



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

Synthese von Tetrazolderivaten als Mimetik einer
cis-Peptidbindung

verfasst von / submitted by

Christian Denner Bachelor of Science (BSc)

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, Februar 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 862

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Masterstudium Chemie UG2002

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Walther Schmid

“What can be asserted without evidence,
can be dismissed without evidence.”

-Christopher Hitchens

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich in dieser aufregenden und teilweise doch sehr anstrengenden Zeit unterstützt und ermutigt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Walther Schmid für die interessante Themenstellung, das stets offene Ohr für Probleme und Fragen aller Art und auch die eine oder andere sehr interessante abendliche Nachbesprechung.

Weiters möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Schmid für das ausgezeichnete Arbeitsklima und viele nette Unterhaltungen über Chemie und alle anderen relevanten Themen bedanken. Hervorheben möchte ich dabei meine Labor und Bürokollegen Christopher Alber und Manuel Gintner, sowie unsere Technikerin Gerlinde Benesch, die immer bei kleinen und großen Problemen, egal ob chemischer oder privater Natur, zur Verfügung standen.

Außerdem möchte ich mich bei der NMR-Abteilung für das Messen unzähliger Spektren und die Hilfe und Geduld bei technischen Problemen bedanken.

Man darf natürlich auch alle Freunde und Kollegen nicht unerwähnt lassen, die mich nach dem Labor, teilweise bis in die Morgenstunden, dabei unterstützt haben Probleme zu lösen oder eine schöne Zeit zu haben. Deswegen möchte ich mich hