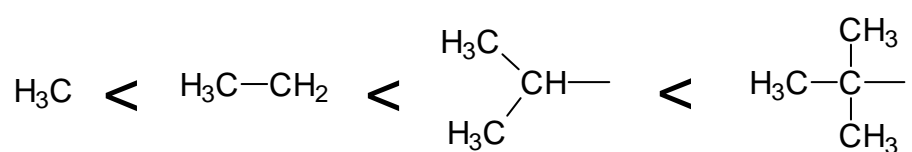
IV.3.10.4. Abspaltung des Leucin-Enkephalinamid (48) vom Träger(Harz)

Die Abspaltung des Pentapeptids nach beendeter Synthese, sowie die gleichzeitige Entfernung der tert-Butylgruppe des Tyrosins erfolgt mit 95 % TFA/CH₂Cl₂ innerhalb 4 h bei 49 °C. Man erhält das Peptid in Form seines Amids in 62%iger Ausbeute, bezogen auf die Harzbeladung von 0.49 mmol.

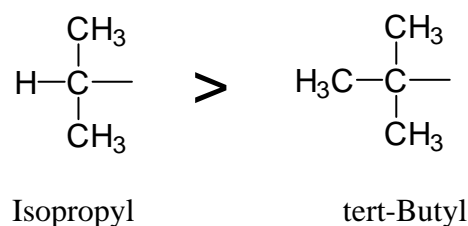
Obwohl es sich bei dieser Festphasensynthese um den gleichen Anker handelt wie es bei den Adpoc-Synthesen der Fall war, und die jeweilige Abspaltung der p-Bumeoc-Schutzgruppe unter wesentlich milderen Bedingungen erfolgt (hier nur 0.25 % TFA/CH₂Cl₂) wurde auch vor dieser Synthese ein Stabilitätstest durchgeführt und zwar wird Fmoc-Leu-OH an das 4-Methoxy-4'-(γ-carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Harz gekuppelt, und dann mit 0.25 % TFA behandelt. Das Ergebnis ist eine völlige Stabilität des Trägermaterials unter diesen schonenden p-Bumeoc-Spaltbedingungen. Die Eignung der p-Bumeoc-geschützten Aminosäurederivate für die Festphasensynthese beweist das Syntheseprodukt des nach der Abspaltung vom Trägermaterial erhaltenen Penta-Peptids.

IV.4. Die 1-(4-Isopropylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl(Iso-Meoc-)-N^α-Aminoschutzgruppe

Da die p-Bumeoc-Schutzgruppe etwas zu labil ist, wurde untersucht, ob durch Austauschen der tert-Butylgruppe am Aromaten gegen eine Isopropylgruppe (in para-Stellung) die Stabilität der so geschützten Aminosäuren erhöht wird. Es wurde angenommen, dass sie aufgrund des geringeren +I-Effektes der Isopropylgruppe weniger leicht abspaltbar sei. Die Iso-Meoc-Gruppe gehört ebenfalls in die Klasse der Urethane. Entgegen der Erwartung stellte sich heraus, dass hier eine besonders hohe Labilität vorherrscht. Normalerweise ist der induktive Effekt von Alkylgruppen, wie zu erwarten, folgendermassen abgestuft¹¹⁷:



Diese Reihenfolge scheint gestört, bei manchen konjugierten Systemen ist sie sogar umgekehrt, wenn die Alkylgruppen mit einem ungesättigten System, wie in unserem Beispiel, einem Benzolkern, verknüpft sind. Es zeigt sich, dass Alkylgruppen in einer Weise, die vom induktiven Effekt verschieden ist, als Elektronen-Donoren fungieren können. Man hat dies durch eine Erweiterung des konjugativen oder mesomeren Effekts erklärt¹¹⁷. Die umgekehrte Abstufung der Elektronendonorfähigkeit in der Reihe:



könnte bedeuten, dass eine Hyperkonjugation nur dann möglich ist, wenn der zum ungesättigten System (Benzolkern) α -ständige Kohlenstoff Wasserstoffatome trägt. Diese Bedingung ist bei der Isopropylgruppe erfüllt, nicht aber bei der tert-Butylgruppe des p-Bumeoc-Restes. Derzeit gibt es allerdings noch keine quantenmechanische Rechtfertigung für die Gültigkeit der Hyperkonjugation.

IV.4.1. Chemische Struktur und Eigenschaften der Iso-Meoc-Aminoschutzgruppe

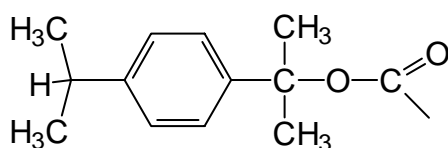


Abb. 48. Struktur der 1-(4-Isopropylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl(Iso-Meoc-)-Schutzgruppe.

Die Einführung des Iso-Meoc-Restes gelingt mit guter Umsetzung (DC-Kontrolle) über den entsprechenden Fluorameisensäureester, der aber schlecht zu isolieren war, und daher in situ mit einer Aminosäure umgesetzt wurde. Bei der Aufarbeitung dieser Iso-Meoc-geschützten Aminosäure wurde festgestellt, dass die Schutzgruppe sehr leicht bei der Behandlung mit 5 % Zitronensäure abspaltet.

Es wird wiederum versucht, das entsprechende Phenylcarbonat **53** herzustellen, welches als Einführungsreagens dieser Schutzgruppe dienen sollte. Da dieses Phenylcarbonat **53** schlechter zu kristallisieren ist, als das p-Bumeocphenylcarbonat (**28**), wurde diese halbfeste Masse mit Aminosäuren umgesetzt. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung zeigte, dass sich die Iso-Meoc-geschützten Aminosäuren (Iso-Meoc-L-Ala-OH•DCHA (**57**) und Iso-Meoc-L-Leu-OH•DCHA (**58**)) schneller bildet, als es für die p-Bumeoc-Schutzgruppe der Fall war.

Die Iso-Meoc-Schutzgruppe spaltet bei Raumtemperatur bereits während der Aufarbeitung innerhalb von wenigen Minuten deutlich ab. Bei Kühlung des Kolbens während der Einengung des Lösungsmittels kann diese Abspaltung etwas verhindert werden. Durch Zugabe von DCHA vor dem Abrotieren bei Raumtemperatur kann die Abspaltung ebenfalls zurückgedrängt werden. Da aber beim Ansäuern mit 5 % Zitronensäure erhebliche Mengen an Produkt verlorengehen, weil die Schutzgruppe unter diesen Bedingungen abspaltet, ist diese neue Schutzgruppe nicht von Interesse. Ein weiterer Nachteil ist der hohe Beschaffungspreis der Ausgangsverbindung 4-Isopropylbenzoesäure (**49**). Der Vorteil dieser Schutzgruppe liegt darin, dass man sie ebenfalls über das entsprechende Phenylcarbonat **53** mittels der Triton-B-Methode analog der Einführung der p-Bumeoc-Schutzgruppe einführen kann und, dass die Umsetzung damit sehr rasch (schneller als p-Bumeoc-Schutzgruppe; DC-Kontrolle) und in höherer Ausbeute erfolgt, als es beim p-Bumeocphenylcarbonat (**28**) der Fall ist. Die Umsetzung wurde mittels DC verfolgt. Das Iso-Meoc-phenylcarbonat (**53**) kristallisierte unter den üblichen Bedingungen nicht so gut aus. Anhand des FD-MS-Spektrums (Abb. 56) konnte dessen Entstehung aber eindeutig nachgewiesen werden. Als weitere Beweisführung (ebenfalls mittels FD-MS-Spektroskopie) für die Existenz dieses Phenyl-carbonats **53** dient die Umsetzung von H-L-Ala-OH zu Iso-Meoc-L-Ala-OH•DCHA (**57**) (Abb. 57). Durch Elementaranalyse konnte gezeigt werden, dass die geschützte Aminosäure isoliert werden kann.

IV.4.2. Synthese der Ausgangsverbindung und Einführungsreagenzien der Iso-Meoc-Schutzgruppe

Die kommerzielle 4-Isopropylbenzoesäure (**49**) dient als Ausgangsverbindung. Der Iso-Meoc-Alkohol (**52**) kann ebenfalls relativ einfach hergestellt werden, indem zunächst die 4-Isopropylbenzoesäure (**49**) mit Thionylchlorid zum entsprechenden Säurechlorid **50**, letztes mit CH₃OH zum entsprechenden Methylester **51** umgesetzt wird, der dann mit Methylmagnesiumiodid (Grignard-Reaktion) zu 2-(4-Isopropylphenyl)-2-propanol (**52**) weiterreagiert (Abb. 49).

Die Einführung der Schutzgruppe erfolgt nach üblicher Methode über das Phenylcarbonat **53** des Iso-Meoc-Restes. Der entsprechende Fluorameisensäureester **54** ist schwer isolierbar und eignet sich deshalb auch nur bedingt als Einführungsreagens. Der Iso-Meoc-OSu-Ester (**55**), sowie der entsprechende Nitrophenylester **56** konnten nicht isoliert werden, da sich beide bereits in Lösung zersetzen.

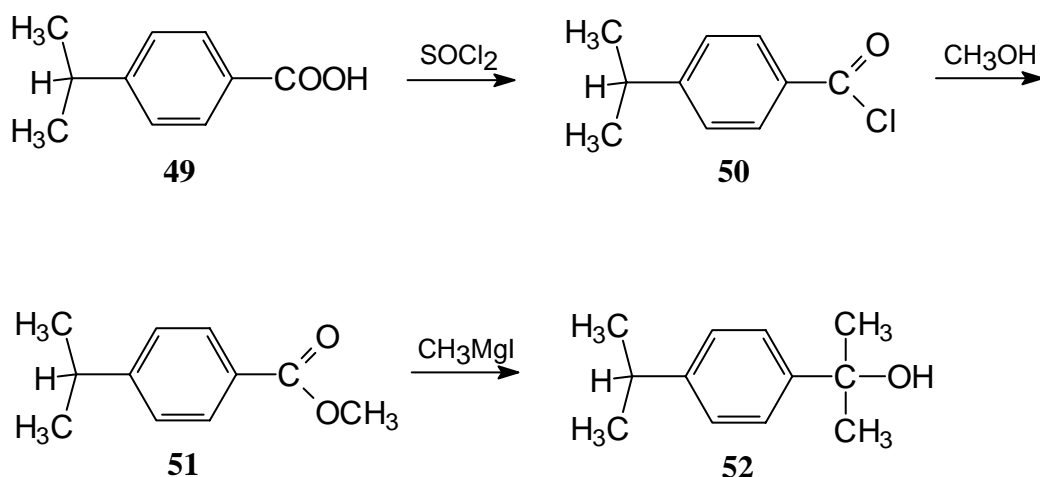


Abb. 49. Schema zur Darstellung von 2-(4-Isopropylphenyl)-2-propanol (**52**).

Abb. 55 zeigt eine Zusammenstellung der untersuchten Iso-Meoc-Einführungsreagenzien.

Von den Verbindungen **51** und **52** wurden ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren aufgenommen.

Das ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **51** (Abb. 50) zeigt zwei Dubletts (bei $\delta = 7.86\text{-}7.91$ ppm (H-3, H-3') und bei $7.24\text{-}7.28$ ppm (H-4, H-4')) was den vier Ringprotonen entspricht. Die beiden Dubletts liegen hier etwas weiter auseinander als es bei Verbindung **26** (Abb. 22) der Fall war.

Die chemischen Verschiebungen der Ringprotonen H-3, H-3' der beiden Ester **26** ($\delta = 7.88\text{-}7.93$ ppm) und **51** ($\delta = 7.86\text{-}7.91$ ppm) erscheinen beinahe an gleicher Stelle, anders ist es bei den Protonen H-4 und H-4'. So liegen diese der Verbindung **26** bei $\delta = 7.45\text{-}7.49$ ppm, von **51** dagegen bei $\delta = 7.24\text{-}7.28$ ppm. Die Protonen der Methoxygruppe ($-\text{OCH}_3$, H-8) kommen bei beiden Verbindungen nahezu an der gleichen Stelle ($\delta = 3.86$ ppm, **26**; $\delta = 3.84$ ppm, **51**). Im Vergleich dazu die chemischen Verschiebung der Ringprotonen H-4, H-4' sowie H-5, H-5' der beiden Alkohole **27** (Bereich: $\delta = 7.36\text{-}7.47$ ppm) und **52** (Aufspaltung in zwei Dubletts: H-4, H-4' ($\delta = 7.40\text{-}7.45$) und H-5, H-5' ($\delta = 7.19\text{-}7.25$)). Das Proton der OH-Gruppe ($-\text{OH}$, H-1) erscheint bei Verbindung **27** bei 2.11 ppm, bei **52** erscheint es bei 1.88 ppm.

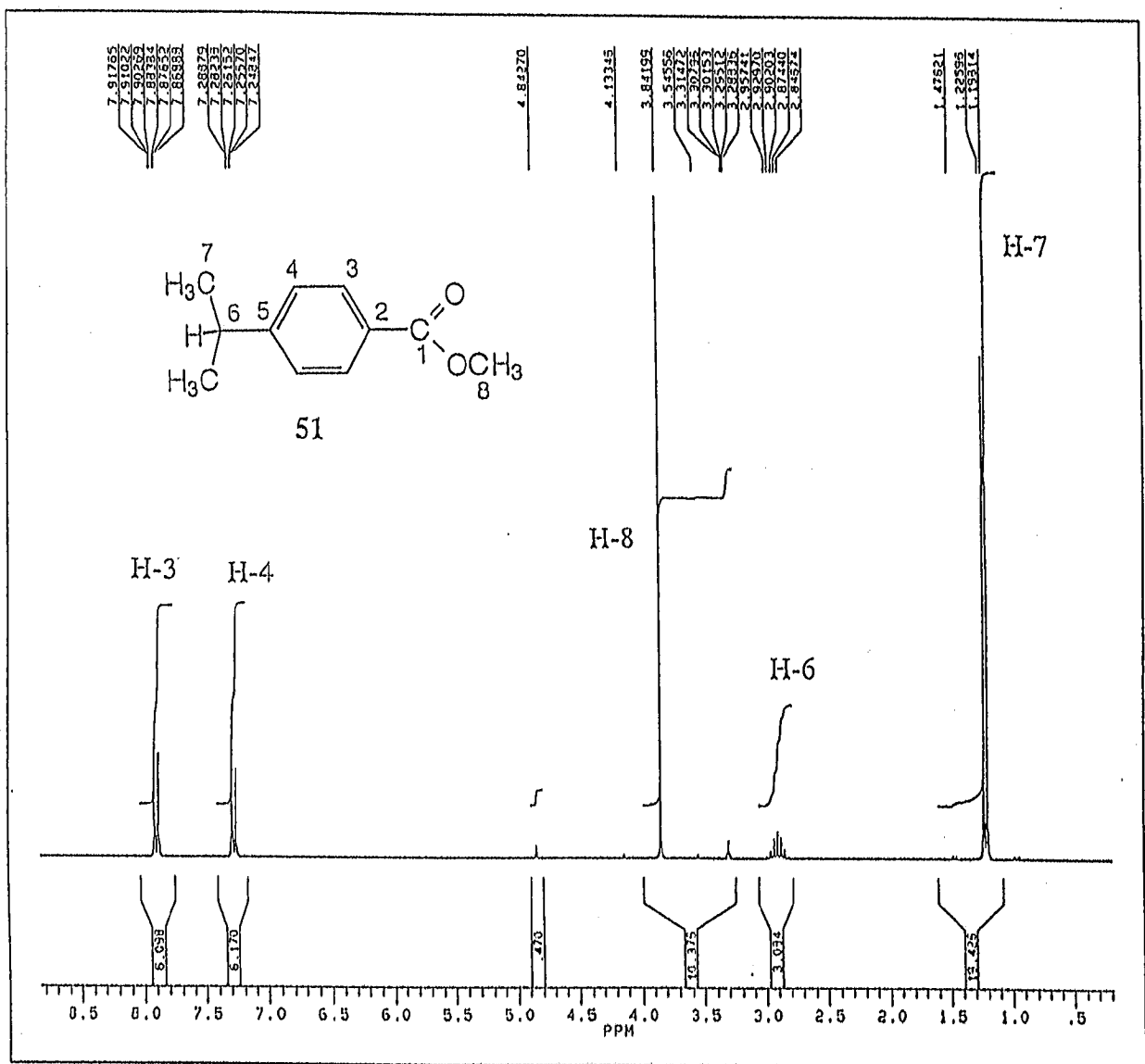


Abb. 50. ¹H-NMR-Spektrum von 4-Isopropylbenzoesäuremethylester^{104, 105} (51) (100 mg in 1 ml MeOH, 250.134 MHz). Interpretation der wichtigsten Signale(δ, ppm) (δ = 7.86-7.91 (m, 2 H, H-3, H-3'), 7.24-7.28 (m, 2 H, H-4, H-4'), 3.84 (s, 3 H, -OCH₃, H-8), 2.84-2.95 (m, 1 H, H-6), 1.19-1.22 (d, 6 H, H-7)). (80 MHz, CDCl₃: δ = 7.91-8.01 (m, 2 H), 7.22-7.32 (m, 2 H), 3.89 (s, 3 H), 2.95 (m, 1 H), 1.25 (d, 6 H))¹⁰⁵.

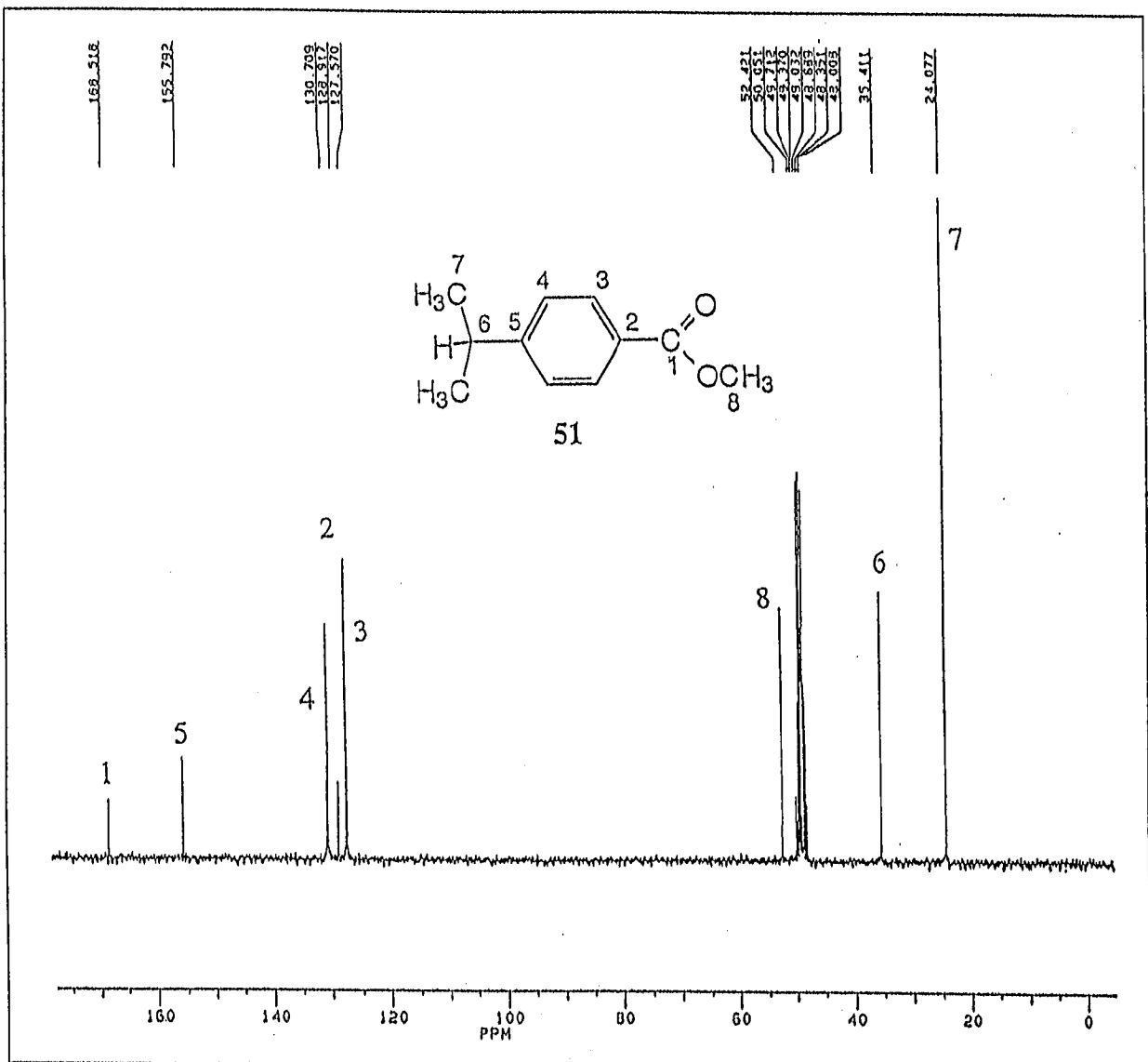


Abb. 51. ^{13}C -NMR-Spektrum von 4-Isopropylbenzoesäuremethylester¹¹⁸ (51) (100 mg in 1 ml MeOH, 62.896 MHz, protonenbreitbandentkoppelt). Interpretation der wichtigsten Signale(δ , ppm) ($\delta = 24.07$ (C-7), 35.41 (C-6), 52.42 (C-8), 127.57 (C-3, C-3'), 128.91 (C-2), 130.70 (C-4, C-4'), 155.79 (C-5), 168.51 (C-1)).

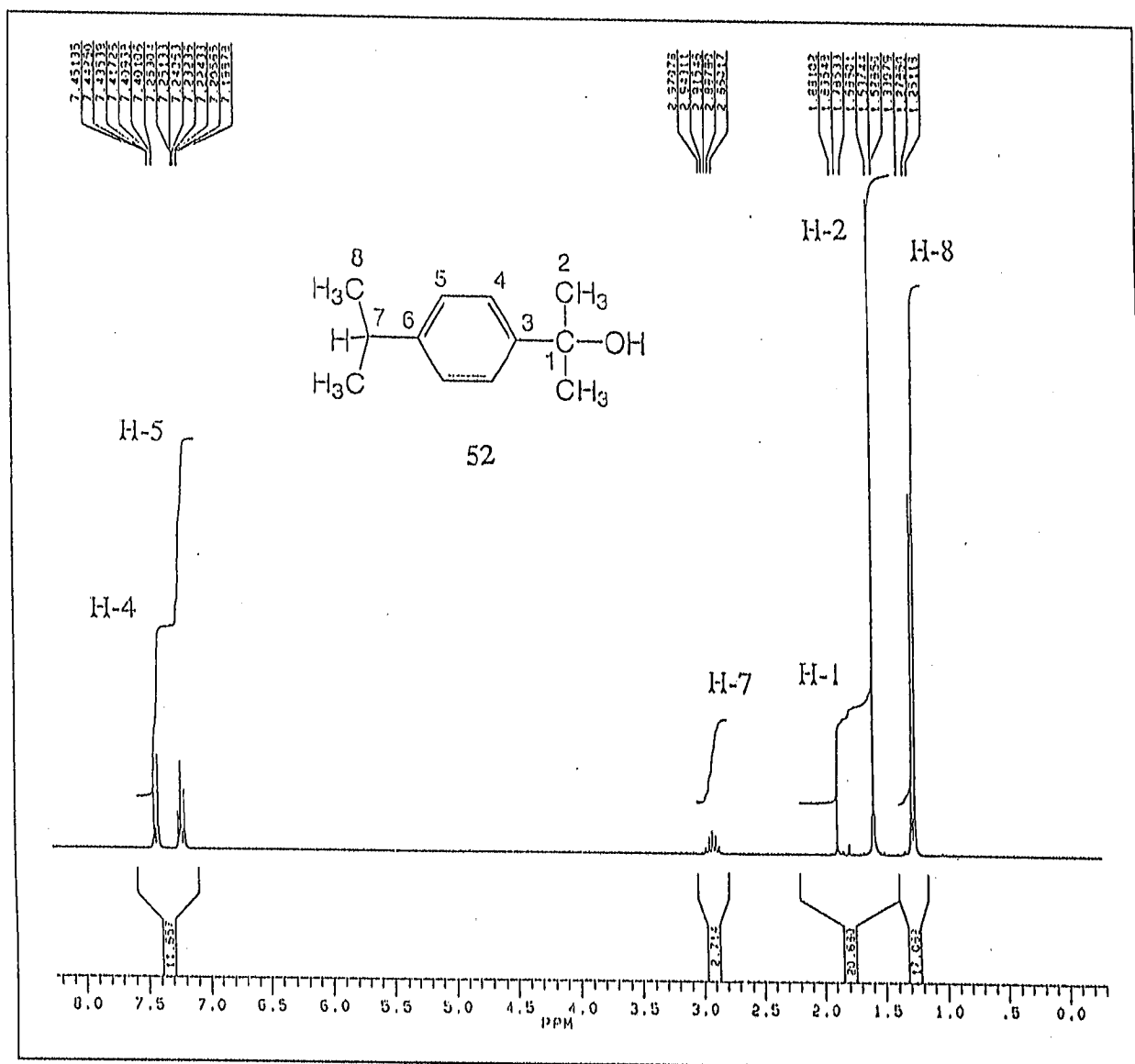


Abb. 52. ¹H-NMR-Spektrum von 2-(4-Isopropylphenyl)-2-propanol¹¹⁹ (52) (100 mg in 1 ml CDCl₃, 250.133 MHz). Interpretation der wichtigsten Signale(δ, ppm) (δ = 7.40-7.45 (m, 2 H, H-4, H-4'), 7.19-7.25 (m, 2 H, H-5, H-5'), 2.86-2.97 (m, 1 H, H-7), 1.88 (s, 1 H, H-1, -OH)), 1.52-1.58 (s, 6 H, H-2), 1.25-1.27 (d, 6 H, H-8)).

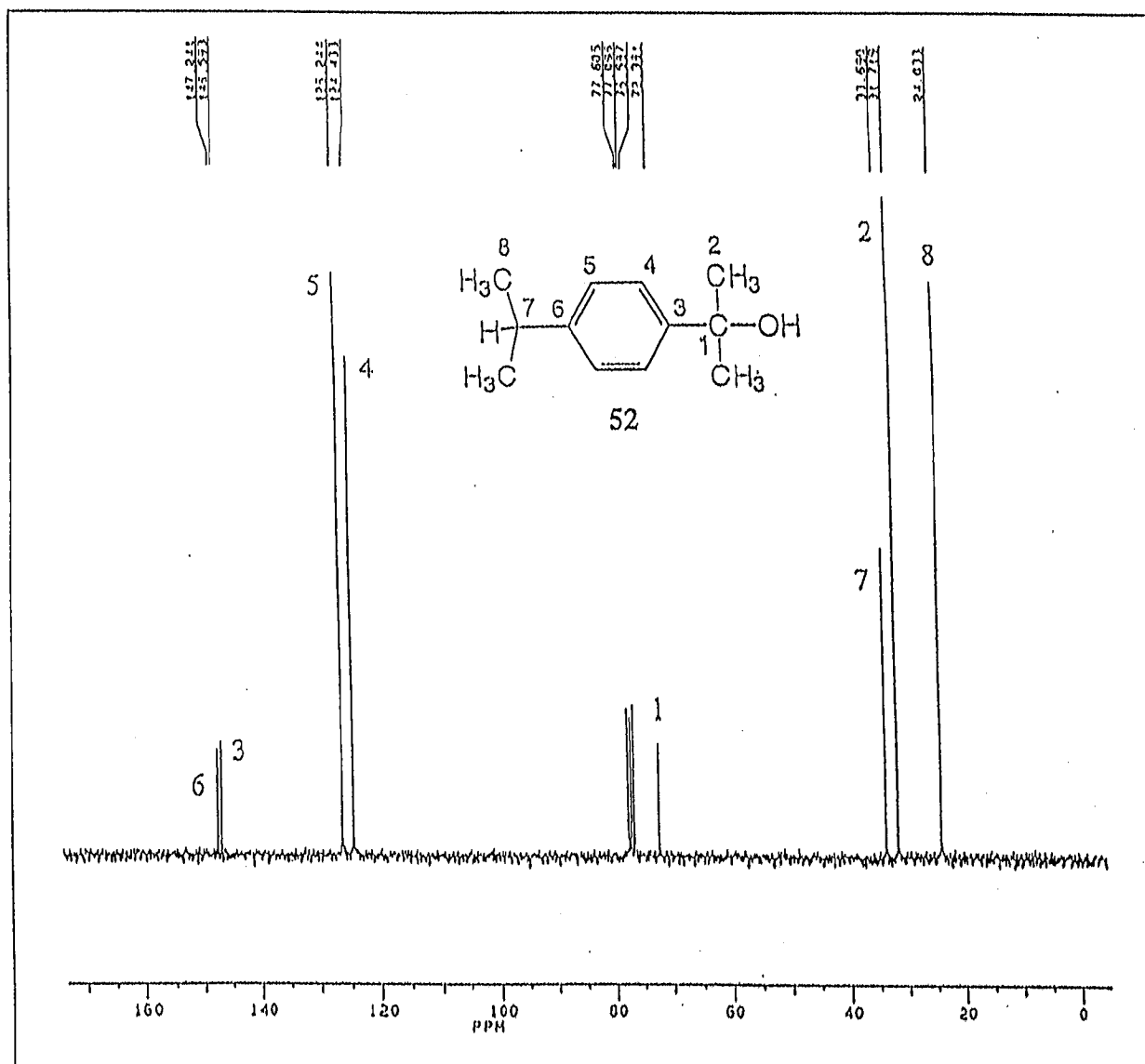


Abb. 53. ^{13}C -NMR-Spektrum von 2-(4-Isopropylphenyl)-2-propanol (52) (100 mg in 1 ml CDCl_3 , 62.896 MHz). Interpretation der wichtigsten Signale(δ , ppm) ($\delta = 24.03$ (C-8), 31.71 (C-2), 33.69 (C-7), 72.38 (C-1), 124.43 (C-4), 126.24 (C-5), 146.59 (C-3), 147.24 (C-6)).

Tab. 9 zeigt eine Aufstellung der ^{13}C -NMR-chemischen Verschiebungen der Verbindungen 26, 27, 51 und 52.

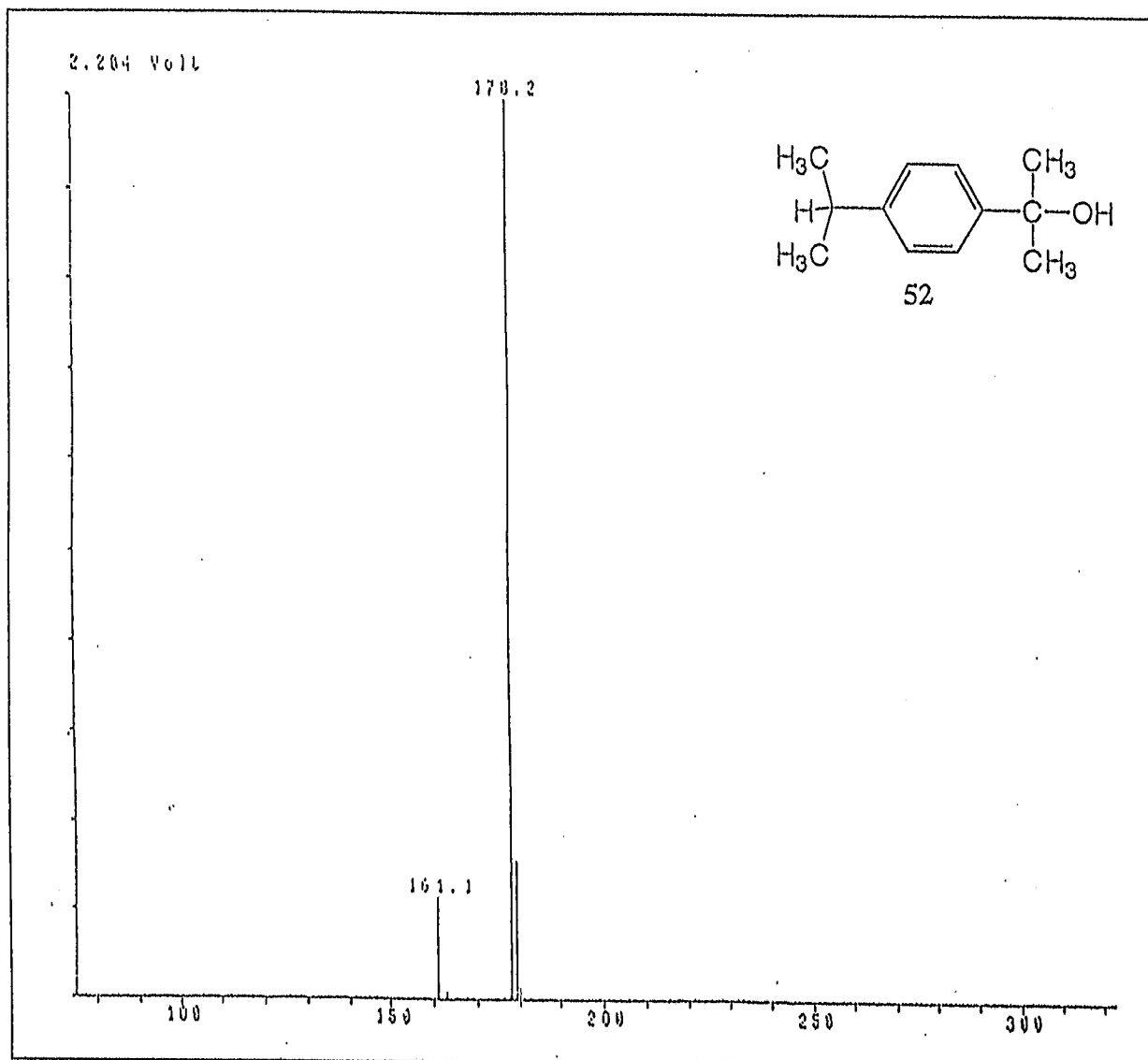


Abb. 54. FD-MS-Spektrum von 2-(4-Isopropylphenyl)-2-propanol (52) (m/z : 178.2 ($[\text{M}]^+$), 161.1 ($[\text{C}_3\text{H}_7(\text{C}_6\text{H}_4)\text{C}(\text{CH}_3)_2]^+$)). Temperatur der Ionenquelle: 60 °C.

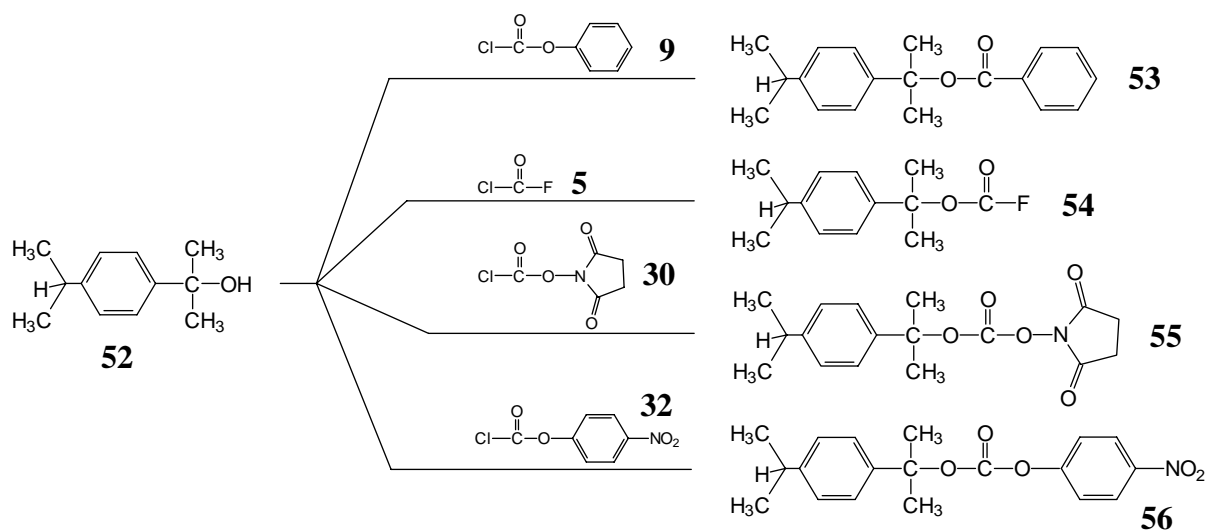
Tab. 9. Chemische Verschiebungen der ^{13}C -NMR-Spektren der Verbindungen 26, 27, 51 und 52.

Daten der ^{13}C -NMR-Spektren von 26, 27, 51 und 52 (Abb. 23, 25, 51 und 53).

Verbin- dung	C-1 (δ , ppm)	C-2 (δ , ppm)	C-3 (δ , ppm)	C-4 (δ , ppm)	C-5 (δ , ppm)	C-6 (δ , ppm)	C-7 (δ , ppm)	C-8 (δ , ppm)
26	168.55	128.50	126.48	130.39	157.97	35.89	31.46	52.40
51	168.51	128.91	127.57	130.70	155.79	35.41	24.07	52.42

IV. SPEZIELLER TEIL

Verbindung	C-1 (δ , ppm)	C-2 (δ , ppm)	C-3 (δ , ppm)	C-4 (δ , ppm)	C-5 (δ , ppm)	C-6 (δ , ppm)	C-7 (δ , ppm)	C-8 (δ , ppm)
27	72.32	31.68	146.18	124.19	125.09	149.50	34.40	31.42
52	72.38	31.71	146.59	124.43	126.24	147.24	33.69	24.03



Iso-Meoc-OPh (53)	[1-(4-Isopropylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl]-phenylester
Iso-Meoc-F (54)	Fluorameisensäure-[1-(4-Isopropylphenyl)-1-methyl-ethyl]-ester
Iso-Meoc-OSu (55)	[1-(4-Isopropylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl]-N-Hydroxy-succinimidester
Iso-Meoc-ONPh (56)	[1-(4-Isopropylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl]-p-nitrophenylester

Abb. 55. Schema zur Darstellung von Einführungsreagenzien als Iso-Meoc-Rest.

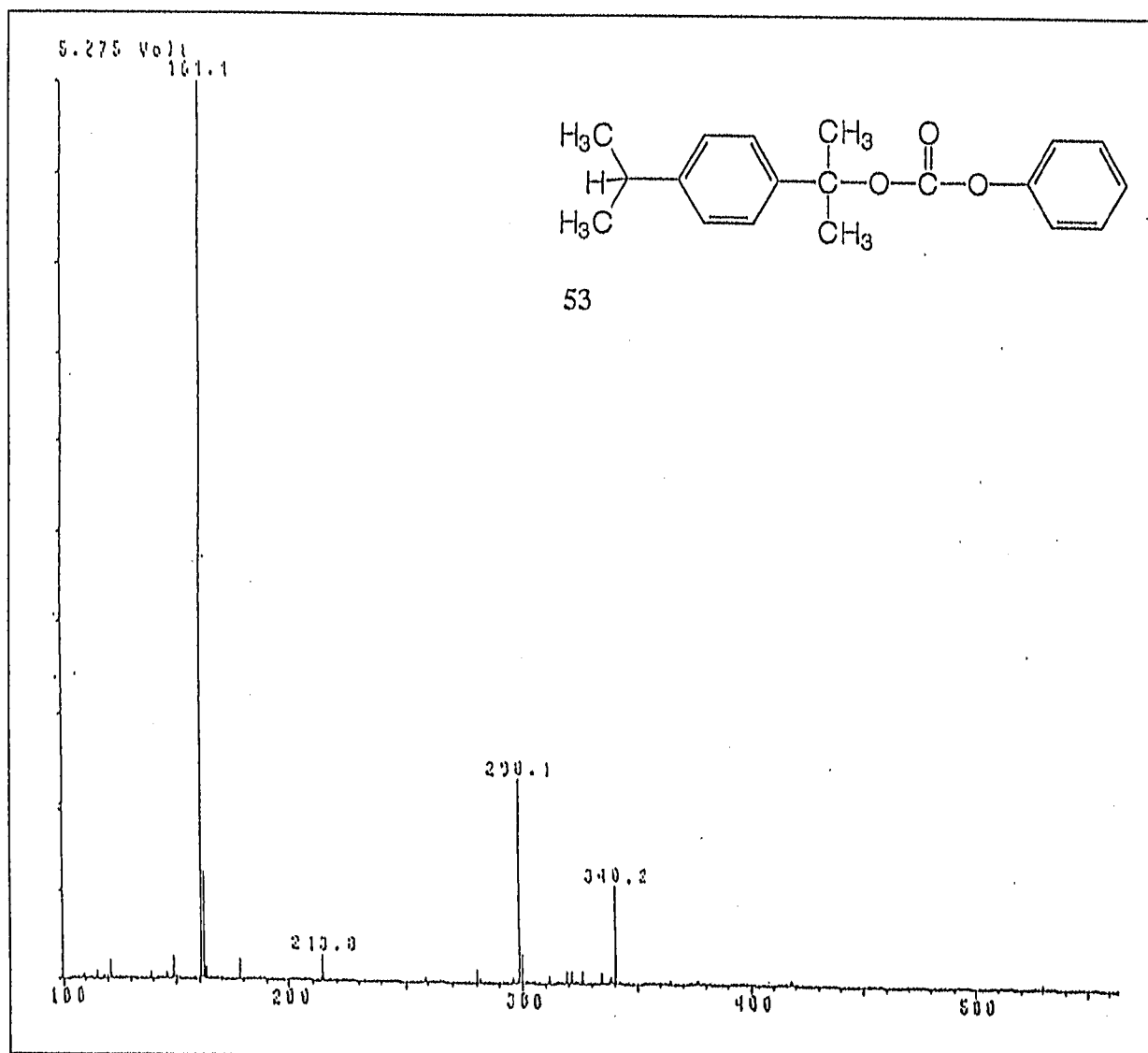


Abb. 56. FD-MS-Spektrum von Iso-Meoc-Phenylcarbonat (53) (m/z : 299.1 ($[MH]^+$), 298.1 ($[M]^+$), 213.8 ($[Diphenylcarbonat]^+$), 161.1 ($[C_3H_7(C_6H_4)C(CH_3)_2]^+$)). Temperatur der Ionenquelle: 30 °C.

IV.4.3. Darstellung von Iso-Meoc-geschützten Aminosäuren

Die Einführung des Iso-Meoc-Restes über den Fluorameisensäureester 54 gelingt sowohl über die Benzyltrimethylammoniumsalze der Aminosäuren in organischen Lösungsmitteln, als auch in wässrig/organischer Lösung bei pH 8-10 und 0 °C. Wie schon erwähnt, ist diese Methode wegen der schlechten Isolierbarkeit des Fluorameisensäureesters 54 ungeeignet. Deshalb führt man die Schutzgruppe über das entsprechende Phenylcarbonat 53 (Triton-B-Methode) ein. Die Umsetzung der Aminosäuren zu den Iso-Meoc-geschützten Derivaten

IV. SPEZIELLER TEIL

konnte mittels DC-Kontrolle verfolgt werden, allerdings gelang es nur beim Alanin- 57 und Leucin-Derivat 58 Kristalle zu erhalten, welche dann durch CHN-Analysen bestätigt werden konnten.

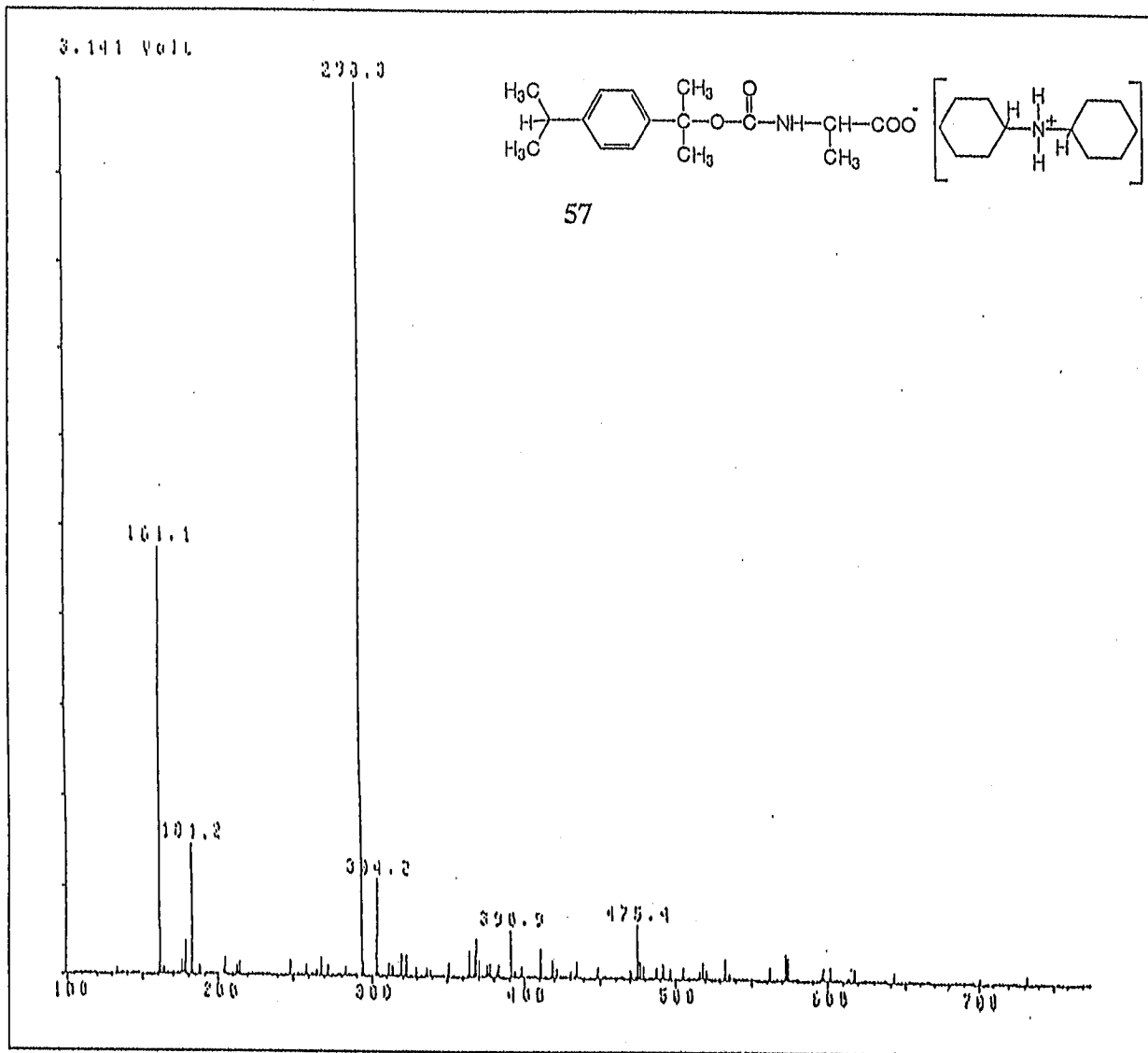


Abb. 57. FD-MS-Spektrum von Iso-Meoc-L-Ala-OH·DCHA (57) (m/z : 475.4 ($[MH]^+$), 294.3 ($[Iso-Meoc-L-Ala-OH + H]^+$), 293.3 ($[Iso-Meoc-L-Ala-OH]^+$), 182.2 ($[DCHA + H]^+$), 181.2 ($[DCHA]^+$), 162.1 ($[C_3H_7(C_6H_4)CH(CH_3)_2]^+$), 161.1 ($[C_3H_7(C_6H_4)C(CH_3)_2]^+$). Temperatur der Ionenquelle: 35 °C.

IV.5. Vergleich der Stabilität der Phenylcarbonate verschiedener Schutzgruppen des Urethantyps

Nachdem sich die Phenylcarbonate der beiden neuen Schutzgruppen relativ gut als Einführungsreagenz bewährt haben, wurde versucht, im Vergleich dazu die Aktivität der Phenylcarbonate von Adpoc- und t-Bumeoc- zu untersuchen. Im Falle von Adpoc-Phenylcarbonat wurden Glycin und Leucin, von t-Bumeoc-Phenylcarbonat (**66**) wurde Leucin eingesetzt.

IV.5.1. Synthese von Adpoc- und t-Bumeoc-phenylcarbonat und deren Eignung als Einführungsreagenzien

IV.5.1.1. Synthese des Adpoc-phenylcarbonats⁷⁴ (**10**)

Das Schema des zur Darstellung von Adpoc-Phenylcarbonat (**10**) benötigten 2-(1-Adamantyl)-2-propanol (Adpoc-OH) (**4**) ist in Kap. IV.2.5. angegeben. Der so erhaltene Adpoc-OH (**4**) wird mit CH₂Cl₂/Pyridin auf -7 °C abgekühlt und nach üblicher Methode durch Zugabe von Chlorameisensäurephenylester (**9**) zu Adpoc-Phenylcarbonat (**10**) umgesetzt. Zur Synthese des Adpoc-L-Leu-OH wird das Triton-B-Salz der Aminosäure H-L-Leucin-OH in abs. DMF mit Adpoc-OPh (**10**) umgesetzt. Nach Ansäuern mit 10%iger Zitronensäure erhält man die geschützte Aminosäure.

IV.5.1.2. Synthese des t-Bumeoc-phenylcarbonats¹²³ (**66**)

Abb. 58 zeigt das Schema zur Darstellung des [1-(3,5-Di-tert-butylphenyl)-1-methylethoxy-carbonyl]-phenylesters (t-Bumeoc-OPh) (**66**). Ausgehend vom tert-Butylchlorid¹²⁰ (**60**) wird dieses mit Toluol (**59**) zum 3,5-Di-tert-Butyltoluol^{121, 122} (**61**) umgesetzt, welches dann mit KMNO₄ zur 3,5-Di-tert-butylbenzoesäure^{103, 123-125} (**62**) weiterreagiert. Der 3,5-Di-tert-butylbenzoesäure-methylester¹⁰³ (**64**) entsteht durch Umsetzung der 3,5-Di-tert-butylbenzoesäure (**62**) mit Thionylchlorid zum entsprechenden Säurechlorid **62**, welches mit Methanol. zum Metylester **64** weiterreagiert. 2-(3,5-Di-tert-butylphenyl)-2-propanol^{102, 123} (t-Bumeoc-OH) (**65**) der durch eine Grignard-Reaktion aus **64** erhalten wird, reagiert dann mit Chlorameisensäurephenylester (**9**) in Methylenchlorid/Pyridin zum t-Bumeoc-Phenylcarbonat¹²³ (**66**).

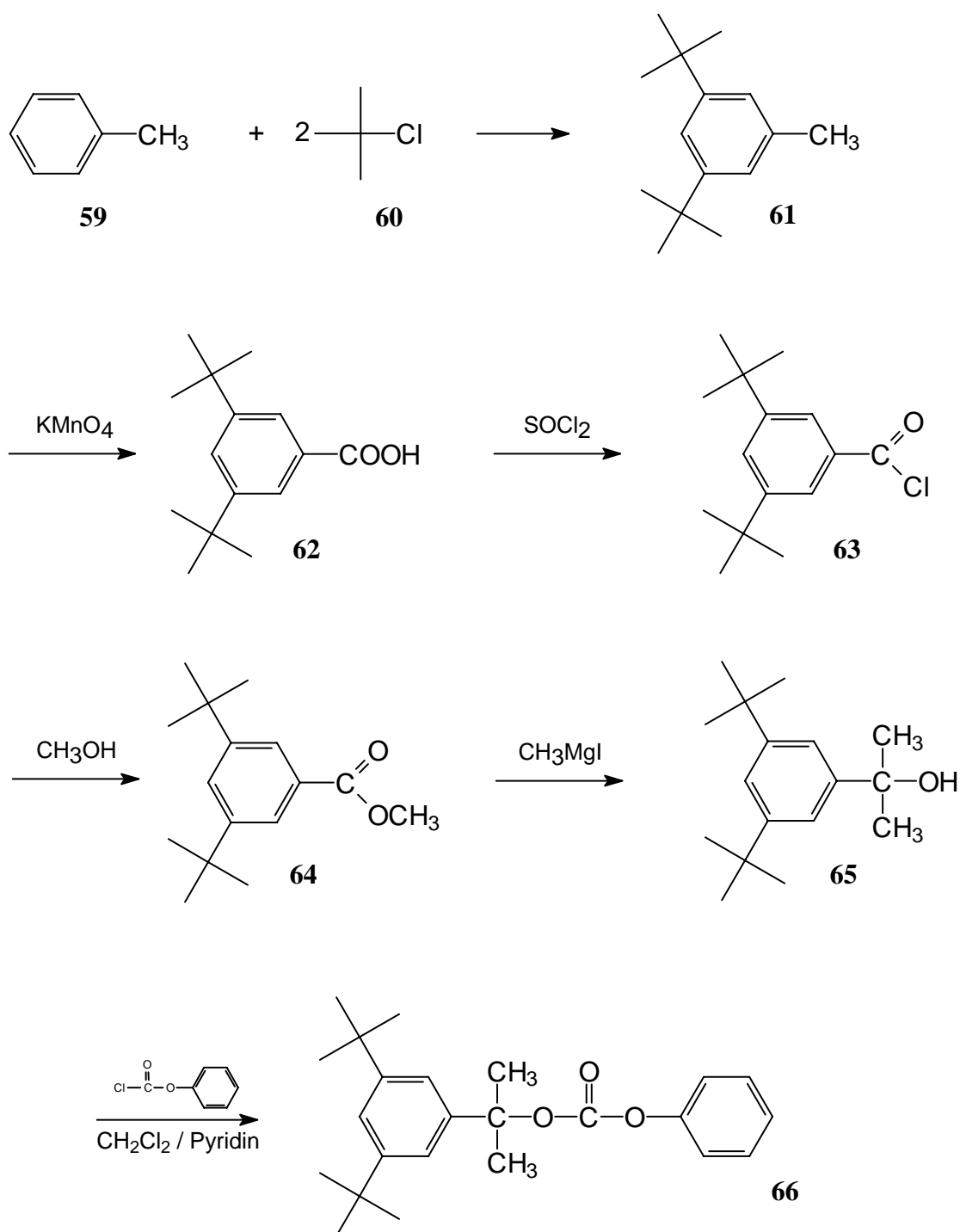


Abb. 58. Schema zur Darstellung von [1-(3,5-Di-tert-butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl]-phenylester¹²³ (**66**).

Mit diesem Phenylcarbonat **66** wird t-Bumeoc-L-Leu-OH•DCHA (**67**) hergestellt.

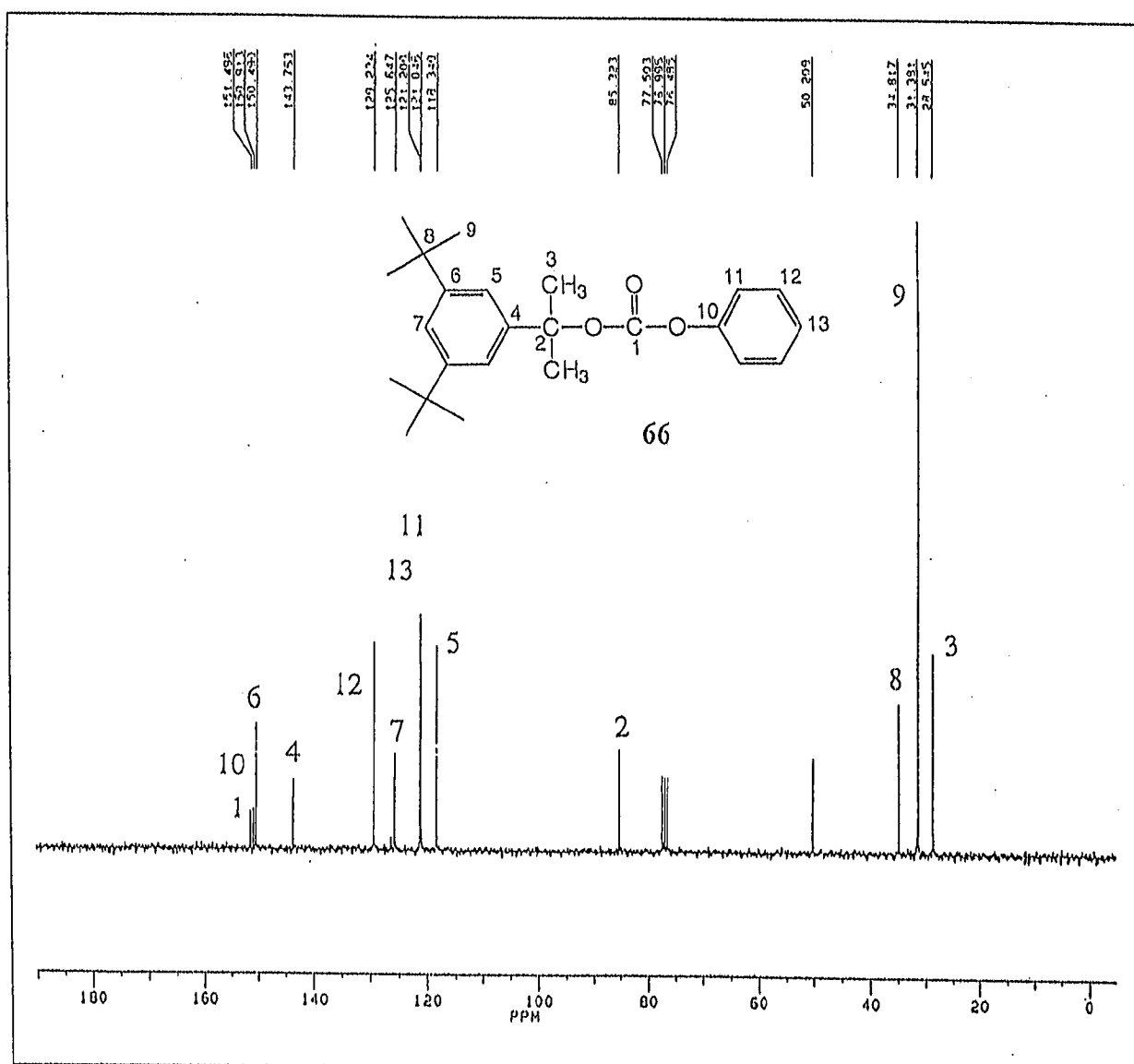


Abb. 59. ^{13}C -NMR-Spektrum von [2-(3,5-Di-tert-butylphenyl)propyl-(2)]-phenylcarbonat (66) (100 mg in 1 ml CDCl_3 , 62.896 MHz, protonenbreitbandentkoppelt). ($\delta = 28.54$ (C-3), 31.38 (C-9), 34.81 (C-8, Cq), 85.32 (C-2), 118.34 (C-5, C-5'), 121.04 (C-11, C-11'), 121.20 (C-13), 125.64 (C-7), 129.22 (C-12, C-12'), 143.76 (C-4), 150.49 (C-6, C-6'), 150.91 (C-10), 151.49 (C-1, Cureth.)).

IV.6. Die 1-(3,5-Di-isopropylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl (Diiso-Meoc)-„Schutzgruppe“

Da die t-Bumeoc-Schutzgruppe schon zu labil ist, sollte untersucht werden, ob ein Austausch der tert-Butylgruppen in meta-Stellung gegen zwei Isopropylgruppen zu einer etwas weniger labilen Schutzgruppe führt. Der Hyperkonjugationseffekt, welcher bei der Iso-Meoc-Gruppe

in para-Stellung auftritt, könnte bei zwei in meta-Stellung befindlichen Isopropylgruppen weniger ins Gewicht fallen.

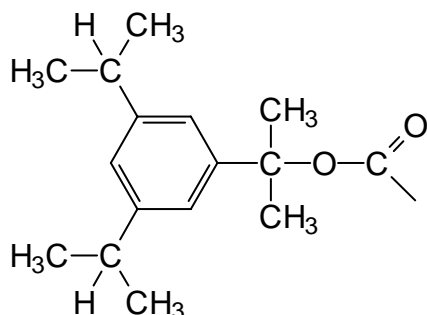


Abb. 60. Struktur des 1-(3,5-Di-isopropylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl-Restes.

IV.6.1. Synthese der Ausgangsverbindung

Es wurde zunächst Isopropylchlorid mit Toluol durch eine Friedel-Crafts-Alkylierung zum 3,5-Diisopropyltoluol umgesetzt. Dabei wurden auf der DC-Platte 6 verschiedene Spots erhalten. Die Ausbeute an Produkt war somit verhältnismässig gering.

Da die Anwendbarkeit einer Schutzgruppe von einer einfachen Einführung abhängt, wurde die Aufarbeitung nicht mehr weiter verfolgt.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

V.1. Spektroskopische Methoden

V.1.1. Kernresonanzspektroskopie

Die Aufnahme der PFT- $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektren erfolgt mit folgenden Geräten der Fa. Bruker-Physik AG, Karlsruhe und TMS als internem Standard: HFX-90-Multikern-NMR-Spektrometer (22.628 MHz), WP-80-NMR-Spektrometer (20.115 MHz), und WM 400-MHz-Spektrometer (100.62 MHz).

Die Spektren werden durch Akkumulation von ^{13}C -Impulsinterferogrammen (2-3.5 μsec ; 0.4 sec/scan) und anschließender Fouriertransformation (BNC-28.Rechner) des akkumulierten Interferogramms erhalten. Die zur Messung eingesetzte Substanzmenge beträgt 20-30 mg pro 1.5 ml des jeweiligen Lösungsmittels.

V.1.2. Massenspektroskopie

Die Elektronenstoss-, (FAB-MS), und Felddesorptionsmassenspektren, (FD-MS), werden mit einem Mat 711A Gerät der Fa. Varian, Bremen, gemessen.

FAB-MS: Direkteinlasssystem, Elektronenenergie 70 eV, Temperatur der Ionenquelle bis 30-200 °C; Lösungsmittel-Matrix: Glycerin ($[\text{M}]^+$ -Molekülionenpeak: 277).

V.1.3. Drehwerte

Die Messung der Drehwerte erfolgt mit einem OLD-5-Polarimeter der Fa. Zeiss, Oberkochen, bei $\lambda = 546 \text{ nm}$. Die erhaltenen $[\alpha]_{546}$ -Werte werden mit Hilfe des Korrekturfaktors 0.85103 auf die entsprechenden $[\alpha]_{\text{D}}$ -Werte nach der Formel:

$$[\alpha]_{\text{D}} = 0.85103 \cdot [\alpha]_{546} \text{ umgerechnet.}$$

V.2. Chromatographische Methoden

V.2.1. Dünnschichtchromatographie

Zur Synthesekontrolle und zur Überprüfung aller dargestellten Verbindungen mittels Dünnschichtchromatographie werden DC-Fertigplatten der Fa. Merck, Darmstadt, (Kieselgel 60 F₂₅₄, 5•10 cm, auf Glas), sowie der Fa. Riedel de Haen, Seelze-Hannover, (SI F, 10•20 cm, auf Aluminium) verwendet. Folgende Fliessmittelsysteme wurden benutzt:

V. EXPERIMENTELLER TEIL

D: Benzol/Chloroform/Methanol/Wasser (40:40:40:5)

Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgt mittels:

- UV-Detektion bei $\lambda = 254$ nm
- Joddampf
- Ninhydrinlösung^{52, 126, 127}, Erwärmen auf 110 °C
- Chlor/o-Tolidin-Lösung¹²⁸

V.2.2. Adsorptionschromatographie

Die Hochreinigung erfolgt auf selbstgepackten Glassäulen (100•200 cm, vt: 314 ml) gefüllt mit Kieselgel 60 (70-230 mesh ASCM) der Fa. Merck, Darmstadt.

V.2.3. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die HPLC-Anlage besteht aus einer BT-8100 Pumpe, einem BT-8200 HPLC UV/VIS-Detector, sowie einem C-R 5 A oder C-R 6 A CHROMATOPAC-Integrator (alles von der Fa. Biotronik) und einer PEP-S-Säule (C₂ + C₁₈, 5, 4•250 mm, LKB-Pharmacia).

V.3. Analytische Methoden

V.3.1. Elementaranalysen

Der prozentuale C-, H-, N-, S- Gehalt der Syntheseprodukte wird mit einem Elemental Analyzer, Typ 240/B der Fa. Perkin-Elmer, Konstanz bestimmt. Zur Berechnung der Molekulargewichte werden folgende Atomgewichte zugrunde gelegt: C = 12.011, H = 1.0079, N = 14.007, O = 15.999, S = 32.06, Cl = 35.453, F = 18.998.

V.3.2. Aminosäureanalysen

Die Aminosäureanalysen werden nach 24 stündiger Hydrolyse der Peptide mit 6 N HCl unter Zusatz von 2.5 % Thioglycolsäure bei 110 °C und anschließender Lyophilisierung mit folgenden Geräten und Methoden durchgeführt:

1. klassische Kationen-Austauschchromatographie: Derivatisierung mit Ninhydrin.

HPLC-Gerät: Liquimat III der Fa. Kontron, Eching.

Säule (5µm, 180•4 mm) mit Säulenmaterial Ck 10 F, der Fa. Mitsubishi, Japan.

Mobile Phase: Pico Buffer System 2 bei 52 °, 57 °, 77 °C der Fa. Pierce, Rockford, USA.

2. OPA/MPA-Derivatisierung: Fluoreszenz-Detektion bei $\lambda = 440/570$ nm.

Die von Graser et. al¹²⁹ beschriebene Methode der Vorsäulenderivatisierung wird wie folgt modifiziert und in ihrer Empfindlichkeit¹³⁰ gesteigert.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Die Probe wird in 100 µl Natriumboratpuffer (pH 9.3) gelöst und 20 µl davon werden durch Zugabe von 10 µl o-Phthaldialdehyd/3-Mercaptopropionsäure (OPA/MPA) (10 mg o-Phthaldialdehyd in 1 ml Methanol und 10 µl 3-Mercaptopropionsäure in 1 ml Methanol) derivatisiert. Nach 2.5 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 1 M KH_2PO_4 beendet. 20 µl der Probe werden über eine 20-µl-Schleife in das HPLC-System injiziert.

Man verwendet beim HPLC-Gerät das Modell BT 8100 (Fa. Biotronik, Maintal). Für die Säulen nimmt man die Fertigsäulen Li-Chrospher 100, RP-18 e (5 µ, 250•4 mm) (Fa. Merck, Darmstadt). Als Fluoreszenz-Detektor dient das Modell RF-535 (Fa. Shimadzu, Düsseldorf). Der lineare Gradient der mobilen Phase beträgt 0-100 % B in 12 Minuten bei einer Fliessgeschwindigkeit von 1.5 ml/min. Es werden die Puffer A (12.5 mmol Na_2HPO_4 /12.5 mmol NaH_2PO_4 /2 % THF/3 % Acetonitril) und B (30 % Acetonitril in 12.5 mmol Na_2HPO_4 /12.5 mmol $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) eingesetzt.

V.3.3. Racemattest

Für den Racemattest werden die Proben nach schonender Hydrolyse mit 6 N HCl durch Veresterung mit Propanol und Acylierung mit Trifluoressigsäure unter Zusatz von SnCl_2 derivatisiert. Die Messung erfolgt an einer mit Chirasil-Val belegten Glaskapillare (20 m) und einem linearen Temperaturprogramm (80-200 °C, 4 °C/min).

Beim Gaschromatographen handelt es sich um Fractovap G1 und Fractovap 2101 AC (Fa. Carlo Erba, Hofheim).

V.4. Sonstige Geräte

Alle Schmelzpunkte werden auf einer Schmelzpunktbestimmungsapparatur nach Dr. Tottoli, Typ Büchi 510 der Fa. Büchi, Flavil, Schweiz, bestimmt und sind nicht korrigiert.

Die pH-Werte werden mit einem pH-Meter E 512 der Fa. Metrohm, Bad Herisau, Schweiz, gemessen. In Kombination mit einem Impulsomat E 73 der gleichen Firma kann das pH-Meter als pH-Stat benutzt werden.

V.5. Chemikalien

Die folgenden Fmoc-Aminosäuren werden von der Firma Novabiochem, Läfelfingen, Schweiz, bezogen:

Fmoc-L-Arg(Mtr)-OH,

Fmoc-L-Pro-OH,

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Fmoc-L-Gly-OH,
Fmoc-L-His(Trt)-OH,
Fmoc-L-Leu-OH,

Fmoc-L-Ser(tBu)-OH,
Fmoc-L-Trp-OH
Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH,

Ausserdem werden folgende Feinchemikalien eingesetzt:

DCCI	Fluka, Buchs, Schweiz
DIEA	Fluka, Buchs, Schweiz
tBuOH	Merck, Darmstadt
4-tert-Butylbenzoesäure	Fluka, Buchs, Schweiz
4-Isopropylbenzoesäure	Fluka, Buchs, Schweiz
DMF	Merck, Darmstadt
HOBt	Bachem, Heidelberg
N-Fmoc-4-methoxy-4'-(γ -carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Polystyrol-Divinylbenzol	Bachem, Heidelberg
Ninhydrin	Merck, Darmstadt
Pyridin(p.A.)	Merck, Darmstadt
TFA(p.A.)	Aldrich, Steinheim
Zitronensäure(p.A.)	Merck, Darmstadt

Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungsmittel technischer Qualität werden ebenfalls von den oben genannten Firmen bzw. von der Firma Riedel deHaen bezogen. Für die Synthesen werden die Reagenzien und Lösungsmittel folgendermassen gereinigt und getrocknet:

Diethylether, THF, Dioxan: 4 h über Na und Benzophenon unter Rückfluss erhitzt und danach destilliert.

Pyridin: 3 h über Ninhydrin unter Rückfluss erhitzt und anschliessend destilliert.

Dichlormethan: 4 h über CaH₂ unter Rückfluss erhitzt und danach destilliert.

Alle absolutierten Lösungsmittel werden nach der Destillation mit Argon gesättigt und über Molekularsieb 4 Å aufbewahrt. Für die Peptidsynthese wird DMF mit Stickstoff gesättigt. Für die chromatographische Aufbereitung mittels HPLC werden die Lösungsmittel entgast.

V.6. Festphasensynthese von LH-RH mit Adpoc- und Fmoc-Strategie

V.6.1. Darstellung von Adamantan-carbonsäure-(1)-methylester (3)⁷⁴

90.12 g (0.5 mol) 1-Adamantan-carbonsäure (**1**) und 117.4 g (0.6 mol) Thionylchlorid werden 1.5 h lang am Rückfluss gekocht. Überschüssiges Thionylchlorid wird am Rotationsverdampfer abgezogen. Die verbleibende Lösung wird mit 200 ml abs. Methanol versetzt (Überschuss!) und 3 h am Rückfluss gekocht. Man lässt den Ansatz bei Raumtemperatur über Nacht rühren. Danach gibt man Diethylether dazu, und die Etherphase wird dreimal mit

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Wasser und dreimal mit KHCO_3 gewaschen. Dann trocknet man über MgSO_4 , worauf schnell eine klare Lösung entsteht, die am Rotationsverdampfer eingengt wird. Dabei kristallisiert das Produkt bereits aus.

Ausbeute: 176 g 3 (91 % d. Th.)	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_2$ (194.27)
Schmp.: 39 °C (38-39 °C) ⁷⁶	Ber.: C 74.19 H 9.34
Rf _D : 0.56	Gef.: C 74.08 H 9.24

V.6.2. Herstellung von 2-(1-Adamantyl)-2-propanol (**4**)⁷⁴

In einem 1 l-3-Hals-Rundkolben werden 38.4 g Magnesium-Späne mit 150 ml abs. Diethylether überdeckt. In einem Tropftrichter werden 98.8 ml CH_3I mit ca. 400 ml abs. Diethylether gemischt. Diese Mischung tropft man langsam zu den Mg-Spänen bei Raumtemperatur. Dieser Vorgang dauert ungefähr 90 Minuten. Danach lässt man das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abkühlen. Dann gibt man eine Lösung von 112 g Adpoc-Methylester (**3**) in 300 ml abs. Diethylether langsam zum Grignard-Reagens. Nachdem ungefähr 100 ml des gelösten Esters **3** zutropft waren, beginnt der Ether heftig zu sieden, und es empfiehlt sich, den Reaktionskolben mit Eis/Wasser abzukühlen. Dann kann man weiter Ester zutropfen.

Zu einer mit Eis gekühlten NH_4Cl -Lösung (9 Mol = 80 g in 3 l Wasser) gibt man 3 kg Eis und säuert mit konz. HCl auf pH 2-3 an und giesst die abgekühlte Reaktionsmischung langsam zu. Der pH-Wert wird auf 2-3 mit konz. HCl eingestellt. Die wässrige Phase wird 2 mal mit Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit Wasser, 5%igem NaHSO_3 , Wasser, 5%igem KHCO_3 ausgeschüttelt und mit Wasser neutral gewaschen. Die Lösung wird auf ca. 2 l eingengt, wobei das Produkt ausfällt. Zur vollständigen Kristallisation wird es in die Kälte gestellt. Die Kristalle werden abfiltriert und über Nacht im Vakuum über NaOH getrocknet.

Ausbeute: 94.75 g 4 (84.6 % d.Th.)	$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}$ (194.32)
Schmp.: 79 °C (78-80 °C) ⁷⁴	Ber.: C 80.35 H 11.41
Rf _D : 0.59	Gef.: C 80.18 H 11.29

V.6.3. Synthese von Fluorameisensäure-2-adamantyl(1)-propyl(2)-ester (Adpoc-F) (6)⁷⁴

Man löst 58.2 g (0.3 mol) 2-Adamantyl(1)-propanol(2) (4) in 300 ml abs. Ether und gibt 42 ml Triethylamin dazu. Innerhalb von 2-3 Stunden wird trockenes Carbonylchloridfluorid (5) (frei von SO₃, aus 60 g 65%igem Oleum und 25 ml Fluorotrìchlormethan gewonnen) und bei -40 °C direkt einkondensiert. Hierbei fällt Triethylaminhydrochlorid aus. Nach Beendigung der Gasentwicklung belässt man das Gemisch über Nacht bei -18 °C, danach wird bei 200 Torr und 10 °C entgast. Nach Filtration wird der Rückstand mit abs. Diethylether nachgewaschen. Das Filtrat (Adpoc-F (6)) kann sowohl in gelöster Form als auch kristallin nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, eingesetzt werden.

Ausbeute: 65.80 g 6 (91 % d. Th.)

C₁₄H₂₁O₂F (240.32)

Schmp.: 51.5 °C (52 °C)⁷⁴

Ber: C 69.9 H 8.81

R_fD: 0.69

Gef: C 70.30 H 8.93

V.6.4. Allgemeine Herstellung der Adpoc-Aminosäuren über Adpoc-F (6)

10 mmol der entsprechenden Aminosäure, 10 mmol NaHCO₃ und 10 mmol Na₂CO₃ werden in 100 ml Wasser/Dioxan (60:40) gelöst und auf -7 °C abgekühlt. Unter Rühren fügt man innerhalb 1 h tropfenweise eine Lösung von 19 mmol Adpoc-F in 20 ml Dioxan zu. Man rührt 2 h lang bei -7 °C und weitere 18 h bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Reaktion wird das Dioxan weitgehend im Vakuum abgedampft und nach 3-maliger Extraktion mit Petrolether (60-90; Petroletherphase verwerfen!) mit 200 ml EE überschichtet und mit 2 N Zitronensäure bis auf einen pH von 3.5 angesäuert. Nach Trennung der Phasen wird die wässrige Phase noch 2 mal mit EE ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen und das ölige Produkt in 10 ml Diethylether gelöst. Zu dieser Lösung tropft man so lange n-Hexan dazu, bis Kristallisation einsetzt. Man saugt die Kristalle ab, löst diese in 5-10 ml EE, gibt 50 ml Petrolether zu, und lässt mehrere Stunden bei Raumtemperatur stehen, während das Produkt auskristallisiert.

Es werden nun mit 6 die Adpoc-Derivate von Glycin, Leucin, Tryptophan, Arginin(Mtr), Serin(tBu), Tyrosin(tBu), Histidin(Trt), Prolin, Lysin(Boc), Arginin(Tip) und Histidin(Bum) synthetisiert.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Adpoc-L-Gly-OH (68)

Ansatz: 2.0 g (0.027 mol) H-L-Gly-OH $C_{16}H_{25}NO_4$ (295.38)
Ausbeute: 7.0 g **68** (88.88 % d. Th.) Ber.: C 65.06 H 8.53 N 4.74
Schmp.: 179 °C Gef.: C 64.93 H 8.59 N 5.00
Rf_D: 0.59

Adpoc-L-Leu-OH (69)

Ansatz: 2.0 g (0.015 mol) H-L-Leu-OH $C_{20}H_{33}NO_4$ (351.49)
Ausbeute: 4.4 g **69** (83.95 % d. Th.) Ber.: C 68.34 H 9.46 N 3.98
Schmp.: 176 °C Gef.: C 68.05 H 9.50 N 3.65
[α]_D²³: -12.0 °
Rf_D: 0.60

Adpoc-L-Trp-OH (70)

Ansatz: 2.0 g (0.0098 mol) H-L-Trp-OH $C_{25}H_{32}N_2O_4$ (424.54)
Ausbeute: 3.41 g **70** (82 % d. Th.) Ber.: C 70.53 H 7.60 N 6.60
Schmp.: 116 °C (116 °C)⁷⁴ Gef.: C 70.82 H 7.84 N 6.72
[α]_D²³: -6.8 °
Rf_D: 0.61

Adpoc-L-Arg(Mtr)-OH (12)

Ansatz: 2.0 g (0.00517 mol) H-L-Arg
(Mtr)-OH $C_{30}H_{47}N_4O_7S$ (607.72)
Ausbeute: 2.0 g **12** (63.74 % d. Th.) Ber.: C 59.38 H 7.70 N 9.23
Schmp.: 135 °C Gef.: C 58.88 H 7.49 N 8.79
[α]_D²³: -1.7 °
Rf_D: 0.61

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Adpoc-L-Ser(tBu)-OH (71)

Ansatz: 2.0 g (0.012 mol) H-L-Ser (tBu)-OH $C_{21}H_{35}NO_5$ (381.51)
Ber.: C 66.11 H 9.24 N 3.67
Ausbeute: 2.7 g **71** (58.8 % d. Th.) Gef.: C 65.43 H 9.01 N 3.55
Schmp.: 146-147 °C
 $[\alpha]_D^{24}$: +11.06 °
Rf_D: 0.60

Adpoc-L-Tyr(tBu)-OH (72)

Ansatz: 2.0 g (0.0084 mol) H-L-Tyr (tBu)-OH $C_{27}H_{39}NO_5$ (457.61)
Ber.: C 70.86 H 8.59 N 3.06
Ausbeute: 2.2 g **72** (57.7 % d. Th.) Gef.: C 71.08 H 8.88 N 3.29
Schmp.: 138.5 °C
 $[\alpha]_D^{24}$: +4.12 °
Rf_D: 0.61

Adpoc-L-His(Trt)-OH (16)

Ansatz: 2.0 g (0.005 mol) H-L-His(Trt)-OH $C_{39}H_{43}N_3O_4$ (617.78)
Ausbeute: 1.80 g **16** (58.5 % d. Th.) Ber.: C 75.82 H 7.01 N 6.80
Schmp.: 182 °C Gef.: C 75.48 H 6.76 N 6.85
 $[\alpha]_D^{23}$: +4.25 °
Rf_D: 0.62

Adpoc-L-Pro-OH (17)

Das kristalline Adpoc-L-Pro-OH (**17**) wird in 50 ml Essigsäureethylester gelöst. Dann gibt man 100 ml n-Hexan zu und lässt über Nacht bei Raumtemperatur stehen, während sich die farblosen Einkristalle langsam bilden.

Ansatz: 2.0 g (0.017 mol) H-L-Pro-OH $C_{19}H_{29}NO_4$ (335.44)
Ausbeute: 4.1 g **17** (70.68 % Th.) Ber.: C 68.03 H 8.71 N 4.17
Schmp.: 131 °C (130-131 °C)⁷⁴ Gef.: C 67.97 H 8.90 N 4.46

V. EXPERIMENTELLER TEIL

$[\alpha]_D^{23}$: -31.91 °

R_f_D : 0.62

V.6.5. Kristallstruktur und Analyse von Adpoc-L-Pro-OH (17)

Adpoc-Pro-OH (17) kristallisiert in der monoklinen Raumgruppe $P2_1$ mit den Gitterkonstanten $a = 946.2$ (1) pm, $b = 693.9$ (1) pm, $c = 1475.3$ (2) pm und dem Winkel $\beta = 107.85$ (1)°. Die kristallographischen Daten sowie die Angaben zur Röntgenstrukturanalyse sind in Tab. 10 zusammengestellt. In Tab. 11 sind die Lageparameter aufgeführt. Abb. 61 zeigt die Struktur. In Tab. 12 und 13 sind die Bindungslängen und -winkel aufgezeigt.

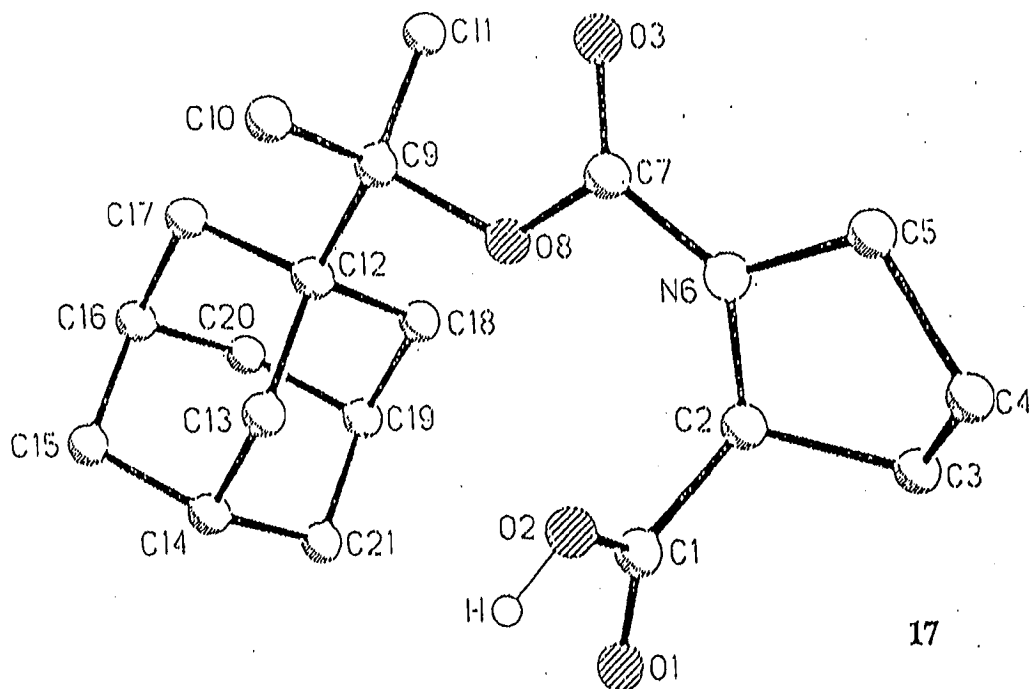


Abb. 61. Kristallstruktur von Adpoc-L-Pro-OH (17).

Tab. 10. Kristall(struktur)daten und Angaben zur Röntgenkristallstrukturanalyse von Adpoc-L-Pro-OH (17).

Summenformel	$C_{19}H_{29}NO_4$
Molekularmasse	335.43 g/mol
Kristallsystem	monoklin

V. EXPERIMENTELLER TEIL

F(000)	364
Kristallform	farblose Sechsecke
Kristallgrösse	0.2•0.2•0.15 mm
Raumgruppe	P2 ₁
Gitter-Parameter	a = 946.2 (1) pm b = 693.9 (1) pm c = 1475.3 (2) pm $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 107.85 (1)^\circ$ $\gamma = 90^\circ$
Zellvolumen	V = 922.0 (2) Å ³
Formeleinheit	Z = 2
Absorptionskoeffizient	$\mu = 0.676$
Methode der Absorptionskorrektur	empirisch
Min., max. Absorptionskorrektur	0.357/ 1.000
Dichte	1.208 g•cm ⁻³
Messtemperatur	296 K
Diffraktometer	ENRAF NONIUS CAD4
Strahlung	CuK α = 154.05 pm
Zahl der gemessenen Reflexe	3377
Zahl der beobachteten Reflexe	3329
Lösung der Struktur	direkte Methoden
Atomformfaktoren	internationale Tabellen
R	0.059
ω R	0.147

Als Programm wurde SHELXL-93 verwendet.

Die Atomparameter, die Bindungslängen und Bindungswinkel von Adpoc-Pro-OH (**17**) sind in Tab.11, 12 und 13 zu finden.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Tab. 11. Atomparameter und ihre festgelegten Standardabweichungen.

Atom	x	y	z
O(1)	-0.0014(2)	0.0875(2)	1.0051(1)
O(2)	0.1689(2)	0.2846(2)	0.9847(1)
O(3)	0.4521(2)	0.0368(3)	0.8492(1)
O(8)	0.2038(1)	-0.0151(2)	0.81935(8)
N(6)	0.3519(2)	-0.0047(2)	0.9680(1)
C(1)	0.1193(2)	0.1133(3)	0.9960(1)
C(2)	0.2272(2)	-0.0510(2)	1.0018(1)
C(3)	0.3032(2)	-0.1062(3)	1.1059(1)
C(4)	0.4427(2)	0.0150(4)	1.1336(1)
C(5)	0.4927(2)	0.0132(3)	1.0450(1)
C(7)	0.3454(2)	0.0091(3)	0.8757(1)
C(9)	0.1638(2)	-0.0030(4)	0.7160(1)
C(10)	0.2066(4)	0.1969(7)	0.6907(2)
C(11)	0.2453(3)	-0.1593(9)	0.6800(2)
C(12)	-0.0079(2)	-0.0352(3)	0.6837(1)
C(13)	-0.0866(3)	0.1243(5)	0.7214(2)
C(14)	-0.2551(3)	0.0848(8)	0.6908(2)
C(15)	-0.3144(4)	0.0875(8)	0.5812(2)
C(16)	-0.2413(3)	-0.0700(6)	0.5435(2)
C(17)	-0.0728(3)	-0.0370(5)	0.5745(2)
C(18)	-0.0452(3)	-0.2281(4)	0.7211(2)
C(19)	-0.2129(3)	-0.2612(7)	0.6898(3)
C(20)	-0.2717(4)	-0.2614(7)	0.5802(3)
C(21)	-0.2865(3)	-0.1030(1)	0.7286(2)

Tab. 12. Bindungsabstände [\AA].

Atom 1	Atom 2	Abstand
O1	C1	1.203(2)
O2	C1	1.307(2)
O3	C7	1.205(2)

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Atom 1	Atom 2	Abstand
O8	C7	1.353(2)
O8	C9	1.457(2)
N6	C2	1.451(2)
N6	C5	1.468(2)
N6	C7	1.347(2)
C1	C2	1.515(2)
C2	C3	1.531(2)
C3	C4	1.512(4)
C4	C5	1.520(3)
C9	C10	1.523(5)
C9	C11	1.517(5)
C9	C12	1.563(3)
C12	C13	1.531(3)
C12	C17	1.539(2)
C12	C18	1.530(3)
C13	C14	1.542(5)
C14	C15	1.541(4)
C14	C21	1.490(8)
C15	C16	1.489(5)
C16	C17	1.535(4)
C16	C20	1.495(6)
C18	C19	1.528(4)
C19	C20	1.541(5)
C19	C21	1.497(8)

Tab. 13. Bindungswinkel [°].

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel
C7	O8	C9	121.8(1)
C2	N6	C5	113.2(1)
C2	N6	C7	125.0(1)
C5	N6	C7	121.7(1)

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel
O1	C1	O2	122.6(2)
O1	C1	C2	121.9(2)
O2	C1	C2	115.4(1)
N6	C2	C1	114.8(1)
N6	C2	C3	102.7(1)
C1	C2	C3	110.2(1)
C2	C3	C4	103.6(2)
C3	C4	C5	103.8(2)
N6	C5	C4	102.6(2)
O3	C7	O8	126.2(2)
O3	C7	N6	123.8(2)
O8	C7	N6	110.0(1)
O8	C9	C10	107.8(2)
O8	C9	C11	109.1(2)
O8	C9	C12	102.9(1)
C10	C9	C11	111.4(3)
C10	C9	C12	112.7(2)
C11	C9	C12	112.5(2)
C9	C12	C13	111.2(2)
C9	C12	C17	111.3(2)
C9	C12	C18	110.4(2)
C13	C12	C17	107.7(2)
C13	C12	C18	108.0(2)
C17	C12	C18	107.9(2)
C12	C13	C14	109.9(2)
C13	C14	C15	108.4(3)
C13	C14	C21	110.7(3)
C15	C14	C21	110.7(4)
C14	C15	C16	108.7(3)
C15	C16	C17	109.8(3)
C15	C16	C20	110.7(3)
C17	C16	C20	108.8(3)

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel
C12	C17	C16	110.9(2)
C12	C18	C19	110.8(2)
C18	C19	C20	108.9(3)
C18	C19	C21	109.7(3)
C20	C19	C21	109.9(3)
C16	C20	C19	109.3(3)
C14	C21	C19	109.2(2)

Adpoc-L-Lys(Boc)-OH DCHA (18)

Ansatz: 2.0 g (0.0080 mol) H-L-Lys(Boc)-OH C₃₇H₆₅N₃O₆ (647.93)

Ausbeute: 3.628 g **18** (70 % d. Th.)

Ber.: C 68.59 H 10.11 N 6.48

Schmp.: 229 °C (228-229 °C)⁷⁶

Gef.: C 68.51 H 10.05 N 6.54

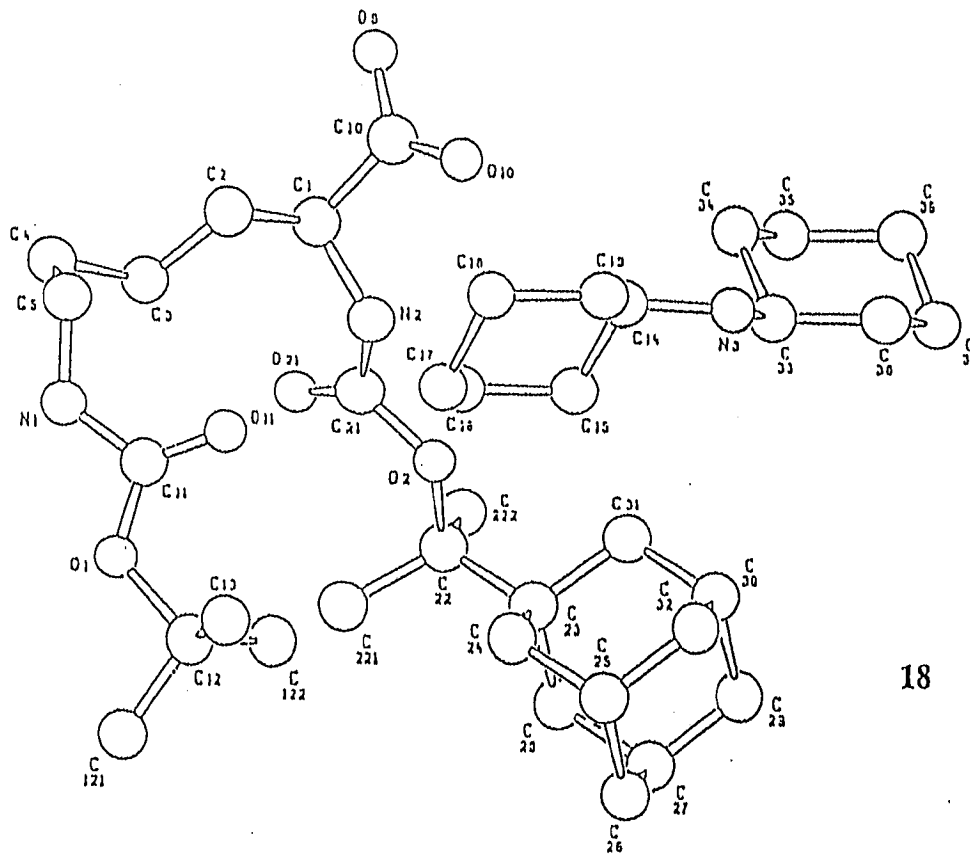
[α]_D²³: -2.8 ° (c = 1, MeOH)

R_{fD}: 0.46

Die Einkristalle bildeten sich nach mehrtägigem Stehenlassen in n-Hexan.

V.6.6. Kristallstruktur und Analyse von Adpoc-L-Lys(Boc)-OH•DCHA (18)

Adpoc-L-Lys(Boc)-OH•DCHA (**18**) kristallisiert in der orthorhombischen Raumgruppe P2₁2₁ mit den Gitterkonstanten a = 960.0(2) pm, b = 1889.3(1) pm, c = 2053.4(2) pm. In Tab. 15 sind die Lageparameter aufgeführt. Abb. 62 zeigt die Struktur. Tab. 14 zeigt die kristallographischen Daten. In den Tab. 16 und 17 findet man die Bindungslängen und -winkel.



18

Abb. 62. Kristallstruktur von Adpoc-L-Lys(Boc)-OH·DCHA (18).

Tab. 14. Kristall(structur)daten und Angaben zur Röntgenkristallstrukturanalyse von Adpoc-L-Lys(Boc)-OH·DCHA (18).

Summenformel	$C_{37}H_{65}N_3O_6$ g/mol
Molekularmasse	647.95
F (000)	1424
Kristallsystem	orthorhombisch
Kristallform	gelbliche Quader
Kristallgrösse	0.2•0.3•0.5 mm
Raumgruppe	$P2_12_12_1$
Gitterkonstanten	$a = 960.0$ (2) ppm $b = 1889.3$ (1) ppm $c = 2053.4$ (2) ppm
Zellvolumen	3724.4 \AA^3

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Dichte	1.155 g•cm ⁻³
Formeleinheit	4
Scans	ω
Absorptionskoeffizient μ	5.813
Methode der Absorptionskorrektur	Difabs, empirisch
Min., max. und durchschnittl.	0.6798/ 1.2426/ 0.9760
Extinktionskorrektur	nach Zachariasen
Bereich von h, k und l	0 \rightarrow 0 \rightarrow 22 - 24 \rightarrow 24
Standardreflexe	06 - 8/ 1-3-9/ 430
Zeitintervall der Intensitätskontrolle	1 h
Zahl der gemessenen Reflexe; θ -Bereich	6170/ 5-67 °
Zahl der beobachteten Reflexe	5297
Lösung der Struktur	direkte Methoden
Gewichtung	1/ σ
Verfeinerte Parameter	416
R	0.086
ωR	0.103
höchster Peak in abschliessender ΔF map	0.772
Messtemperatur	-60 °C
Atomformfaktoren.	internationale Tabellen

Tab. 15. Atomparameter und ihre festgelegten Standardabweichungen.

Atom	x	y	z	B(A2)
O1	0.2889(5)	0.4370(2)	0.1013(2)	4.1(1)
O2	0.7566(4)	-0.0400(2)	0.6213(2)	2.67(9)
O9	0.5892(5)	0.6751(2)	0.9614(2)	3.3(1)
O10	0.3593(4)	0.6750(2)	0.9469(2)	2.86(9)
O11	0.2976(7)	0.3640(3)	0.1896(3)	6.0(1)
O21	0.4740(5)	0.4520(2)	0.8526(3)	4.1(1)
N1	0.4009(7)	0.6218(3)	0.6296(3)	4.4(1)
N2	0.6317(6)	0.0575(2)	0.6250(3)	3.0(1)
N3	0.6318(5)	0.3025(2)	0.4906(2)	2.3(1)

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Atom	x	y	z	B(A2)
C1	0.4991(7)	0.5993(3)	0.8799(3)	2.7(1)
C2	0.5243(8)	0.6424(4)	0.8153(3)	3.6(1)
C3	0.5635(9)	0.5949(4)	0.7591(4)	4.5(2)
C4	0.6075(9)	0.6383(5)	0.6977(4)	5.0(2)
C5	0.4846(9)	0.6740(4)	0.6643(4)	5.0(2)
C10	0.4798(7)	0.6529(3)	0.9346(3)	2.5(1)
C11	0.2344(9)	0.3914(3)	0.1450(3)	3.9(2)
C12	0.4379(8)	0.4620(3)	0.1081(4)	3.6(2)
C13	0.5337(9)	0.3989(4)	0.1023(5)	5.9(2)
C14	0.5390(7)	0.2957(3)	0.4318(3)	2.3(1)
C15	0.5342(7)	0.3635(3)	0.3931(3)	3.2(1)
C16	0.4498(9)	0.3516(4)	0.3294(3)	4.6(2)
C17	0.5175(9)	0.2933(4)	0.2880(3)	4.1(2)
C18	0.4796(8)	0.7236(3)	0.1718(3)	3.5(1)
C19	0.6016(7)	0.2343(3)	0.3926(3)	3.0(1)
C21	0.3721(7)	0.4860(3)	0.8675(3)	2.9(1)
C22	0.7832(7)	-0.1170(3)	0.6235(3)	2.8(1)
C23	0.9442(7)	-0.1207(3)	0.6078(3)	2.4(1)
C24	1.0318(7)	-0.0808(4)	0.6592(3)	3.3(1)
C25	1.1887(7)	-0.0855(4)	0.6413(4)	3.6(2)
C26	1.2354(9)	-0.1629(4)	0.6417(4)	5.0(2)
C27	1.1523(9)	-0.2034(4)	0.5893(5)	5.2(2)
C28	0.9902(8)	-0.1987(3)	0.6053(4)	4.0(2)
C29	1.1750(1)	-0.1710(4)	0.5211(4)	5.6(2)
C30	1.1291(8)	-0.0916(4)	0.5240(4)	4.2(2)
C31	0.9715(7)	-0.0875(4)	0.5400(3)	3.3(1)
C32	1.2158(8)	-0.0525(3)	0.5741(4)	3.7(2)
C33	0.5936(7)	0.3596(3)	0.5395(3)	2.5(19)
C34	0.4442(7)	0.3491(3)	0.5646(3)	3.5(19)
C35	0.4129(9)	0.4033(4)	0.6196(4)	5.2(2)
C36	0.5222(9)	0.3974(5)	0.6750(4)	5.2(2)
C37	0.6686(9)	0.4092(4)	0.6482(4)	4.6(2)

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Atom	x	y	z	B(A2)
C38	0.7002(7)	0.3544(4)	0.5945(3)	3.5(1)
C121	0.4450(1)	0.5122(5)	0.0490(4)	6.1(2)
C122	0.4530(1)	0.5021(5)	0.1723(4)	5.8(2)
C221	0.7504(8)	-0.1433(4)	0.6929(3)	3.7(2)
C222	0.6916(8)	-0.1537(4)	0.5725(4)	4.1(2)

Tab. 16. Bindungsabstände [Å].

Atom 1	Atom 2	Abstand	Atom 1	Atom 2	Abstand
O1	C11	1.351(8)	C3	C4	1.560(1)
O1	C12	1.513(9)	C4	C5	1.520(1)
O2	C21	1.349(8)	C12	C13	1.520(2)
O2	C22	1.479(6)	C12	C121	1.540(2)
O9	C10	1.258(8)	C12	C122	1.530(2)
O10	C10	1.256(8)	C14	C15	1.508(8)
O11	C11	1.213(9)	C14	C19	1.533(8)
O21	C21	1.210(8)	C15	C16	1.550(1)
N1	C5	1.460(2)	C16	C17	1.540(2)
N1	C11	1.360(2)	C17	C18	1.554(9)
N2	C1	1.487(8)	C18	C19	1.550(1)
N2	C21	1.360(7)	C22	C23	1.580(9)
N3	C14	1.507(7)	C22	C221	1.541(9)
N3	C33	1.519(8)	C22	C222	1.533(9)
C1	C2	1.576(9)	C23	C24	1.544(9)
C1	C10	1.523(8)	C23	C28	1.539(8)
C2	C3	1.510(1)	C23	C31	1.551(8)
C24	C25	1.550(1)	C30	C32	1.520(2)
C25	C26	1.530(2)	C33	C34	1.538(9)
C25	C32	1.540(2)	C33	C38	1.528(9)
C26	C27	1.540(1)	C34	C35	1.550(2)
C27	C28	1.590(1)	C35	C36	1.550(1)
C27	C29	1.540(1)	C36	C37	1.530(1)

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Atom 1	Atom 2	Abstand	Atom 1	Atom 2	Abstand
C29	C30	1.560(2)	C37	C38	1.540(1)
C30	C31	1.560(2)			

Tab. 17. Bindungswinkel [°].

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel	Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel
C11	O1	C12	120.3(5)	N3	C14	C15	111.6(5)
C21	O2	C22	120.8(4)	N3	C14	C19	104.8(5)
C5	N1	C11	122.5(7)	C15	C14	C19	112.2(5)
C1	N2	C21	120.9(5)	C14	C15	C16	109.7(6)
C14	N3	C33	116.6(4)	C15	C16	C17	110.4(7)
N2	C1	C2	110.3(5)	C16	C17	C18	108.8(5)
N2	C1	C10	107.5(5)	C17	C18	C19	110.6(5)
C2	C1	C10	107.3(5)	C14	C19	C18	110.5(5)
C1	C2	C3	112.0(5)	O2	C21	O21	126.2(5)
C2	C3	C4	111.9(6)	O2	C21	N2	108.5(5)
C3	C4	C5	112.8(7)	O21	C21	N2	125.4(7)
N1	C5	C4	110.4(6)	O2	C22	C23	101.9(4)
O9	C10	O10	124.8(6)	O2	C22	C221	108.1(5)
O9	C10	C1	116.4(5)	O2	C22	C222	109.0(5)
O10	C10	C1	118.8(5)	C23	C22	C221	112.0(5)
O1	C11	O11	125.1(7)	C23	C22	C222	113.7(5)
O1	C11	N1	109.4(6)	C221	C22	C222	111.7(5)
O11	C11	N1	125.1(7)	C22	C23	C24	111.8(5)
O1	C12	C13	108.8(6)	C22	C23	C28	109.2(5)
O1	C12	C121	99.3(6)	C22	C23	C31	109.4(5)
O1	C12	C122	108.8(6)	C24	C23	C28	109.5(5)
C13	C12	C121	113.4(7)	C24	C23	C31	108.9(5)
C13	C12	C122	113.7(7)	C28	C23	C31	108.0(5)
C121	C12	C122	111.7(6)	C23	C24	C25	109.8(5)
C24	C25	C26	109.8(6)	C24	C25	C32	110.7(6)

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel	Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel
C26	C25	C32	110.1(6)	C23	C31	C30	109.5(5)
C25	C26	C27	108.6(6)	C25	C32	C30	108.6(6)
C26	C27	C28	109.5(7)	N3	C33	C34	110.8(5)
C26	C27	C29	111.2(6)	N3	C33	C38	106.4(5)
C28	C27	C29	107.8(7)	C34	C33	C38	111.6(5)
C23	C28	C27	109.9(6)	C33	C34	C35	109.8(5)
C27	C29	C30	107.7(6)	C34	C35	C36	110.7(6)
C29	C30	C31	109.5(7)	C35	C36	C37	110.4(6)
C29	C30	C32	109.7(6)	C36	C37	C38	109.9(6)
C31	C30	C32	111.5(6)	C33	C38	C37	110.7(6)

Herstellung von N^α-Benzyloxycarbonyl-N⁰-2,4,6-triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginin (Z-Arg(Tip)-OH)

4.6 g Z-Arg-OH werden in 100 ml Aceton suspendiert. Dann gibt man unter Rühren 2.5 g NaOH in 15 ml Wasser zu. Wenn alles gelöst ist, kühlt man auf 0 °C ab und gibt innerhalb 30 min langsam 10 g 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonylchlorid in 30 ml Aceton dazu. Man lässt weitere drei h bei 0 °C und 4-5 h bei Raumtemperatur rühren. Danach entfernt man das Aceton im Vakuum und verdünnt den Rückstand mit 100 ml Wasser. Man schüttelt mit Ether dreimal aus, und überschichtet mit Essigester. Unter Kühlung säuert man mit 3 N HCl auf pH 2.5 an, trennt die organische Phase ab, wäscht diese mit Wasser und trocknet über Na₂SO₄. Das Produkt kristallisiert in abs. Diethylether/n-Hexan aus.

Ausbeute: 4.10 g (47.8 % d. Th.)

C₂₉H₄₂N₄O₆S (574.74)

R_{fD}: 0.60

Ber.: C 60.60 H 7.36 N 9.75

Schmp.: 132 °C (133 °C)⁸⁹

Gef.: C 61.25 H 8.05 N 9.20

Herstellung von N^α-2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginin (H-L-Arg(Tip)-OH)

4.0 g Z-Arg(Tip)-OH und 20 % HBr/Essigsäure (50 ml) werden 1 h bei Raumtemperatur gerührt, und nach beendeter Reaktion im Vakuum getrocknet. Das Produkt fällt sirupartig an.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Ausbeute: 1.85 g (60.7 % d. Th.)

C₂₁H₃₆N₄O₄S (440.60)

Schmp.: 213-215 °C

Herstellung von N^α-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-N^ω-2,4,6-triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginin (Adpoc-L-Arg(Tip)-OH) (**11**)

Die Herstellung erfolgt nach üblicher Methode.

Ansatz: 1.80 g (0.00408 mol) N^α-2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonyl-L-arginin (H-L-Arg(Tip)-OH).

Ausbeute: 1.96 g **11** (72.66 % d. Th.)

C₃₅H₅₆N₄O₆S (660.91)

Schmp.: 165 °C

Ber.: C 63.60 H 8.35 N 8.47

[α]_D²³: -2.3 °

Gef.: C 63.15 H 8.78 N 9.05

R_{fD}: 0.60

Herstellung von N^α-[1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl]-N-(π-tert-butyloxymethyl-L-histidin (Adpoc-L-His(Bum)-OH) (**15**)

Ansatz: 1.0 g (0.004 mol) H-L-His(Bum)-OH

C₂₅H₃₉N₃O₅ (461.59)

Ausbeute: 1.2 g **15** (63 % d. Th.)

Ber.: C 65.05 H 8.50 N 9.10

Schmp.: 177-178 °C

Gef.: C 64.63 H 9.03 N 8.70

[α]_D²³: +3.89 °

R_{fD}: 0.60

V.6.7. Stabilitätsuntersuchung einer geschützten Aminosäure am 4-Methoxy-4'-(γ-carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Harz (D-1600)

Es wurde zunächst ein Stabilitätstest einer Fmoc-geschützten Aminosäure, dem Glycinderivat, am 4-Methoxy-4'-(γ-carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Harz (D-1600) gegen 3 % TFA durchgeführt. Der Gehalt des am Harz gebundenen Glycins wird durch UV-Bestimmung von Fmoc-Gly-NH₂ bei einer Wellenlänge von λ = 254 nm ermittelt. Das Ergebnis zeigt Abb. 63 mit Tab. 18.

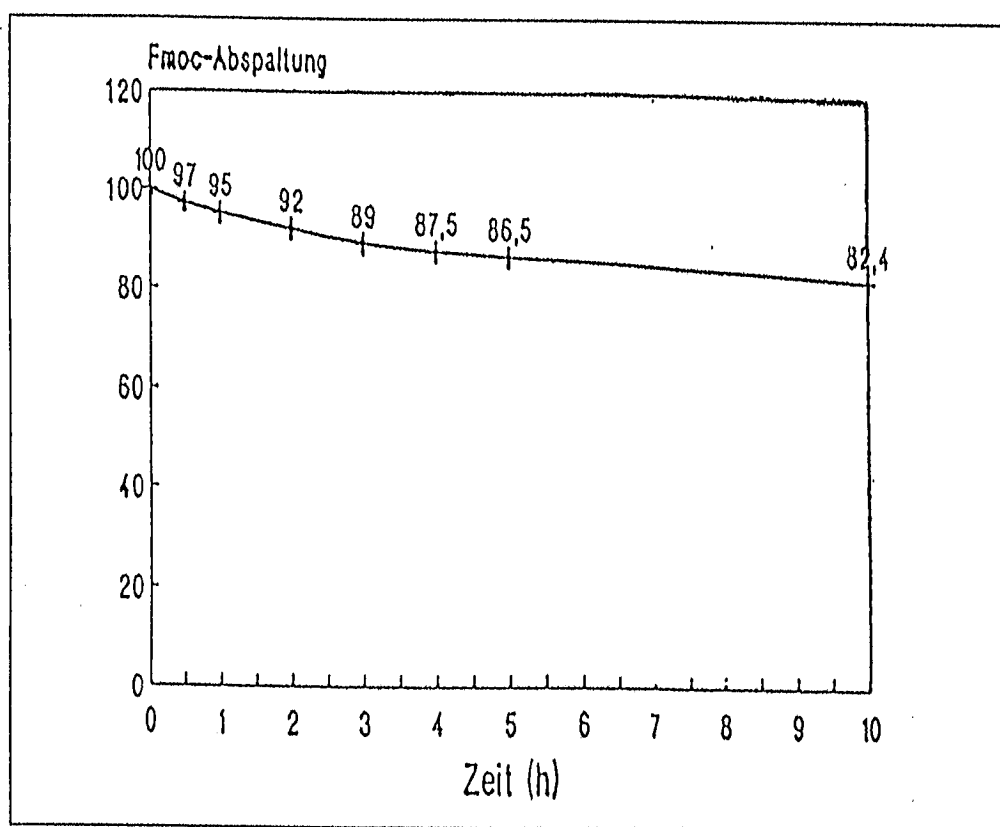


Abb. 63. Stabilität von Fmoc-L-Gly-OH am 4-Methoxy-4'-(γ -carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Anker (D-1600) gegen 3 % TFA/DCM.

Tab. 18. Relativer am Harz gebundener Fmoc-L-Gly-Gehalt nach Behandlung mit 3 % TFA/DCM (durch UV-Messung bestimmt).

Zeit (h)	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	10.0
D-1600-Harz	100	97	95	92	89	87.5	86.5	82.4

V.6.8. Festphasensynthese von LH-RH (19) am 4-Methoxy-4'-(γ -carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Harz mit Adpoc-Strategie (Adpoc-Synthese 1 und 2)

Adpoc-Synthese 1

Bei der Adpoc-Synthese 1 verwendet man 0.40 g (0.22 mmol) Harz und jeweils 0.6 mmol Adpoc-Aminosäuren. Dabei werden die Adpoc-geschützten Aminosäuren in folgender Reihenfolge eingesetzt: Adpoc-Gly-OH (68), Adpoc-Pro-OH (17), Adpoc-Arg(Mtr)-OH (12), Adpoc-Leu-OH (69), Adpoc-Tyr(tBu)-OH (72), Adpoc-Ser(tBu)-OH (71), Adpoc-Trp-OH (70), Adpoc-His(Trt)-OH (16) und pGlu-OTcp. Die Operationen erfolgen nach Tab. 19.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Nach der Synthese werden 675 mg LH-RH-A 1-Harz erhalten.

Adpoc-Synthese 2

Bei der Adpoc-Synthese 2 werden 0.40 g (0.22 mmol) Harz und jeweils 0.6 mmol Adpoc-Aminosäuren eingesetzt: Adpoc-Gly-OH (**68**), Adpoc-Pro-OH (**17**), Adpoc-Arg(Mtr)-OH (**12**), Adpoc-Leu-OH (**69**), Adpoc-Tyr(tBu)-OH (**72**), Adpoc-Ser(tBu)-OH (**71**), Adpoc-Trp-OH (**70**), Adpoc-His(**Bum**)-OH (**15**) und p-Glu-OTcp. Die Operationen erfolgen nach Tab. 19.

Nach der Synthese erhält man 680 mg LH-RH-A 2-Harz.

Tab. 19. Adpoc-Synthese-Protokoll für LH-RH (**19**), Synthesen 1 und 2 für einen $6 \cdot 10^{-4}$ molaren Ansatz und 0.4 g ($2.2 \cdot 10^{-4}$ mol) Harz mit einer Beladung von $5.2 \cdot 10^{-4}$ mol/1 g Harz.

Stufe	Prozess	Reagenzien/Lösungsmittel	Volumen (ml)	Zeit (min)
1	Waschen	DCM	8	2
2	Adpoc-Abspaltung	3 % TFA/DCM	8	5
3	Adpoc-Abspaltung	3 % TFA/DCM	8	25
4	Waschen	DCM (2 mal)	2•8	2•2
5	Waschen	5 % DIEA/DCM	8	5
6	Waschen	5 % DIEA/DCM	8	5
7	Waschen	DMF (2 mal)	2•8	2•2
8	Waschen	MeOH (2 mal)	2•8	2•2
9	Waschen	DCM (3 mal)	3•8	3•2
10	AS-Aktivierung	2.5 Äquiv. Adpoc-AS + 2.5 Äquiv. HOBt + 2.75 Äquiv. DCCI + 4 ml DCM + 2 ml DMF	6	
11	Kupplung (bei Raumtemperatur)	Aktivierte Adpoc-AS		150*
12	Waschen	DMF	8	2
13	Waschen	2-Propanol	8	2
14	Waschen	DMF	8	2
15	Waschen	DCM	8	2

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Stufe	Prozess	Reagenzien/Lösungsmittel	Volumen (ml)	Zeit (min)
16		Wiederholung der Stufen 13-15	3•8	3•2
17	Ninhydrin-Test ⁵²	Ninhydrin/Phenol/KCNaq/Ethanol/Pyridin	≈ 0.1	5

* Die letzte Kupplung wird 3 h lang mit 3 Äquiv. pGlu-OTcp¹³¹ (Synthese in Analogie zum entsprechenden Pentachlorphenylester) + HOBt für die Adpoc-Synthese 1 und 0.5 h für die Adpoc-Synthese 2 durchgeführt.

Der Ninhydrin-Test nach Kaiser⁵² dient zur Detektion freier terminaler Aminogruppen. Dieser empfindliche Farbttest, der auf der Reaktion von Ninhydrin mit primären Aminen unter Bildung von Ruhemanns Purpur beruht, wird bei Festphasensynthesen eingesetzt, wobei das Ninhydrinreagens folgendermassen hergestellt wird:

Lösung I:	500 mg Ninhydrin in 10 ml EtOH
Lösung II:	80 g Phenol in 20 ml EtOH
Lösung III:	0.4 ml 0.001 mol KCNaq in 20 ml Pyridin

Dem zu untersuchenden Polymeren (ca. 1 mg) werden in einem Reagensglas von diesen drei Lösungen jeweils 3 Tropfen zugegeben. Anschliessend erfolgt eine gute Durchmischung der Probe, die danach im Trockenschrank 5 min lang bei 120 °C erhitzt wird.

Nach dem Peptidaufbau werden die Harze folgendermassen abgespalten und aufgearbeitet: Nach dem Waschen mit DMF, MeOH und DCM wird das LH-RH-Harz mit 100 ml TFA/Thioanisol/EDT/Anisol (90/60/3/1) bei Raumtemperatur 6 h gerührt. Das Harz wird abfiltriert und dreimal mit 10 ml Essigsäure gewaschen. Man engt die vereinigten Filtrate im Vakuum ein, löst den Rückstand in 1.5 ml Essigsäure und tropft 30 ml abs. Diethylether dazu, während sich ein Präzipitat bildet, welches filtriert und viermal mit abs. Diethylether gewaschen wird. Man löst das Rohprodukt in 20 ml Wasser und lyophilisiert.

- Adpoc-Synthese 1

Die Ausbeute beträgt 125 mg LH-RH aus 400 mg LH-RH-A 1-Harz (86.45 % d. Th.) bezogen auf die Harzbeladung von 0.49 mmol/1 g Harz.

Das rohe Abspaltungsprodukt der Adpoc-Synthese 1 (s. HPL-Chromatogramm, Abb. 15 A, Kapitel IV.10.2.), enthält zwei Hauptprodukte im Verhältnis 52/40. Es handelt sich bei der Substanz mit RT = 18.23 min um das gewünschte LH-RH (**19**). Die zweite Substanz (RT = 19.01) wird durch präparative HPLC gereinigt. Die Struktur der zweiten Substanz wird durch FAB-MS-Untersuchung (Abb. 16) aufgeklärt: es wurden zwei pGlu-Reste anstelle von einem gekuppelt, was zu der Verbindung LH-RH (2-pGlu) (**20**) führt. Ein weiterer Beweis für das Vorhandensein von zwei p-Glu-Resten (die Vermutung, dass die Schutzgruppe des Imidazols an die Seitenkette von Histidin durch 3 % TFA/DCM abgespalten und die freie Imidazolgruppe bei der anschliessenden Kupplung durch pGlu-OTcp acetyliert wird) wurde folgender Versuch durchgeführt: 20 mg LH-RH-A 1-Harz werden mit 3 % TFA/DCM 1h lang behandelt. Nach dem Neutralisieren wird das Harz mit 5 Äquiv. pGlu-OTcp/HOBt versetzt. Nach 24 h wird das Harz abfiltriert und gewaschen. Das so erhaltene Harz wird wieder mit Abspaltungsreagenzien behandelt und analysiert. Das Ergebnis der HPLC-Untersuchung zeigt einen deutlichen Anstieg des Gehalts von LH-RH (2-pGlu) (**20**), (Abb. 15 B).

- Adpoc-Synthese 2

Die Ausbeute beträgt 120 mg LH-RH (**19**) aus 400 mg LH-RH-A 2-Harz (83.0 % d. Th.), bezogen auf die Harzbeladung von 0.52 mmol/1 g Harz.

V.6.9. Festphasensynthese von LH-RH (**19**) am 4-Methoxy-4'-(γ -carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Harz mit der Fmoc-Strategie

Fmoc-Synthese

Bei der Fmoc-Synthese werden 0.55 g (0.30 mmol) Harz und 0.9 mmol Fmoc-AS eingesetzt. Die Fmoc-geschützten Aminosäuren werden in folgender Reihenfolge verwendet: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Arg(Mtr)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-His(Trt)-OH und p-Glu-OTcp. Die Operationen erfolgen nach Tab. 20.

Man erhält 940 mg LH-RH-F-Harz.

Die Ausbeute beträgt 130 mg LH-RH (**19**) aus 400 mg LH-RH-F-Harz (99.6 % d. Th.), bezogen auf die Harzbeladung von 0.49 mmol/1 g Harz.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Tab. 20. Fmoc-Synthese-Protokoll von LH-RH (**19**) für einen $9 \cdot 10^{-4}$ molaren Ansatz und 0.55 g ($3 \cdot 10^{-4}$ mol) Harz mit einer Beladung von $4.9 \cdot 10^{-4}$ mol/l g Harz.

Stufe	Prozess	Reagenzien/Lösungsmittel	Volumen (ml)	Zeit (min)
1	Waschen	DMF	8	2
2	Fmoc-Abspaltung	50 % Piperidin/DMF	8	5
3	Fmoc-Abspaltung	50 % Piperidin/DMF	8	25
4	Waschen	DMF (3 mal)	3•8	3•2
5	Waschen	MeOH (3 mal)	2•8	2•2
6	Waschen	DCM (3 mal)	3•8	3•2
7	AS-Aktivierung	Fmoc-AS (2.5 Äquiv.) + HOBt (2.5 Äquiv.) + DDCI (2.75 Äquiv.) + DCM (4 ml); + DMF (2 ml)	6	
8	Kupplung (bei Raumtemperatur)	Aktivierte Fmoc-AS		150*
9	Waschen	DMF (2 mal)	8	2•2
10	Waschen	2-Propanol	8	2
11	Waschen	DMF	8	2
12	Waschen	DCM	8	2
13		Wiederholung der Stufen 10-12	3•8	3•2
14	Ninhydrin-Test ⁵²	Ninhydrin/Phenol/KCNaq/Ethanol/Pyridin	≈ 0.1	5

* Die letzte Kupplung wird mit 3 Äquiv. p-Glu-OTcp¹³¹ (Synthese in Analogie zum entsprechenden Pentachlorphenylester) + HOBt 3 h lang durchgeführt.

Nach dem Peptidaufbau wird das Harz wie bei den Adpoc-Synthesen abgespalten und aufgearbeitet.

V.6.10. Darstellung von [2-Adamantyl(1)-propyl(2)-phenyl-carbonat] (Adpoc-OPh) (**10**)

Eine Mischung aus 19.4 g (0.1 mol) 2-Adamantyl(1)-propanol(2) (**4**), 100 ml Dichlormethan und 12.0 ml Pyridin werden auf -7 °C abgekühlt. Innerhalb von 30 Minuten gibt man eine

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Lösung von 15.2 ml Chlorameisensäurephenylester (**9**) in 50 ml Dichlormethan dazu. Die während des Zutropfens gebildete Fällung geht nach Rühren über Nacht bei 0 °C wieder in Lösung. Man giesst das Reaktionsgemisch auf Eis, verdünnt mit 100 ml Dichlormethan und trennt die organische Phase ab. Man wäscht dreimal mit Wasser, trocknet anschliessend über Natriumsulfat und zieht das Lösungsmittel bei Raumtemperatur im Vakuum ab.

Ausbeute: 8.0 g 10 (25.5 % d.Th.)	$C_{20}H_{26}O_3$ (314.43)
Schmp.: 71.5 °C (72 °C) ⁷⁴	Ber.: C 76.40 H 8.33
Rf _D : 0.65	Gef.: C 76.71 H 8.63

V.6.11. Allgemeine Herstellung der Adpoc-Aminosäuren über das Adpoc-phenylcarbonat (**10**)

Unter leichtem Erwärmen löst man 10 mmol der entsprechenden Aminosäure in 4.6 ml einer 40%igen Triton-B-Lösung (methanolische Lösung). Das Lösungsmittels wird im Vakuum abgezogen und der Rückstand durch zweimalige azeotrope Destillation mit je 50 ml Dimethylformamid vom Wasser befreit. Man nimmt den auf 50 °C erwärmten Rückstand in 30 ml Dimethylformamid auf, versetzt mit 12 mmol Adpoc-OPh (**10**) und lässt die Reaktionsmischung 3 Stunden lang bei 50 °C rühren. Zur Aufarbeitung wird zwischen Wasser und Diethylether/Petrolether (1:1) verteilt, und die abgetrennte wässrige Phase bei 0 °C mit 1 N Zitronensäurelösung angesäuert (pH 2-3). Es wird mit Diethylether 3-4 mal extrahiert. Nach üblichem Waschen und Trocknen der Etherauszüge wird im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der verbleibende Rückstand wird entweder direkt oder nach Überführen in das DCHA-Salz zur Kristallisation gebracht.

Mit **10** werden die beiden Aminosäuren Glycin und Leucin umgesetzt.

Adpoc-L-Gly-OH (**68**)

Ansatz: 2.0 g (0.027 mol) H-L-Gly-OH	$C_{16}H_{25}NO_4$ (295.38)
Ausbeute: 1.35 g 68 (17 % d. Th.)	Ber.: C 65.06 H 8.53 N 4.74
Schmp.: 179 °C (180 °C) ⁷⁴	Gef.: C 64.82 H 8.37 N 5.02
Rf _D : 0.59	

Adpoc-L-Leu-OH (69)

Ansatz: 2.0 g **69** (0.015 mol) H-L-Leu-OH C₂₀H₃₃NO₄ (351.49)
 Ausbeute: 0.81 g (15 % d. Th.) Ber.: C 68.34 H 9.46 N 3.98
 Schmp.: 176 °C (176 °C)⁷⁴ Gef.: C 68.76 H 9.89 N 4.16
 R_{fD}: 0.60
 [α]_D²³: -12.3 °

V.7. Festphasensynthese von Leucin-Enkephalinamid (48) am 4-Methoxy-4'--(γ-carboxy-propyloxy)-benzhydrylamin-Harz unter Verwendung der säurelabilen p-Bumeoc-N^α-Aminoschutzgruppe

V.7.1. Darstellung der N^α-[1-(4-tert-Butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl]- (p-Bumeoc-) Aminosäurederivate

V.7.1.1. Darstellung von 4-tert-Butylbenzoesäuremethylester¹⁰³ (26)

50.0 g (0.28 mol) 4-tert-Butylbenzoesäure (**24**) und 42.82 g (0.36 mol) Thionylchlorid werden 4 h am Rückfluss gekocht. Das überschüssige Thionylchlorid wird nach beendeter Reaktion am Rotationsverdampfer abgezogen. Danach versetzt man mit 100 ml abs. Methanol und lässt 4 h am Rückfluss kochen. Man lässt über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Das überschüssige Methanol wird im Vakuum eingengt. Das schwach gelbe Öl wird in Diethylether aufgenommen und zweimal mit Wasser neutral gewaschen. Man trocknet über Natriumsulfat und zieht das Lösungsmittel im Vakuum ab. Die Fraktion bei 98-100 °C wurde verwendet.

Ausbeute: 49.6 g **26** (92 % d. Th.)
 K_p.: 98-100 °C (K_{p5}: 110-112 °C)¹³²
 R_{fD}: 0.71
 C₁₂H₁₆O₂ (192.256)

V.7.1.2. Darstellung von 2-(4-tert-Butylphenyl)-2-propanol (p-Bumeoc-OH)¹⁰² (27)

Man gibt 24.375 g (1 mol) Magnesiumspäne in 500 ml abs. Diethylether und startet die Grignard-Reaktion, indem zunächst 2 ml CH₃I zugegeben werden. Der Rest von 1 Mol CH₃I in 300 ml abs. Diethylether wird schliesslich so zugetropft, dass die Reaktionsmischung

V. EXPERIMENTELLER TEIL

schwach siedet. Man lässt so lange reagieren, bis fast alles Magnesium gelöst ist (2-3 h). Danach gibt man 49.0 g (0.255 mol) 4-tert-Butylbenzoesäuremethylester (**26**) in 100 ml abs. Diethylether so zu, dass die Lösung ständig siedet. Man lässt ca. 20 h bei Raumtemperatur rühren. Dann giesst man auf Eis und säuert mit fester Zitronensäure auf pH 4.0 an. Die organische Phase wird abgetrennt, und dreimal mit Wasser gewaschen. Nach Filtrieren und Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man das schwach gelbe Öl, das sofort auskristallisiert. Es entstehen lange weisse Nadeln.

Ausbeute: 42.84 g 27 (87.4 % d. Th.)	$C_{13}H_{20}O$ (192.30)
Schmp.: 78 °C (79 °C) ¹³³	Ber.: C 81.19 H 10.48
Rf _D : 0.70	Gef.: C 80.72 H 11.32

V.7.1.3. Darstellung von Fluorameisensäure-[1-(4-tert-butylphenyl)-1-methylethyl]ester (p-Bumeoc-F) (**29**)

30 g (0.156 mol) 2-(4-tert-butylphenyl)-2-propanol (**27**) werden unter starkem Rühren (KPG-Rührer) in 500 ml abs. Diethylether gelöst und mit 22 ml (0.156 mol) Triethylamin versetzt. Man kühlt mit Ethanol/Trockeneis-Kälte-Mischung auf -55 °C. In diese Lösung wird SO₃-freies Carbonylchloridfluorid, welches in situ^{106, 107} aus 200 ml Oleum (65 %) und 160 ml (0.94 mol) Trichlorfluormethan (Frigen 11), einkondensiert. Nach Beendigung der Gasentwicklung lässt man das Gemisch auf -10 °C erwärmen. Das Reaktionsgemisch wird dann durch Einleiten von Stickstoff entgast, und so von restlichem Flourphosgen (**5**) befreit. Man stellt auf einen pH-Wert von 8.0 ein, indem weiteres Triethylamin zugegeben wird, und rührt weitere 10 h. Ausgefallenes Triethylammoniumchlorid wird abfiltriert, der Rückstand mit abs. Diethylether gewaschen und die vereinigten Filtrate im Vakuum bei 0 °C eingeeengt. Man erhält ein gelbliches Öl, das sich bei Raumtemperatur rasch zersetzt.

Ausbeute: 123.91 g 29 (52 % d. Th.)	$C_{14}H_{19}O_2F$ (238.3)
Rf _D : 0.74	Ber.: C 70.56 H 8.03
	Gef.: C 71.07 H 8.87

Anhand der Aminosäuren Glycin und Leucin wurde getestet, ob sich p-Bumeoc-F (**29**) als Einführungsreagenz für die p-Bumeoc-Gruppe eignet. Die Einführung wird analog V.6.6. durchgeführt.

V.7.1.4. Allgemeine Herstellung der p-Bumeoc-Aminosäuren über p-Bumeoc-F (29)

Es werden 10 mmol der entsprechenden Aminosäure, 10 mmol NaHCO₃ und 10 mmol Na₂CO₃ in 100 ml Wasser/Dioxan (60:40) gelöst und auf -7 °C abgekühlt. Innerhalb einer Stunde fügt man unter Rühren langsam eine Lösung von 20 mmol p-Bumeoc-F (29) in 20 ml Dioxan zu. Man lässt 2 h bei -7 °C und noch 15 h bei Raumtemperatur rühren. Nach Beendigung der Reaktion wird das Dioxan weitgehend im Vakuum abgedampft und dreimal mit Petrolether (60-90) extrahiert (Die Petroletherphase wird verworfen!). Dann überschichtet man mit 200 ml und säuert mit 2 N Zitronensäure bis auf einen pH-Wert von 3.5 an. Nach Phasentrennung wird die wässrige Phase zweimal mit EE ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum und löst das ölige Produkt in n-Hexan und versetzt mit 2 ml DCHA, wobei bereits eine Kristallisation einsetzt.

p-Bumeoc-L-Gly-OH•DCHA (36)

Ansatz: 1.0 g (0.0133 mol) H-L-Gly-OH	C ₂₈ H ₄₆ N ₂ O ₄ (474.68)		
Ausbeute: 3.49 g 36 (55.6 % d. Th.)	Ber.:	C 70.85	H 9.76 N 5.90
Schmp.: 130.0 °C	Gef.:	C 71.32	H 9.41 N 5.65
Rf _D : 0.46			

p-Bumeoc-L-Leu-OH (35)

Ansatz: 1.0 g (0.0076 mol) H-L-Leu-OH	C ₂₀ H ₃₁ NO ₄ (349.467)		
Ausbeute: 1.81 g 35 (68 % d. Th.)	Ber.:	C 68.74	H 8.94 N 4.00
Schmp.: 92.5 °C	Gef.:	C 68.91	H 8,66 N 3.88
Rf _D : 0.60			
[α] _D ²³ : +3.2 °			

V.7.1.5. Darstellung von 1-[2-tert-Butylphenyl-(4)-propyl-(2)]-phenylcarbonat (28)

Zu einer Mischung von 19.2 g 2-[4-tert-butylphenyl]-propanol-(2) (27) (0.1 mol), 100 ml Dichlormethan und 12 ml Pyridin gibt man bei -5 °C innerhalb 30 Minuten eine Lösung von 15.2 ml Chlorameisensäurephenylester (9) in 50 ml Dichlormethan, nach dessen Zugabe ein dicker weisser Niederschlag ausfällt, der sich nach Rühren über Nacht grösstenteils wieder auflöst. Das Reaktionsgemisch wird auf wenig Eis gegossen; nach Verdünnen mit 100 ml Dichlormethan wird die organische Phase abgetrennt, zweimal mit 5%iger Salzsäure, dann dreimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und letztlich bei 30 °C

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Badtemperatur im Vakuum eingedampft. Das Öl kristallisiert schnell aus. Reinigung erfolgt durch schnelles Waschen mit Methanol.

Ausbeute: 24.88 g **28** (79.67 % d. Th.)

C₂₀H₂₄O₃ (312.406)

Schmp.: 72-73 °C

Ber.: C 76.89 H 7.74

R_{fD}: 0.72

Gef.: C 77.49 H 8.07

V.7.1.6. Darstellung der N^α-[1-(4-tert-Butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl]- (p-Bumeoc-)geschützten Aminosäuren

1. Methode:

10 mmol der Aminosäure werden in 4.6 ml Benzyltrimethylammoniumhydroxidlösung (Triton-B, 40 % in Methanol) bei 50 °C gelöst. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand zur Entfernung von Wasser zweimal mit je 20 ml Dimethylformamid destilliert. Der so erhaltene Rückstand wird bei Raumtemperatur in 30 ml Dimethylformamid gelöst, mit 12 mmol [2-tert-Butyl-phenyl-(4)-propyl-(2)]-phenylcarbonat (**28**) versetzt und über Nacht gerührt.

Anschliessend verteilt man zwischen Diethylether und Wasser und bringt die wässrige Phase bei 0 °C auf einen pH-Wert von 3.0 bis 3.5. Man verwendet dazu eine 5%ige Zitronensäurelösung. Es wird mehrmals mit EE extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und anschliessend über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in n-Hexan gelöst und mit 2 ml Dicyclohexylamin versetzt. Die Kristallisation beginnt bereits beim Zutropfen des DCHA.

Eine Umkristallisation erfolgt aus Methanol/n-Hexan.

Die freien p-Bumeoc-N^α-Aminosäuren erhält man durch Waschen der DCHA-Salze mit 5%iger Zitronensäure. Die meisten Derivate kristallisieren bereits beim Abziehen des Lösungsmittels aus.

2. Methode:

10 mmol der Aminosäure, 10 mmol NaHCO₃, 10 mmol Na₂CO₃ werden in 50 ml Dioxan/Wasser (1:1) gelöst oder suspendiert. Dann werden 15 mmol [2-tert-Butylphenyl-(4)-propyl-(2)-phenylcarbonat (**28**) in 20 ml abs. Dioxan bei Raumtemperatur zugetropft. Man lässt über Nacht rühren. Nach Beendigung der Reaktion wird das Dioxan im Vakuum

V. EXPERIMENTELLER TEIL

abgezogen. Dann wird mit n-Hexan dreimal extrahiert. Die wässrige Phase wird mit EE überschichtet und analog Methode 1 weiterverarbeitet.

Die p-Bumeoc-geschützten Aminosäuren werden ausschliesslich nach der ersten Methode dargestellt.

p-Bumeoc-L-Pro-OH•DCHA (38)

Ansatz : 1.0 g (0.0087 mol) H-L-Pro-OH $C_{31}H_{50}N_2O_4$ (514.74)
Ausbeute: 1.95 g **38** (43.7 % d. Th.) p-Bumeoc- Ber.: C 72.33 H 9.79 N 5.44
L-Pro-OH•DCHA Gef.: C 71.38 H 9.45 N 5.01
Schmp.: 151.5 °C
Rf_D: 0.49
[α]_D²³: +10.7 °

p-Bumeoc-L-Pro-OH (45)

Ansatz: 1.0 g (0.0019 mol) p-Bumeoc-L-Pro-OH•DCHA (**38**) mit 5%iger Zitronensäure waschen.
Ausbeute: 0.53 g **45** (81.7 % d. Th.) $C_{19}H_{27}NO_4$ (333.425)
Schmp.: 71.5 °C Ber.: C 68.44 H 8.16 N 4.20
Rf_D: 0.61 Gef.: C 68.89 H 8.48 N 4.59
[α]_D²³: +4.7 °

p-Bumeoc-L-Ser(tBu)-OH•CHA (39)

Ansatz: 1.0 g (0.0062 mol) H-L-Ser $C_{27}H_{46}N_2O_5$ (478.669)
(tBu)-OH Ber.: C 67.75 H 9.68 N 5.85
Ausbeute: 0.83 g **39** (28 % d. Th.) Gef.: C 68.97 H 10.36 N 5.93
Schmp.: 206 °C
Rf_D: 0.50
[α]_D²³: +9.8 °

p-Bumeoc-L-Ser(tBu)-OH (46)

Ansatz: 0.5 g (0.0011 mol) p-Bumeoc-L-Ser(tBu)-OH•CHA (**39**) mit 5%iger Zitronensäure waschen.
Ausbeute: 0.313 g **46** (79 % d. Th.) $C_{21}H_{33}NO_5$ (379.493)

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Schmp.: 74.5 °C
Rf_D: 0.61
[α]_D²³: -13.8 °

Ber.:	C	66.46	H	8.76	N	3.69
Gef.:	C	66.88	H	9.17	N	3.99

p-Bumeoc-L-Leu-OH (35)

Ansatz: 1g (0.0076 mol) H-L-Leu-OH
Ausbeute: 1.625 g **35** (61 % d. Th.)
Schmp.: 93 °C
Rf_D: 0.60
[α]_D²⁴: +3.8 °

		C ₂₀ H ₃₁ NO ₄ (349.467)				
Ber.:	C	68.74	H	8.94	N	4.00
Gef.:	C	68.11	H	9.32	N	3.72

p-Bumeoc-L-Leu-OH•DCHA (73)

Ansatz: 1.0 g (0.0029 mol) p-Bumeoc-L-Leu-OH
Ausbeute: 1.95 g **73** (92 % d. Th.)
Schmp.: 149 °C
Rf_D: 0.50
[α]_D²⁴: -9.3 °

		C ₃₂ H ₅₄ N ₂ O ₄ (530.79)				
Ber.:	C	72.41	H	10.25	N	5.27
Gef.:	C	72.88	H	10.68	N	5.25

p-Bumeoc-L-Gly-OH•DCHA (36)

Ansatz: 1.0 g (0.0133 mol) H-L-Gly-OH
Ausbeute: 3.1 g **36** (49.3 % d. Th.)
Schmp.: 130.5 °C
Rf_D: 0.46

		C ₂₈ H ₄₆ N ₂ O ₄ (474.68)				
Ber.:	C	70.85	H	9.76	N	5.90
Gef.:	C	71.65	H	10.15	N	5.88

p-Bumeoc-L-Gly-OH (44)

Ansatz: 1.0 g (0.0021 mol) p-Bumeoc-L-Gly-OH•DCHA (**36**) mit 5%iger Zitronensäure waschen.
Ausbeute: 0.54 g **44** (86.4 % d. Th.)
Schmp.: 98 °C
Rf_D: 0.53

		C ₁₆ H ₂₃ NO ₄ (293.36)				
Ber.:	C	65.50	H	7.90	N	4.77
Gef.:	C	66.02	H	8.16	N	4.52

p-Bumeoc-L-Ala-OH•DCHA (37)

Ansatz: 1.0 g (0.0112 mol) H-L-Ala-OH
C₂₉H₄₈N₂O₄ (488.708)

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Ausbeute: 2.35 g **37** (43 % d. Th.)

Ber.: C 71.27 H 9.89 N 5.73

Schmp.: 138-139 °C

Gef.: C 71.31 H 10.06 N 5.76

R_{fD}: 0.48

[α]²⁴_D: +8.5 °

p-Bumeoc-L-Ala-OH (43)

Ansatz: 1.0 g (0.0020 mol) p-Bumeoc-L-Ala-OH•DCHA (**37**) mit 5%iger Zitronensäure waschen.

Ausbeute: 0.53 g **43** (83.5 % d. Th.)

C₁₇H₂₅NO₄ (307.387)

Schmp.: 87 °C

Ber.: C 66.42 H 8.19 N 4.55

R_{fD}: 0.54

Gef.: C 66.81 H 8.45 N 4.79

[α]²³_D: -3.1 °

p-Bumeoc-L-Phe-OH•DCHA (74)

Ansatz: 1.0 g (0.0060 mol) H-L-Phe-OH

C₃₅H₅₂N₂O₄ (564.807)

Ausbeute: 1.47 g **74** (43.5 % d. Th.)

Ber.: C 74.43 H 9.28 N 4.96

Schmp.: 143 °C

Gef.: C 73.96 H 8.82 N 5.33

R_{fD}: 0.49

[α]²⁴_D: +12.9 °

p-Bumeoc-L-Phe-OH (75)

Ansatz: 1.0 g (0.00177 mol) p-Bumeoc-L-Phe-OH•DCHA (**76**) mit 5%iger Zitronensäure waschen.

Ausbeute: 0.54 g **75** (79.3 % d. Th.)

C₂₃H₂₉NO₄ (383.485)

Schmp.: 101.5 °C

Ber.: C 72.04 H 7.62 N 3.65

R_{fD}: 0.54

Gef.: C 71.79 H 7.22 N 3.37

[α]²⁴_D: +9.8 °

p-Bumeoc-L-Asp(OtBu)-OH•CHA (76)

Ansatz. 0.5 g (0.0026 mol) H-L-Asp

C₂₈H₄₆N₂O₆ (506.679)

(OtBu)-OH

Ber.: C 66.37 H 9.15 N 5.53

Ausbeute: 0.38 g **76** (25 % d. Th.)

Gef.: C 65.67 H 9.23 N 5.37

Schmp.: 159.5 °C

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Rf_D: 0.52

[α]_D²³: +11.3 °

p-Bumeoc-L-Tyr(tBu)-OH•CHA (77)

Ansatz: 0.5 g (0.0021 mol) H-L-Tyr
(tBu)-OH

C₃₃H₅₀N₂O₅ (554.767)

Ber.: C 71.44 H 9.07 N 5.05

Ausbeute: 0.39 g **77** (33.8 % d. Th.)

Gef.: C 71.87 H 8.89 N 4.98

Schmp.: 155 °C

Rf_D: 0.51

[α]_D²³: +9.4 °

p-Bumeoc-L-Tyr(tBu)-OH (78)

Ansatz: 0.3 g (0.00054 mol) p-Bumeoc-L-Tyr(tBu)-OH•CHA (**77**) mit 5%iger Zitronensäure waschen.

Ausbeute: 0.20 g **78** (81.7 % d. Th.)

C₂₇H₃₇NO₅ (455.591)

Schmp.: 132 °C

Ber.: C 71.18 H 8.18 N 3.07

Rf_D: 0.56

Gef.: C 70.79 H 7.82 N 3.43

[α]_D²³: -10.8 °

p-Bumeoc-L-Val-OH•DCHA (40)

Ansatz: 1.0 g (0.0085 mol) H-L-Val-OH

C₃₁H₅₂N₂O₄ (516.761)

Ausbeute: 1.51 g **40** (37.8 % d. Th.)

Ber.: C 72.05 H 10.14 N 7.52

Schmp.: 138.5 °C

Gef.: C 71.66 H 10.58 N 6.94

Rf_D: 0.48

[α]_D²³: -13.7 °

N^α-Phenoxycarbonyl-L-Val-OH•DCHA (41)

Ansatz: 1.0 g (0.0085 mol) H-L-Val-OH

C₂₄H₃₈N₂O₄ (418.574)

Ausbeute: 5.0 g **41** (70.43 % d. Th.)

Ber.: C 68.86 H 9.15 N 6.69

Schmp.: 169-170 °C

Gef.: C 68.46 H 9.14 N 6.70

Rf_D: 0.43

Die p-Bumeoc-geschützten Aminosäuren werden aus ihren DCHA-Salzen freigesetzt, indem sie zunächst in Essigester oder Diethylether suspendiert werden. Es wird dann einmal mit

V. EXPERIMENTELLER TEIL

5%iger Zitronensäure und noch zwei- bis dreimal mit Wasser neutral gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Aminosäuren kristallisieren bereits beim Einengen der org. Phase aus.

V.7.1.7. Bestimmung der Spaltgeschwindigkeit (mittels HPLC) und nach der allgemeinen Abspaltungsvorschrift

HPLC-Methode: chromatographische Bedingungen:

RP-18-Säule (25•4 cm; Partikelgröße: 5 μm); Druck: 210 bar; Durchflussrate: 1 ml/min; mobile Phase: 85 % MeOH, 15 % 0.01 M Ammoniumacetatlösung; pH = 5.1; isokratische Bedingungen; Injektion: 10 μl ; Detektion bei 254 nm.

allgemeine Abspaltungsvorschrift:

20 mg (0.057 mmol) p-Bumeoc-L-Leu-OH (35) werden mit 1 ml Abspaltungsreagenz bei 23 °C versetzt und stark gerührt. Nach bestimmten Zeitabständen (15, 30, 45 sec. usw.) werden jeweils 20 μl entnommen und die Reaktion durch Einbringen in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß abgestoppt (Messzeit). Dieses enthält 200 μl Methanol und je nach Abspaltungsmedium 50-100 μl 5%ige NH_3 -Lösung (die Menge wurde durch eine Blindprobe für jedes Reagenz vorher bestimmt; der pH-Wert sollte nach dem Abstoppen bei ca. 8 liegen). Die Lösung wird im Exsiccator über Phosphorpentoxid eingedampft und dann in 40 μl MeOH/ H_2O (8.2, v/v) (die wässrige Phase wurde mit verdünnter Schwefelsäure auf pH 4 gebracht) gelöst. Nun werden 2 μl von jeder Probe auf eine DC-Platte getüpfelt und im System D chromatographiert. Als Referenz werden eine 1%ige Lösung der geschützten Aminosäure und Leucin-Lösung verschiedener Konzentration mitchromatographiert. Nach dem Trocknen wird mit Ninhydrin-Lösung besprüht und im Trockenschrank bei 120 °C während 5 Minuten entwickelt.

In Tab. 8, IV.3.7., werden die absoluten und relativen Geschwindigkeitskonstanten von p-Bumeoc in den Abspaltungsmedien b) und c) mit denen von Boc, Adpoc, Ppoc und Bpoc und t-Bumeoc verglichen.

V.7.1.8. Synthese von N^α-[1-(4-tert-Butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl]-L-Leu-N-hydroxy-succinimidester (p-Bumeoc-L-Leu-OSu (47))

1.0 g (0.00286 mol) p-Bumeoc-L-Leu-OH (**35**) und 0.39 g (0.00286 mol) N-Hydroxysuccinimid werden in 10 ml DMF (aprotisches Lösungsmittel) gelöst und unter Rühren und Kühlung auf 0 °C mit 0.7 g (0.00343 mol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Man lässt 1 h lang bei dieser Temperatur und weitere 12 h bei Raumtemperatur rühren. Danach wird der entstandene N,N'-Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und die Lösung bei 25 °C im Vakuum eingengt. Man löst den Rückstand in wenig abs. Diethylether oder CH₂Cl₂, kühlt auf -20 °C und filtriert erneut. Das Produkt wird mit n-Hexan zur teilweisen Kristallisation gebracht und anschliessend im Vakuum über P₂O₅ getrocknet.

Ausbeute: 0.54 g **47** (42 % d. Th.)

C₂₄H₃₄N₂O₆ (446.54)

Rf_D: 0.57

Ber: C 64.55 H 7.67 N 6.27

Gef: C 65.73 H 8.23 N 6.57

V.7.1.9. Abspaltung der Fmoc-Gruppe vom Harz (D-1600)

0.6 g Fmoc-Amid-Harz werden in CH₂Cl₂ 10-12 h zunächst zum Quellen gebracht. Dann wäscht man zuerst 3•10 min mit 10 ml CH₂Cl₂, dann 2•10 min mit 10 ml DMF. Die Fmoc-Abspaltung geschieht 110 min lang mit 10 ml 20 % Piperidin/DMF und dann noch einmal 25 min lang mit 10 ml 20 % Piperidin/DMF. Man wäscht danach in der Reihenfolge 1 bis 4 mit:

1 10 ml DMF (2•10 min)

2 10 ml 1,4-Dioxan/Wasser (2:1) (2•10 min)

3 10 ml DMF (3•10 min)

4 10 ml CH₂Cl₂ (3•10 min)

V.7.1.10. Bestimmung der Harzbeladung

0.4 g (0.22 mmol) Harz (D-1600) werden in 10 ml CH₂Cl₂ suspendiert und mit 0.6 mmol p-Bumeoc-L-Leu-OH, 0.9 mmol 1-Hydroxybenzotriazol in DMF und 10 µl Bromphenolblau in Dimethylacetamid versetzt. Der dunkelblaue Reaktionsansatz wird 3 Minuten lang äquilibriert. Dann fügt man 0.6 mmol N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid hinzu, und schüttelt die Mischung 100 Minuten lang, während die Farbe der Lösung von blau nach gelb wechselt, wodurch das Ende der Kupplungsreaktion angezeigt wird. Die Lösungsmittel werden abgesaugt und verbleibende Reagenzien mit je 10 ml CH₂Cl₂ (3•5 min), Dimethylacetamid

V. EXPERIMENTELLER TEIL

(3•1 min), Isopropanol (3•3 min) und CH₂Cl₂ (3•5 min) ausgewaschen. Eventuell vorhandene freie Aminofunktionen werden anschliessend mit 0.2 ml (0.2 mmol) Acetanhydrid, 0.16 ml (0.2 mmol) Pyridin und 10 ml Methylenchlorid innerhalb von 30 min bei Raumtemperatur acetyliert. Nach den üblichen Waschvorgängen wird das Harz im Vakuum getrocknet. Durch quantitative Aminosäureanalyse einer Harzprobe nach 24-stündiger Hydrolyse mit 6 N HCl und anschliessender OPA/MPA-Derivatisierung ergibt sich ein Leucingehalt von 0.44 mmol Leu/1g Harz.

V.7.1.11. Protokoll zur Festphasen-Synthese von Leucin-Enkephalinamid (L-Tyrosin(tBu)-L-glycinyl-L-glycinyl-L-phenylalanyl-L-leucinamid) (48)

Nach der Kupplung von p-Bumeoc-L-Leucin (35) an das Harz wird die weitere Synthese von Leucin-Enkephalin (48), wie im Syntheseprotokoll (s. Tab. 21) beschrieben, ausgeführt. Die p-Bumeoc-geschützten Aminosäuren werden in folgender Reihenfolge eingesetzt:

p-Bumeoc-L-Leu-OH (35), p-Bumeoc-L-Phe-OH (75), p-Bumeoc-L-Gly-OH (44), p-Bumeoc-L-Gly-OH (44), p-Bumeoc-L-Tyr(tBu)-OH (78).

Tab. 21. Syntheseprotokoll von Leucin-Enkephalin

Stufe	Vorgang	Reagenzien/Lösungsmittel	Volumen (ml)	Zeit (min)
1	Waschen	CH ₂ Cl ₂	10	3•5
2	p-Bumeoc-Abspaltung	0.25 % TFA/CH ₂ Cl ₂	10	3•5
3	p-Bumeoc-Abspaltung	0.25 % TFA/CH ₂ Cl ₂	10	1•10
4	Waschen	CH ₂ Cl ₂	10	3•1
5	Neutralisation	Diisopropylethylamin	10	1•5
6	Neutralisation	Diisopropylethylamin	10	1•10
7	Waschen	CH ₂ Cl ₂	10	6•1
8	AS-Aktivierung	0.6 Äquiv. p-Bumeoc-Aminosäure, 0.9 Äquiv. HOBt, 0.6 Äquiv. DCCI + CH ₂ Cl ₂ + Bromphenolblau (10 µl)	10	1•2

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Stufe	Vorgang	Reagenzien/Lösungs- mittel	Volumen (ml)	Zeit (min)
9	Kupplung (bei Raumtemperatur)	Aktivierte p-Bumeoc-AS	10	100
10	Waschen	CH ₂ Cl ₂	10	3•5
11	Waschen	Dimethylacetamid	10	3•1
12	Waschen	Isopropanol	10	3•3

Nach der Synthese werden 510 mg Leucin-Enkephalin-Harz erhalten.

V.7.1.12. Darstellung von L-Tyrosin(tBu)-L-glycinyl-L-glycinyl-L-phenylalanyl-L-leucinamid (48)

Man suspendiert 500 mg des voll geschützten Peptid-Harzes und 300 mg 2-Methylindol in 2 ml Anisol, spült unter Rühren mit Stickstoff durch, und setzt 15 ml Trifluoressigsäure zu. Man lässt vier Stunden bei 49 °C reagieren. Dann wird das Harz abfiltriert, mit wenig eisgekühlter TFA nachgewaschen, und die vereinigten Filtrate im Vakuum eingeengt. Den verbleibenden Rückstand nimmt man in Methanol auf und pipettiert in vorgekühlten abs. Diethylether ein. Das Präzipitat wird filtriert und sorgfältig mit abs. Diethylether nachgewaschen und im Hochvakuum über Kaliumhydroxid getrocknet.

Ausbeute: 91 mg **48** (94.8 % d. Th.) bezogen auf die Harzbeladung von 0.49/1 g Harz

R_{fD}: 0.47

C ₂₈ H ₂₈ N ₆ O ₆ (544.565)	Ber.:	C 61.75	H 5.18	N 15.43
	Gef.:	C 61.58	H 5.09	N 14.97

ASA: Tyr 1.00 (1), Gly 1.99 (2), Phe 0.99 (1), Leu 1.00 (1).

Im speziellen Teil, Kap. IV.3.4., wurde der thermische Zerfall des p-Bumeocphenylcarbonats beschrieben. Wie bereits erwähnt wurde, so konnten von 2-Phenoxy-2-tert-butylphenylpropan (**34**), der bei diesem Zerfall entstehenden Verbindung, Einkristalle erhalten werden.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

V.7.2. Kristallstruktur und Analyse von [2-(4-Tertiärbutylphenyl)-propyl-2]-phenylether (34)

[2-(4-Tertiärbutylphenyl)-propyl-2]-phenylether (34) kristallisiert in der orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_1$ mit den Gitterkonstanten $a = 643.58(4)$ pm, $b = 4706.4(3)$ pm und $c = 1048.8(1)$ pm. Die kristallographischen Daten sowie die Angaben zur Röntgenstrukturanalyse sind in Tab.22 zu finden. Abb. 64 zeigt die Struktur. In Tab. 23 sind die Lageparameter aufgeführt. In Tab. 24 und 25 sind die Bindungslängen und -winkel aufgezeigt.

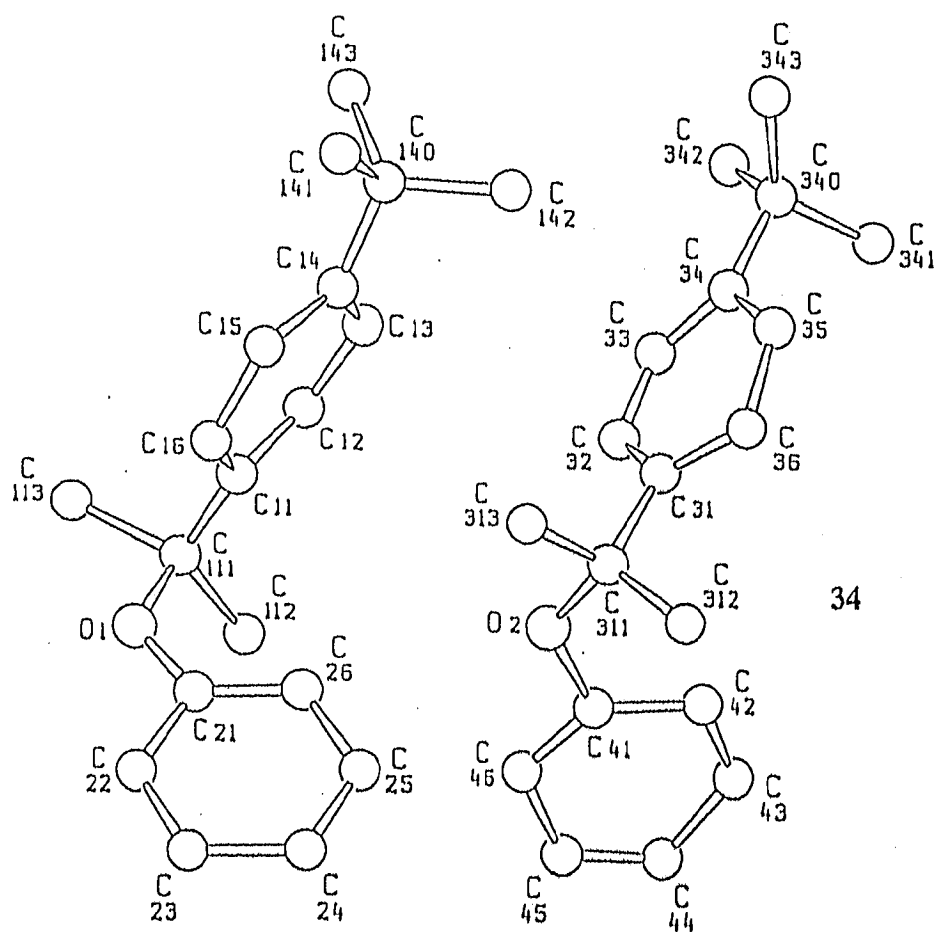


Abb. 64. Kristallstruktur von [2-(4-Tertiärbutylphenyl)-propyl-2]-phenylether (34).

Tab. 22. Kristall(structur)daten und Angaben zur Röntgenkristallstrukturanalyse von [2-(4-Tertiärbutylphenyl)-propyl-2]-phenylether (34).

Summenformel	$C_{38}H_{48}O_2$
Molekularmasse	536.81
Kristallsystem	orthorhombisch
Raumgruppe	$P2_12_1$

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Gitterparameter	a = 643.58(4) pm b = 4706.4(3) pm c = 1048.8(1) pm
Kristallgrösse	0.35•0.35•1 mm
Kristallform	weisse Nadeln
F (000)	1168
Zellvolumen	3177.0 Å ³
Dichte	1.122 g•cm ⁻³
Formeleinheit	4
Scans	$\omega/2\theta$
Absorptionskoeffizient	4.803
Absorptionskorrektur	Difabs, empirisch
Min., max. und durchschnittl.	0.7817/ 1.4723/ 0.9744
Extinktionskorrektur	keine
Bereich von h, k, und l	0→7, 0→56, -12 →12
Standardreflexe	-22-17/-30-4/00-24
Zeitintervall der Intensitätskontrolle	1 h
Zahl der gemessenen Reflexe	5294/5-65 °C
Zahl der beobachteten Reflexe	2754
Lösung der Struktur	direkte Methoden
Gewichtung	1/ σ
Verfeinerte Parameter	362
R	0.071
ωR	0.072
Messtemperatur	-50 °C
höchster Peak in abschliessender ΔF map	0.359
Atomformfaktoren	internationale Tabellen

Tab. 23. Atomparameter und ihre festgelegten Standardabweichungen.

Atom	x	y	z	B(A2)
O1	1.029(1)	0.0786(1)	-0.3672(6)	4.5(1)
O2	0.972(1)	0.0797(1)	0.1285(6)	4.7(1)

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Atom	x	y	z	B(A2)
C11	1.063(2)	0.1211(2)	-0.2438(8)	4.2(2)
C12	1.161(1)	0.1384(2)	-0.1478(9)	3.8(2)
C13	1.081(2)	0.1617(2)	-0.0916(9)	5.7(3)
C14	0.896(1)	0.1715(2)	-0.1284(8)	4.2(2)
C15	0.783(2)	0.1555(2)	-0.228(1)	5.7(3)
C16	0.863(1)	0.1298(2)	-0.291(1)	5.9(3)
C21	0.916(1)	0.0604(2)	-0.3007(7)	3.0(2)
C22	0.819(1)	0.0398(2)	-0.3765(7)	3.7(2)
C23	0.688(1)	0.0205(2)	-0.3212(9)	4.2(2)
C24	0.643(2)	0.0175(3)	-0.183(1)	7.7(4)
C25	0.738(1)	0.0401(2)	-0.112(1)	5.2(2)
C26	0.884(2)	0.0638(3)	-0.170(1)	6.2(3)
C31	0.922(1)	0.1230(2)	0.2618(8)	3.5(2)
C32	1.120(1)	0.1316(2)	0.2248(7)	3.5(2)
C33	1.206(1)	0.1552(2)	0.2715(9)	4.0(2)
C34	1.115(2)	0.1713(2)	0.3574(9)	5.0(2)
C35	0.905(2)	0.1619(2)	0.404(1)	5.4(3)
C36	0.810(2)	0.1368(2)	0.357(1)	5.9(3)
C41	1.106(2)	0.0591(2)	0.189(1)	5.5(2)
C42	1.133(1)	0.0604(2)	0.3270(7)	3.3(2)
C43	1.243(2)	0.0411(2)	0.3745(9)	5.2(2)
C44	1.341(1)	0.0201(2)	0.300(1)	4.2(2)
C45	1.310(2)	0.0167(3)	0.165(1)	7.4(3)
C46	1.188(2)	0.0403(2)	0.105(1)	6.1(3)
C111	1.165(2)	0.0983(2)	-0.3042(8)	4.1(2)
C112	1.324(2)	0.0770(3)	-0.2200(1)	8.1(4)
C113	1.293(2)	0.1117(2)	-0.4270(1)	5.1(2)
C311	0.808(1)	0.0970(2)	0.1921(9)	4.4(2)
C312	0.671(2)	0.0813(2)	0.2773(8)	3.9(2)
C313	0.692(2)	0.1985(2)	0.0832(9)	4.7(2)
C340	1.205(2)	0.1985(2)	0.4207(9)	5.3(2)
C341	1.308(2)	0.1895(3)	0.5450(1)	9.1(4)

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Atom	x	y	z	B(A ²)
C342	1.422(2)	0.2056(6)	0.3910(3)	26.0(1)
C343	1.045(2)	0.2259(3)	0.4330(2)	12.8(5)
C140	0.801(2)	0.1989(3)	-0.0740(1)	7.5(3)
C141	0.636(2)	0.2112(2)	-0.1660(1)	9.2(3)
C142	0.806(5)	0.1998(5)	0.060(2)	22.0(1)
C143	0.932(3)	0.2222(3)	-0.1030(2)	14.5(6)
H22	0.8445	0.0391	-0.4657	4.8*
H23	0.6181	0.0077	-0.3768	5.4*
H24	0.5620	0.0027	-0.1565	10.0*
H25	0.7108	0.0408	-0.0225	6.8*
H26	0.9435	0.0787	-0.1216	8.1*
H12	1.2964	0.1327	-0.1212	4.9*
H13	1.1555	0.1710	-0.0258	7.4*
H15	0.6502	0.1621	-0.2523	7.4*
H16	0.7903	0.1199	-0.3558	7.7*
H42	1.0715	0.0749	0.3775	4.3*
H43	1.2615	0.0406	0.4643	6.8*
H44	1.4339	0.0073	0.3415	5.5*
H45	1.3624	0.0009	0.1187	9.6*
H46	1.1691	0.0419	0.0150	7.9*
H35	0.8351	0.1729	0.4664	7.0*
H36	0.6801	0.1300	0.3874	7.7*
H33	1.3387	0.1606	0.2411	5.2*
H32	1.1951	0.1204	0.1652	4.6*
H311	0.6228	0.0934	0.0402	6.1*
H312	0.5926	0.1218	0.1126	6.1*
H313	0.7855	0.1175	0.0261	6.1*
H314	0.6073	0.0661	0.2318	5.1*
H315	0.7496	0.0738	0.3462	5.1*
H316	0.5669	0.0936	0.3093	5.1*
H341	1.3645	0.2057	0.5865	11.9*
H342	1.2071	0.1809	0.5993	11.9*

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Atom	x	y	z	B(A ²)
H343	1.4155	0.1763	0.5280	11.9*
H344	1.1147	0.2412	0.4727	16.6*
H345	0.9998	0.2314	0.3505	16.6*
H346	0.9279	0.2205	0.4830	16.6*
H347	1.4602	0.2225	0.4345	34.0*
H348	1.5099	0.1905	0.4173	34.0*
H349	1.4365	0.2084	0.3016	34.0*
H111	1.3795	0.0627	-0.2740	10.5*
H112	1.4336	0.0879	-0.1844	10.5*
H113	1.2474	0.0682	-0.1528	10.5*
H114	1.2640	0.0969	-0.4705	6.7*
H115	1.1980	0.1206	-0.4837	6.7*
H116	1.3909	0.1253	-0.3975	6.7*
H141	0.7451	0.2171	0.0888	29.0*
H142	0.7291	0.1842	0.0935	29.0*
H143	0.9453	0.1987	0.0888	29.0*
H144	0.8727	0.2391	-0.0698	18.9*
H145	1.0647	0.2192	-0.0664	18.9*
H146	0.9452	0.2239	-0.1931	18.9*
H147	0.5789	0.2280	-0.1308	11.9*
H148	0.6985	0.2153	-0.2458	11.9*
H149	0.5281	0.1976	-0.1780	11.9*

Tab. 24. Bindungsabstände [Å].

Atom 1	Atom 2	Abstand	Atom 1	Atom 2	Abstand
O1	C21	1.32(1)	C22	C23	1.37(1)
O1	C111	1.44(1)	C23	C24	1.49(2)
O2	C41	1.45(1)	C24	C25	1.44(2)
O2	C311	1.49(1)	C25	C26	1.58(1)
C11	C12	1.45(1)	C31	C32	1.40(1)
C11	C16	1.44(1)	C31	C36	1.39(1)

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Atom 1	Atom 2	Abstand	Atom 1	Atom 2	Abstand
C11	C111	1.40(1)	C31	C311	1.60(1)
C12	C13	1.36(1)	C32	C33	1.33(1)
C13	C14	1.33(1)	C33	C34	1.31(1)
C14	C15	1.48(1)	C34	C35	1.50(1)
C14	C140	1.54(1)	C34	C340	1.55(1)
C15	C16	1.47(1)	C35	C36	1.42(1)
C21	C22	1.40(1)	C41	C42	1.46(1)
C21	C26	1.39(1)	C41	C46	1.36(2)
C42	C43	1.26(1)	C311	C313	1.47(1)
C43	C44	1.42(1)	C340	C341	1.53(2)
C44	C45	1.44(2)	C340	C342	1.48(3)
C45	C46	1.50(2)	C340	C343	1.65(2)
C111	C112	1.69(2)	C140	C141	1.55(2)
C111	C113	1.66(1)	C140	C142	1.41(3)
C311	C312	1.45(1)	C140	C143	1.41(3)

Tab. 25. Bindungswinkel [°].

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel	Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel
C21	O1	C111	120.7(6)	C32	C31	C311	121.0(7)
C41	O2	C311	126.1(7)	C36	C31	C311	116.5(8)
C12	C11	C16	118.1(8)	C31	C32	C33	121.3(8)
C12	C11	C111	122.9(9)	C32	C33	C34	123.3(9)
C16	C11	C111	118.6(8)	C33	C34	C35	116.8(9)
C11	C12	C13	126.6(9)	C33	C34	C340	127.0(1)
C12	C13	C14	120.0(1)	C35	C34	C340	116.1(8)
C13	C14	C15	117.7(9)	C34	C35	C36	121.3(9)
C13	C14	C140	122.7(9)	C31	C36	C35	114.0(1)
C15	C14	C140	120.0(1)	O2	C41	C42	118.8(8)
C14	C15	C16	124.4(9)	O2	C41	C46	112.2(9)
C11	C16	C15	113.1(9)	C42	C41	C46	129.0(9)

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel	Atom 1	Atom 2	Atom 3	Winkel
O1	C21	C22	113.2(7)	C41	C42	C43	115.4(9)
O1	C21	C26	121.7(8)	C42	C43	C44	122.8(9)
C22	C21	C26	124.8(8)	C43	C44	C45	125.0(1)
C21	C22	C23	119.6(7)	C44	C45	C46	115.0(1)
C22	C23	C24	126.6(9)	C41	C46	C45	114.0(2)
C23	C24	C25	111.0(2)	O1	C111	C11	114.6(8)
C24	C25	C26	125.0(1)	O1	C111	C112	103.1(7)
C21	C26	C25	112.8(9)	O1	C111	C113	101.1(6)
C32	C31	C36	122.6(8)	C11	C111	C112	119.9(8)
C11	C111	C113	107.0(7)	C34	C340	C343	116.0(1)
C112	C111	C113	109.5(8)	C341	C340	C342	80.0(1)
O2	C311	C31	107.2(7)	C341	C340	C343	115.0(2)
O2	C311	C312	115.3(7)	C342	C340	C343	116.0(1)
O2	C311	C313	102.3(7)	C14	C140	C141	111.0(1)
C31	C311	C312	112.6(7)	C14	C140	C142	113.0(1)
C31	C311	C313	107.5(8)	C14	C140	C143	109.0(1)
C312	C311	C313	110.9(8)	C141	C140	C142	129.0(2)
C34	C340	C341	107.5(8)	C141	C140	C143	100.0(2)
C34	C340	C342	117.0(1)				

V.8. Darstellung von N^α-Iso-Meoc-geschützten Aminosäuren

V.8.1. Darstellung von 4-Isopropylbenzoesäuremethylester¹⁰³ (51)

50 g 4-Isopropylbenzoesäure (**49**) (0.30 mol) und 53 g Thionylchlorid (0.45 mol) werden 4 h am Rückfluss gekocht. Überschüssiges Thionylchlorid wird am Rotationsverdampfer abgezogen. Die verbleibende Lösung wird mit 100 ml abs. Methanol versetzt. Man lässt 3 h am Rückfluss kochen und danach noch über Nacht bei Raumtemperatur weiterreagieren. Überschüssiges Methanol wird im Vakuum eingengt. Das schwach gelbe Öl wird in Diethylether aufgenommen und zweimal mit Wasser neutral gewaschen. Man trocknet über Natriumsulfat, zieht das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer ab. Die Fraktion bei 92-95 °C wurde verwendet.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Ausbeute: 47.75 g **51** (88.30 % d. Th.)

Kp.: 92-95 °C (Kp.: 126 °C, 14 Torr)¹¹⁸

R_{fD}: 0.68

C₁₁H₁₄O₂ (178.23)

V.8.2. Darstellung von 2-(4-Isopropylphenyl)-2-propanol (Iso-Meoc-OH)¹⁰² (**52**)

Zu 24.3 g (1 mol) Magnesium in 100 ml abs. Diethylether tropft man so langsam 142 g (1 mol) Methyljodid in 200 ml abs. Diethylether, dass die Reaktionsmischung siedet. Nachdem sich fast alles Magnesium gelöst hat (2-3 h) werden 44.55 g (0.25 mol) 4-Isopropylbenzoesäuremethylester (**51**) in 100 ml abs. Diethylether so zugetropft, dass die Lösung ständig siedet.

Ausbeute: 38.77 g **52** (87 % d. Th.)

C₁₂H₁₈O (178.27)

Schmp.: 38.5 °C (38 °C)¹³⁴

Ber.: C 80.85 H 10.17

R_{fD}: 0.55

Gef.: C 80.40 H 10.40

V.8.3. Darstellung von [2-Isopropylphenyl-(4)-propyl-(2)]-phenylcarbonat (**53**)

17.8 g 2-[4-Isopropylphenyl]-propanol-(2) (**52**) (0.1 mol), 100 ml Dichlormethan und 12 ml Pyridin werden bei -5 °C innerhalb 30 Minuten mit einer Lösung von 15.2 ml Choroameisensäurephenylester (**9**) in 50 ml Dichlormethan versetzt. Nach dem Zutropfen bildet sich eine dicke, weisse Fällung, die nach Rühren über Nacht bei 0 °C grösstenteils wieder in Lösung geht. Das Reaktionsgemisch wird auf wenig Eis gegossen; nach Verdünnen mit 100 ml Dichlormethan wird die organische Phase abgetrennt, zweimal mit 5%iger Salzsäure, dann dreimal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und letztlich bei 30 °C Badtemperatur im Vakuum eingeengt. Das Öl wird zu einer schleimigen, weissen Masse, die aber unter den üblichen Bedingungen nicht auskristallisiert.

Ausbeute: 13.5 g **53** (45.3 % d. Th.)

R_{fD}: 0.72

C₁₉H₂₂O₃ (298.38)

V.8.4. Darstellung von Iso-Meoc-L-Ala-OH•DCHA (57)

Ansatz: 1.0 g (0.0112 mol) H-L-Ala-OH $C_{28}H_{46}N_2O_4$ (474.68)
Ausbeute: 0.5 g **57** (9.96 % d. Th.) Ber.: C 70.85 H 9.76 N 5.90
Gef.: C 71.69 H 9.12 N 6.43

V.8.5. Darstellung von Iso-Meoc-L-Leu-OH•DCHA (58)

Ansatz: 1 g (0.00762 mol) H-L-Leu-OH
Ausbeute: 0.34 g **58** (8.6 % d. Th.)
 $C_{31}H_{52}N_2O_4$ (516.76)

V.9. t-Bumeoc-geschützte Aminosäuren über t-Bumeoc-OPh (66)

V.9.1. Darstellung von tert-Butylchlorid¹²⁰ (60)

185.4 g (2.5 mol) tert-Butylalkohol werden mit 616.3 ml 12 N HCl konz. im Scheidetrichter einige Minuten lang kräftig geschüttelt. Danach gibt man festes NaCl zur besseren Entmischung dazu, trennt die organische Phase ab, die dann mit 150 ml 5%iger $NaHCO_3$ gewaschen wird. Danach wird noch zweimal mit Wasser gewaschen, und über Natriumsulfat getrocknet. Nach fraktionierter Destillation werden die produkthaltigen Fraktionen (49-51 °C) getrennt gesammelt.

Ausbeute: 213.2 g **60** (92 % d. Th.)
Kp.: 51 °C (Kp.: 49-51 °C, 760 Torr)¹²⁰
 C_4H_9Cl (92.57)

V.9.2. Darstellung von 3,5-Di-tert-butyltoluol^{121, 122} (61)

210 g (2.26 mol) tert-Butylchlorid (**60**) und 120.7 ml (1.13 mol) abs. Toluol (**59**) werden unter starkem Rühren (KPG-Rührer!) auf -10 °C gekühlt. Man gibt in kleinen Mengen innerhalb einer Stunde 2.98 g (22.6 mmol) wasserfreies $AlCl_3$ zu. Schon nach einigen Minuten beobachtet man heftige HCl-Entwicklung. Man lässt über Nacht bei Raumtemperatur rühren.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Danach giesst man den Reaktionsansatz auf eine Mischung aus Eis/HCl_{konz.} (1:1), trennt die organische Phase ab, wäscht mit Wasser, mit 5%iger Natriumcarbonatlösung und anschliessend mit Wasser neutral. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird das Produkt bei 17 Torr über einer Vigreux-Kolonnen destilliert. Die Fraktion zwischen 93 °C bis 140 °C wird einer Vakuumdestillation bei 98 °C (5.8 Torr) unterworfen, wobei das Produkt im Kühler zu schönen grossen Kristallen auskristallisiert.

Ausbeute: 319.93 g 61 (69 % d. Th.)	C ₁₅ H ₂₄ (204.354)
Schmp.: 32 °C (31-32 °C) ¹²¹	Ber.: C 88.16 H 11.83
Rf _D : 0.78	Gef.: C 88.08 H 11.78

V.9.3. Darstellung von 3,5-Di-tert-butylbenzoesäure^{103, 123-125} (**62**)

In einem 2l-Dreihalskolben, versehen mit KPG-Rührer und Rückflusskühler, werden zu einer Mischung von 315 g (1.54 mol) 3,5-Di-tert-butyltoluol (**61**) in 474g (6 mol) Pyridin, 300 ml Wasser und 86.06 g (1.54 mol) Kaliumhydroxyd innerhalb 4-5 h 270.23 g (1.71 mol) Kaliumpermanganat in kleinen Portionen zugegeben. Man erhitzt den Reaktionsansatz im Ölbad auf ca. 95 °C, lässt mindestens 10 h am Rückfluss kochen. Danach kühlt man ab und filtriert über Celite, um ein Verstopfen der Filterporen zu vermeiden. Der Mangandioxid-Rückstand wird mit 2 N Kaliumhydroxidlösung gewaschen. Die vereinigten alkalischen Lösungen werden filtriert, und das Lösungsmittel weitgehend abgezogen. Danach wird mit Essigester überschichtet und mit 4 N Schwefelsäure auf pH 1.0 angesäuert. Die wässrige Phase wird noch zweimal mit Essigester extrahiert. Man wäscht die vereinigten Essigesterphasen mit Wasser neutral, trocknet über Natriumsulfat, filtriert und engt im Vakuum ein, wobei die Säure bereits in farblosen Nadeln kristallisiert.

Ausbeute: 270.9 g 62 (75 % d. Th.)	C ₁₅ H ₂₂ O ₂ (234.337)
Schmp.: 170 °C (171-171.6 °C) ¹²⁵	Ber.: C 76.88 H 9.46
Rf _D : 0.54	Gef.: C 77.91 H 9.63

V.9.4. Darstellung von 3,5-Di-tert-butylbenzoesäuremethylester¹⁰³ (64)

265 g (1.13 mol) 3,5-Di-tert-Butyl-benzoesäure (**62**) und 141.6 g (1.2 mol) Thionylchlorid werden 2 h am Rückfluss gekocht. Überschüssiges Thionylchlorid wird nach beendeter Reaktion am Rotationsverdampfer abgezogen. Danach versetzt man mit 300 ml abs. Methanol und lässt 3 h am Rückfluss kochen, dann über Nacht bei Raumtemperatur rühren lassen. Überschüssiges Methanol wird im Vakuum eingeeengt. Das gelbe Öl wird in Diethylether aufgenommen und zweimal mit Kaliumhydrogencarbonat, dann dreimal mit Wasser neutral gewaschen. Man trocknet über Natriumsulfat, und zieht das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer ab. Nach Zugabe von Methanol (p.a.) erfolgt innerhalb weniger Stunden die Kristallisation des Produkts in der Kälte.

Ausbeute: 252.75 g **64** (90 % d. Th.)

$C_{16}H_{24}O_2$ (248.37)

Schmp.: 50 °C (51-52 °C)¹⁰³

Ber.: C 77.37 H 9.74

Rf_D: 0.66

Gef.: C 77.44 H 9.90

V.9.5. Darstellung von 2-(3,5-Di-tert-butylphenyl)-2-propanol (t-Bumeoc-OH)^{102, 123} (65)

Man gibt 97.5 g (4 mol) Magnesiumspäne in 200 ml abs. Diethylether und startet die Grignard-Reaktion, indem zunächst 2 ml CH₃I zugegeben werden. Den Rest von 4 Mol CH₃I in 200 ml abs. Diethylether wird anschliessend so zugetropft, dass die Reaktionsmischung schwach siedet und lässt so lange reagieren, bis nahezu alles Magnesium gelöst ist (2-3 h). Dann gibt man 248.4 g (1.0 Mol) 3,5-Di-tert-butylbenzoesäuremethylester (**64**) in 150 ml abs. Diethylether so zu, dass die Lösung ständig siedet. Man lässt ca. 20 h bei Raumtemperatur rühren. Dann giesst man auf Eis und säuert mit fester Zitronensäure auf pH 4.0 an. Die organische Phase wird abgetrennt, und dreimal mit Wasser gewaschen. Nach Filtrieren und Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man das gelbe ölige Produkt, das sofort auskristallisiert.

Ausbeute: 201.2 g **65** (81 % d. Th.)

$C_{17}H_{28}O$ (248.407)

Schmp.: 56 °C (57-58 °C)¹²³

Ber.: C 82.20 H 11.36

Rf_p: 0.57

Gef.: C 82.48 H 11.45

V.9.6. Darstellung von [2-Di-tert-butylphenyl(3,5)-propyl-(2)]-phenylcarbonat (t-Bumeoc-phenylcarbonat)¹²³ (66)

Zu einer Mischung aus 100.0 g (0.400 mol) 2-(3,5-Di-tert.-butylphenyl)-propanol-(2) (**65**) in 150 ml abs. Methylenchlorid und 47.2 g (600 mmol) Pyridin gibt man innerhalb 30 Minuten bei -5 °C 66.0 g (0.420 mol) Chlorameisensäurephenylester (**9**) in 100 ml Methylenchlorid. Man lässt über Nacht bei Raumtemperatur rühren, wobei sich der während des Zutropfens gebildete dicke Brei weitgehend wieder auflöst. Danach giesst man das Reaktionsgemisch auf Eis, trennt die organische Phase ab, wäscht zuerst zweimal mit 5 % HCl, dann dreimal mit Wasser und trocknet über Natriumsulfat. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abgezogen. Der gelbliche, ölige Rückstand wird aus Diethylether/Petrolether umkristallisiert.

Ausbeute: 80.0 g **66** (54 % d. Th.) $C_{24}H_{32}O_3$ (368.51)

Schmp.: 79 °C

Ber.: C 78.22 H 8.75

Rf_D: 0.66

Gef.: C 78.46 H 8.91

V.9.7. Darstellung von t-Bumeoc-L-Leu-OH•DCHA¹²³ (67)

1 g H-L-Leu-OH (0.00762 mol) werden in 3.45 ml Benzyltrimethylammoniumhydroxidlösung (Triton-B in Methanol (40 %)) bei 50 °C gelöst. Nach Abdampfen von Methanol im Vakuum wird der Rückstand zur Entfernung von Wasser zweimal mit je 20 ml Dimethylformamid destilliert. Der so erhaltene Rückstand wird bei Raumtemperatur in 30 ml Dimethylformamid gelöst, mit 2.75 g (0.0074 mol) t-Bumeocphenylcarbonat versetzt, und über Nacht gerührt. Nach DC-Kontrolle gibt man nochmals 2-3 g t-Bumeocphenylcarbonat, falls sich noch nicht alles umgesetzt hat, zu und lässt mehrere Stunden rühren. Dann verteilt man zwischen Diethylether und Wasser und bringt die wässrige Phase bei 0 °C auf einen pH von 3.0-3.5 mittels 10%iger Zitronensäurelösung. Es wird mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und anschliessend über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in Petrolether gelöst und mit 2 ml DCHA versetzt. Die Kristallisation beginnt bereits beim Zutropfen des Dicyclohexylamins.

Ausbeute: 1.37 g **67** (29 % d. Th.) $C_{39}H_{62}N_2O_4$ (622.93)

Schmp.: 117 °C

Ber.: C 73.20 H 10.03 N 4.49

V. EXPERIMENTELLER TEIL

Rf_D: 0.55

Gef.: C 74.25 H 10.37 N 4.39

[α]_D²⁴: -13.7° (c = 1, MeOH)

V.10. Versuch zur Darstellung von N^α-[1-(3,5-Di-isopropylphenyl)-1-methylethoxy-carbonyl]-Aminosäurederivaten

V.10.1. Darstellung von 3,5-Di-isopropyltoluol

Zu 276 g Toluol und 468 g Isopropylchlorid gibt man 15.5 g AlCl₃, wasserfrei, innerhalb von 6 h portionsweise dazu.

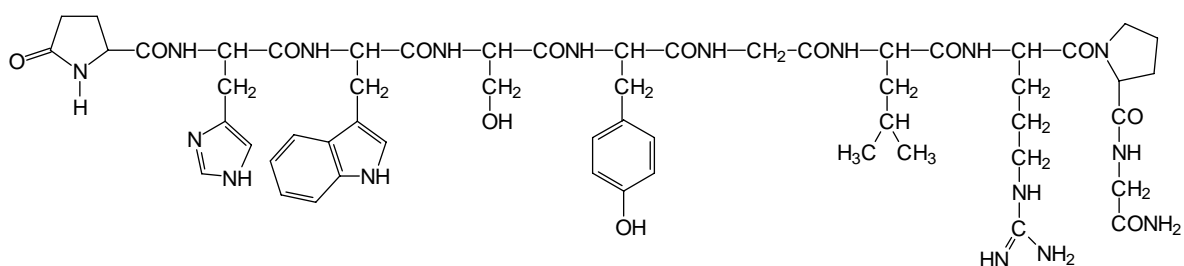
Ausbeute: 184.83 g (35 % d. Th.)

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde ausschliesslich mit säurelabilen N^α-Aminoschutzgruppen des Urethantyps gearbeitet. Es wurden unter anderem zwei neue Schutzgruppen auf ihre Eignung für die Peptidsynthese untersucht.

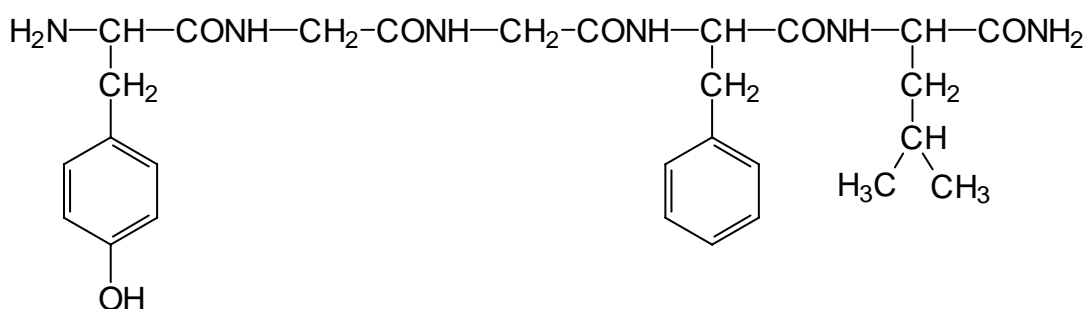
Mittels Festphasen-Peptidsynthese wurden zwei unterschiedliche Peptide synthetisiert, und zwar handelt es sich dabei einmal um das Amid des Decapeptids LH-RH:

- pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂



und das andere mal um das Amid des Pentapeptids Leucin-Enkephalin:

- Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH₂



Das Amid des LH-RH wurde einmal mit der Adpoc-Schutzgruppe und das andere mal über die Fmoc-Schutzgruppe am Merrifield-Harz unter Verwendung des 4-Methoxy-4'-(γ-carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Anker synthetisiert.

Das Amid des Leucin-Enkephalins wurde mit der neuen p-Bumeoc-Schutzgruppe ebenfalls am 4-Methoxy-4'-(γ-carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Anker synthetisiert.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Es konnte mit Stabilitätstests gezeigt werden, dass das Harz durch die milden Abspaltungsreagenzien in beiden Fällen stabil blieb.

Die Adpoc-geschützten Aminosäuren wurden in dreifachem Überschuss mit DCCI/HOBt nacheinander an das Polymer gekuppelt. Die Entfernung der Adpoc-Gruppe erfolgte mit 3 % TFA/CH₂Cl₂, während das vollgeschützte Decapeptidamid mit 95 % TFA/CH₂Cl₂ vom Harz gespalten wird. Dabei werden gleichzeitig die Seitenkettenschutzgruppen mit abgespalten. Danach wird das Peptid (LH-RH) auf Identität und Reinheit mittels Aminosäureanalyse, FAB-MS- und HPLC-Spektroskopie geprüft. Die Identität wird zusätzlich mit einer Referenzprobe sichergestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass die säurelabile N^α-Adpoc-Schutzgruppe für die Festphasensynthese eines kritischen Peptids durchaus geeignet ist. Das konnte im Vergleich zur Fmoc-Strategie unter Verwendung des gleichen Harzes und Ankers bewiesen werden. Als kritisches Peptid wurde das LH-RH ausgewählt, weil es das empfindliche Tryptophan, und mehrere trifunktionelle Aminosäuren enthält.

Es wurden ausserdem zwei weitere neue Adpoc-geschützte Aminosäuren hergestellt, und zwar: AdpocArg(Tip)-OH und AdpocHis(Bum)-OH.

Von den bereits bekannten Adpoc-Aminosäuren: Adpoc-L-Pro-OH und Adpoc-L-Lys(Boc)-OH•DCHA konnten erstmalig Einkristalle erhalten werden.

Als weitere Aufgabe wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Einführung des 1-(4-tert-Butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl (p-Bumeoc-Restes) als N^α-Schutzgruppe in der Weise gelingt, dass zunächst die einzelnen geschützten Aminosäuren so stabil sind, dass sie isoliert werden können. Es stellte sich nämlich die Frage, ob sich die Derivate aufgrund der hohen Säurestabilität, bedingt durch die Struktur der p-Bumeoc-Schutzgruppe, überhaupt fassen lassen. In verhältnismässig guten Ausbeuten kann die p-Bumeoc-Schutzgruppe über das Phenylcarbonat in die Aminosäuren eingeführt werden. Es liessen sich auch die trifunktionellen Aminosäurederivate erhalten.

Sämtliche p-Bumeoc-N^α-geschützte Aminosäuren sind kristalline Verbindungen, die in Form ihrer DCHA-Salze jahrelang bei Raumtemperatur gelagert werden können. Die Lipophilie des p-Bumeoc-Restes verleiht den p-Bumeoc-geschützten Aminosäuren und Peptiden lösungsvermittelnde Eigenschaften. Es sei noch darauf hingewiesen dass die Einführung der p-Bumeoc-Schutzgruppe über das Phenylcarbonat möglich ist und so auf das gefährliche

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Fluorphosgen verzichtet werden kann, was diese neuen Schutzgruppen wesentlich attraktiver macht. Die p-Bumeoc-geschützten Aminosäuren konnten in guten Ausbeuten über den Fluorameisensäureester und zufriedenstellend alternativ mittels des Phenylcarbonats synthetisiert werden.

Nachdem die einzelnen p-Bumeoc-geschützten Aminosäuren isoliert und spektroskopisch bewiesen waren, wurde erstmalig die Eignung des 1-(4-tert-Butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl-(p-Bumeoc-)-Restes für die Festphasen-Peptidmethode durch die Synthese von Leucin-Enkephalinamid auf dem Merrifield-Harz mit dem 4-Methoxy-4'-(γ -carboxypropyloxy)-benzhydrylamin-Anker gezeigt.

Es wurde im Anschluss untersucht, inwiefern sich die Phenylcarbonate von t-Bumeoc und Adpoc als Einführungsreagenzien im Vergleich zur Einführung der p-Bumeoc-Schutzgruppe über die jeweiligen Phenylcarbonate eignen. Es zeigte sich, dass sich die entsprechenden Phenylcarbonate in Korrelation zu ihrer Stabilität mit den Aminosäuren umsetzen. Adpoc-phenylcarbonat setzt sich am schlechtesten um, p-Bumeocphenylcarbonat dagegen liefert die besten Ausbeuten. Bei der Synthese desselben konnte das entstehende Nebenprodukt, der p-Bumeocphenylether u.a. röntgenographisch nachgewiesen werden. Analog wurde bei Einführung der Bpoc-Schutzgruppe ein analoges Nebenprodukt beobachtet.

In einer weiteren Aufgabe wurde untersucht, inwiefern sich eine Isopropylgruppe anstelle der tert-Butylgruppe in para-Stellung auf die Säurelabilität auswirkt. Es wurde festgestellt, dass sich die Iso-Meoc-geschützten Aminosäuren bereits bei der Aufarbeitung erheblich zersetzen. Es konnte dünnschichtchromatographisch eine raschere Umsetzung, als es bei den p-Bumeoc-geschützten Aminosäuren der Fall war, beobachtet werden. Von Iso-Meoc-L-Ala-OH•DCHA konnten einige Kristalle erhalten werden, die mittels FD-MS-Spektroskopie bewiesen wurden. Die generelle Entstehung dieser Derivate ist somit sichergestellt.

Zur Charakterisierung und zum Strukturbeweis sämtlicher Verbindungen wurden Schmelzpunkte, Drehwerte, Elementaranalyse, DC, ASA, FD-MS-, FAB-MS-, HPLC-, ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektroskopie herangezogen.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. J. C. Hinsey, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **5**, 269-279 (1937)
2. J. D. Green, G. W. Harris, J. Physiol. (London) **108**, 359-361 (1949)
3. G. W. Harris, Neural Control of the pituitary gland, London (1955)
4. A. V. Schally, A. Arimura, Y. Baba, R. M. G. Nair, Biochem. Biophys. Res. Commun. **43**, 393-399 (1971)
5. M. Jutisz, Z. Naturforsch. **29 c**, 105 (1974)
6. E. Lunandes, K. Tsuji, G. Rampold, M. Ohta, K. Folkers, Biochem. Biophys. Res. Commun. **94**, 827-836 (1980)
7. M. Amoss, R. Burgus, R. Blackwell, W. Vale, R. Fellows, R. Guillemin, Biochem. Biophys. Res. Commun. **44**, 205-210 (1971)
8. R. Burgus, M. Butcher, M. Amoss, N. Ling, M. Monahan, J. Rivier, R. Fellows, R. Blackwell, W. Vale, R. Guillemin, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **69**, 278-282 (1972)
9. Y. Baba, H. Matsuo, A. V. Schally, Biochem. Biophys. Res. Commun. **44**, 459-463 (1971)
10. E. Mutschler, Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 6. Aufl., 165, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1991)
11. P. D. Bradley, I. Briggs, R. J. Gayton, L. A. Lambert, Nature **261**, 425-426 (1976), J. P. Gent, J. H. Wolstencroft, Nature **261**, 426-427 (1976)
12. J. L. De Coen, C. Humblet, M. H. J. Koch, FEBS Letters **73**, 38-42 (1977)
13. E. Wunsch, (Hrsg.) Synthese von Peptiden in Houben-Weyl's Methoden der Organischen Chemie (E. Müller, Hrsg.) 15 (4 edn.) Thieme Verlag Stuttgart (1974)
14. M. Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg (1984)
15. M. Bodanszky, A. Bodanszky, Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg (1984)
16. F. M. Finn, K. Hofmann, in The Protein II **3 ed.** (H. Neurath, R. L. Hill eds.), 105-237 (1976)

VII. LITERATURVERZEICHNIS

17. G. Barany, R. B. Merrifield, in *The Peptides 2* (E. Gross, J. Meienhofer Hrsg.), 1-284 (1979)
18. J. M. Stewart, J. D. Young, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, 2nd edn., 1. Pierce Chemical Company, Rockford, IL (1984)
19. G. Barany, N. Kneib-Cordonier, D. G. Mullen, *Int. J. Pept. Protein Res.* **30**, 705-739 (1987)
20. S. B. H. Kent, *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 957-989 (1988)
21. G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **35**, 161-214 (1990)
22. R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154 (1963)
23. A. R. Mitchell, B. W. Erickson, M. N. Ryabtsev, R. S. Hodges, R. B. Merrifield, *Am. Chem. Soc.* **98**, 7357-7362 (1976)
24. S.-S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 1328-1333 (1973)
25. R. C. Sheppard, B. J. Williams, *Int. J. Pept. Protein Res.* **20**, 451-454 (1982)
26. M. Mergler, R. Nyfeler, R. Tanner, J. Gosteli, P. Grogg, *Tetrahedron Lett.* 4009-4012 (1988)
27. P. G. Pietta, G. R. Marshall, *Chem. Comm.* 650-651 (1970)
28. G. R. Matsueda, J. M. Stewart, *Peptides 2*, 45 (1981)
29. E. Atherton, Ch. J. Logan, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. Perkin I*, 538-546 (1981)
30. F. Albericio, G. Barany, *Int. J. Pept. Protein Res.* **30**, 206-216 (1987)
31. B. Penke, J. Rivier, *J. Org. Chem.* **52**, 1197-1200 (1987)
32. P. Sieber, *Tetrahedron Lett.* **28**, 2107-2110 (1987)
33. H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **28**, 3787-3790 (1987)
34. G. Breipohl, J. Knolle, W. Stüber, *Tetrahedron Lett.* **28**, 5651-5654 (1987)
35. S. Funakoshi, E. Murayama, L. Guo, N. Fujii, H. Yajima, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 382-384 (1988)
36. J. Shao, Y.-H. Li und W. Voelter, *Int. J. Pept. Protein Res.* **36**, 182-187 (1990)
37. M. Meisenbach, W. Voelter, *Chem. Lett.*, **12**, 1265-1266 (1997)

VII. LITERATURVERZEICHNIS

38. M. Meisenbach, H. Echner, W. Voelter, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 849-850 (1997)
39. M. Meisenbach, H. Echner, H.-J. Kohlbau and W. Voelter, in: R. Epton (Ed.), *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis & Combinatorial Libraries*, Mayflower Scientific Ltd., Birmingham, England, 345-348 (1999)
40. H.-J. Kohlbau, M. Meisenbach, H. Echner and W. Voelter, in: R. Epton (Ed.), *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis & Combinatorial Libraries*, Mayflower Scientific Ltd., Birmingham, England, 319-322 (1999)
41. H.-J. Kohlbau, H. Echner, M. Meisenbach and W. Voelter, in: (S. Bajusz, F. Hudecz, Ed.) *Peptides 1998, Proceedings of the 25th European Peptide Symposium*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 222-223 (1999)
42. H. Hagenmaier, H. Frank, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 1973-1976 (1972)
43. N. C. Chaturvedi, G. F. Sigler, W. D. Fuller, M. S. Verlander, M. Goodman, in *Chemical Synthesis and Sequencing of Peptides and Proteins* (T.-Y. Li A. N. Schechter, R. L. Heinrikson, P. G. Condliffe, Hrsg.), 169 (1981)
44. W. D. Fuller, D. Marr-Leisy, N. C. Chaturvedi, G. F. Sigler, M. S. Verlander, in *Peptides: Synthesis, Structure, Function* (D. H. Rich, E. Gross, Hrsg.), 201-204 (1981)
45. L. Kisfaludy, I. Schön, *Synthesis*, 325-327 (1983)
46. R. Kristgen, R. C. Sheppard, W. Steglich, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1870-1871 (1987)
47. W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **103**, 2034-2040 (1970)
48. B. Castro, J.-R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Lett.* **14**, 1219-1222 (1975)
49. D. L. Nguyen, B. Castro, in *Peptide Chemistry*, 231 (T. Shiba, S. Sakakibara, Hrsg.), Protein Research Foundation, Osaka (1987)
50. R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillesen in *Peptides 1988* (G. Jung, E. Bayer Hrsg.), 37-39, Walter de Gruyter, Berlin (1989)
51. J. Diago-Meseguer, A. L. Palomo-Coll, J. R. Fernandez-Lizarbe, A. Zugaza-Bilbao, *Synthesis*, 547-551 (1980)

VII. LITERATURVERZEICHNIS

52. E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **34**, 595-598 (1970)
53. B. Gisin, *Anal. Chim. Acta* **58**, 248-249 (1972)
54. R. S. Hodges, R. B. Merrifield, *Anal. Biochem.* **65**, 241-272 (1975)
55. M. P. Reddy, P. J. Voelker, *Int. J. Peptide Protein Res.* **31**, 345-348 (1988)
56. V. Krchnak, J. Vagner, M. Lebl, *Int. J. Peptide Protein Res.* **32**, 415-416 (1988)
57. V. K. Sarin, S. B. H. Kent, J. P. Tam, R. B. Merrifield, *Anal. Biochem.* **117**, 147-157 (1981)
58. M. Goodman, C. Glaser, in *Peptides: Chemistry and Biochemistry*, Proc. 1th Am. Peptide Symp. (B. Weinstein, S. Lande, Hrsg.), 267 (1970)
59. H.-D. Jakubke, H. Jeschkeit, *Aminosäuren, Peptide, Proteine*, Verlag Chemie, Weinheim, 194 (1982)
60. W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **103**, 788-798 (1970)
61. E. Wunsch, F. Drees, *Chem. Ber.* **99**, 110-120 (1966)
62. D. T. Gish, P. G. Katsoyannis, G. P. Hess, R. J. Stedman, *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5954 (1956)
63. S. Mojsov, A. R. Mitchell, R. B. Merrifield, *J. Org. Chem.* **45**, 555-560 (1980)
64. H. Gausepohl, M. Kraft, R. Frank, *Int. J. Peptide Protein Res.* **34**, 287-294 (1989)
65. M. Bodanszky, J. Martinez, *Synthesis*, 333-356 (1981)
66. B. F. Gisin, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 3102-3106 (1972)
67. E. Pedroso, A. Grandas, X. de las Heras, R. Eritja, E. Giralt, *Tetrahedron Lett.* **27**, 743-746 (1986)
68. M. Ueki, M. Amemiya, *Tetrahedron Lett.* **28**, 6617-6620 (1987)
69. C.-D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **11**, 246-249 (1989)
70. Y. Kiso, K. Ukawa, T. Akita, *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 637-676 (1980)
71. H. Yajima, J. Kanaki, M. Kitajima, S. Funakoshi, *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 1214-1218 (1980)

VII. LITERATURVERZEICHNIS

72. K. Kitagawa, K. Kitada, Y. Kiso, T. Akita, S. Funakoshi, N. Fujii, H. Yajima, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 955-956 (1979)
73. A. Overby, A. Hassenbürger, F. Hillenkamp in M. L. Gross (Ed.), *Mass Spectrometry in Biological Sciences*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 181-197 (1992)
74. H. Kalbacher, *Dissertation Tübingen* (1980)
75. W. L. Haas, E. V. Krumkalns u. K. Gerzon, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 1988-1992 (1966)
76. Ch. Beni, *Dissertation, Tübingen* (1987)
77. W. Fuchs, H. Kalbacher, W. Voelter, *Org. Magn. Reson.* **17**, 157-162 (1981)
78. R. Schwyzer, C. H. Li, *Nature* **182**, 1669 (1958); E. Schnabel, C. H. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 4576-4578 (1960)
79. K. Hofmann, H. Gajima. E. T. Schwarz, *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 2289-2293 (1961)
80. P. G. Katsoyannis, *Am. J. Med.* **40**, 652-661 (1966)
81. T. Baba, H. Sugiyama, S. Seto, *Chem. Pharm. Bull.* **21**, 207-209 (1973)
82. S. Sano, S. Kawanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 3480-3484 (1975)
83. R. S. Feinberg, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 3485-3496 (1975)
84. S. Sakakibara, *Bull. Chem. Soc. Japan* **40**, 2164-2167 (1967); S. Sakakibara, Y. Kishida, Y. Kikuchi, R. Sakai, K. Kakiuchi, *Bull. Chem. Soc. Japan* **41**, 1273 (1968)
85. M. Fujino, O. Nishimura, M. Wakimasu, Ch. Kitada, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 668-669 (1980)
86. H. Yajima, M. Takeyama, J. Kanaki, O. Nishimura, M. Fujino, *Chem. Pharm. Bull.* **26**, 3752-3757 (1978)
87. H. Yajima, M. Takeyama, J. Kanaki, K. Mitani, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 482-483 (1978)
88. M. Fujino, O. Nishimura, M. Wakimazu u. C. Kitada, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 668-669 (1980)
89. H. Echner, W. Voelter, *Z. Naturforsch.* **42 b**, 1591-1594 (1987)
90. R. Colombo, F. Colombo, J. Jones, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 292-293 (1984)

VII. LITERATURVERZEICHNIS

91. R. Ficker, W. Hiller, S. Krauß, W. Voelter, *Zeitschrift für Kristallographie* **210**, 960 (R. Oldenbourg Verlag, München (1995))
92. E. Benedetti, M. R. Ciajolo & A. Maisto, *Acta Crystallogr. Sect. B.* **30**, 1783-1786 (1974)
93. J. Shao, S. Krauß, M. S. Shekhani, W. Voelter, in *Peptides*, 29-30 (1990)
94. B. E. B. Sandberg, U. Ragnarsson, *Int. J. Pept. Protein Res.* **6**, 111-119 (1974)
95. B. E. B. Sandberg, U. Ragnarsson, *Int. J. Pept. Protein Res.* **7**, 503-504 (1975)
96. G. Losse, D. Zeidler, Th. Grieshaber, *Liebigs Ann. Chem.* **715**, 196-203 (1968)
97. K. Blaha und J. Rudinger, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **30**, 585-598 (1965)
98. R. B. Homer, R. B. Moodie, H. N. Rydon, *Proc. Chem. Soc.*, 367-368 (1963)
99. L. P. Hammett, *J. Am. Chem. Soc.* **59**, 96-103 (1937)
100. H. H. Jaffe, *Chem. Rev.* **53**, 191-261 (1953)
101. H. C. Brown, Y. Okamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4979-4987 (1958)
102. H. D. Scharf, F. Döhring, *Chem. Ber.* **100**, 1761-1763 (1967)
103. W. van Hartingsveldt, P. E. Verkade, B. M. Wepster, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **75**, 349-354 (1956)
104. F. van Meurs, H. van Bekkum, *J. Org. Chem.*, **133**, 321-326 (1977)
105. D. R. Arnold, A. M. de P. Nicholas, M. S. Snow, *CJCHAG; Can. J. Chem.*, **EN**; **63**; 1150-1156 (1985)
106. L. Wackerle, I. Ugi, *Synthesis*, 598-599 (1975)
107. H. Franzen, U. Ragnarsson, *Acta. Chem. Scand.* **B 33**, 690-692 (1979)
108. P. Sieber, B. Iselin, *Helv.* **52**, 1525 (1969) (E. Wünsch, Houben-Weyl, 15, *Methoden der org. Chemie, Teil I*, (4 edn.), Thieme Verlag, Stuttgart (1974))
109. J. P. Tam, B. Merrifield in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, E. Gross, J. Meienhofer, eds.), **9**, 185-248, Academic Press, New York, San Francisco, London (1987)
110. *Atlas of Carbon-13 NMR DATA* (E. Breitmaier, G. Haas, W. Voelter), Vol. **2** (1997)

VII. LITERATURVERZEICHNIS

111. H. H. Hyman, R. A. Garber, *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 1847-1849 (1959)
112. U. A. Spitzer, T. W. Toone, R. Stewart, *Can. J. Chem.* **54**, 440-447 (1976)
113. Y. Okamoto, T. Inukai, H. C. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 4972-4976 (1958)
114. W. P. Jencks, *Acc. Chem. Res.* **13**, 161-169 (1980)
115. B. Riniker, B. Kamber, P. Sieber, *Helv. Chim. Acta* **58**, 1086-1094 (1975)
116. G. W. Anderson, J. E. Zimmermann, F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1839-1842 (1964)
117. P. Sykes, **9.** Auflage, *Reaktionsmechanismen der Org. Chemie*, 30-31 (1988)
118. G. Charbonnel-Jobic; J.-P. Guemas; B. Adelaere; J.-L. Parrain; J.-P. Quintard; BSCFAS; *Bull. Soc. Chim. Fr.; EN*; **132**, 624-636 (1995)
119. G. A. Ward, R. D. Mair, *Anal. Chem.* **41**, 538-540 (1969)
120. J. F. Norris, A. W. Olmstedt, *Org. Synth.* **I**, 144-145 (1932)
121. J. Geuze, C. Ruinard, J. Soeterbroek, P. E. Verkade, B.M. Wepster, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **75**, 301-310 (1956)
122. R. de Capeller, *Helv. Chim. Acta* **11**, 166-170 (1928)
123. W. Voelter, J. Müller, *Liebigs Ann. Chem.*, 248-260 (1983)
124. M. S. Carpenter, W. M. Easter, *J. Org. Chem.* **19**, 87-102 (1954)
125. M. G. J. Beets, W. Meerburg, H. van Essen, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **78**, 570-585 (1959)
126. M. Brenner, A. Niederwieser, G. Pataki in *Dünnschichtchromatographie* E. Stahl Ed.) 2. Aufl., 712, 842, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1962)
127. *Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie*, Firmenschrift der Fa. Merck, Darmstadt (1970)
128. F. Reindel, W. Hoppe, *Chem. Ber.* **87**, 1103-1107 (1954)
129. T. A. Graser, H. G. Godel, S. Albers, P. Földi, P. Fürst, *Anal. Biochem.* **151**, 142-152 (1985)
130. W. Voelter, H. Kalbacher, C. P. Ashton, E. Hannapel, *Int. J. Pept. Protein Res.* (im Druck)

VII. LITERATURVERZEICHNIS

131. G. Fluoret, *J. Med. Chem.*, **13**, 843-145 (1970)
132. Journal; Nishiguchi, Ikuzo; Hirashima, Tsuneaki; *JOCEAH; J. Org. Chem.; EN*; 50; 4; 539-541 (1985)
133. M. Walther, *JPHCA* **9**, *J. Pharm. Chim.* **27**, 476-478 (1938)
134. G. Baddeley, G. Holt, W. Pickles, *JCSOA* **9**; *J. Chem. Soc.*, 4162-4166 (1952)

Meine akademischen Lehrer waren:

H. P. T. Ammon, E. Bayer, M. Brendle, H. Eckstein, G. Gauglitz, J. Gelinek, W. Göpel, H. Hagenmaier, G. Häfelinger, M. Hanack, L. Heide, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, K. A. Kovar, D. Krug, U. Kunze, E. Lindner, I.-P. Lorenz, E. Mechler, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, H. Pommer, E. Reinhard, A. Rieker, W. Rundel, H. Safayhi, P. C. Schmidt, J. Schultz, V. Schurig, F. F. Seelig, G. Staudt, H. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, M. A. Wahl, U. Weber, W. Zimmermann.
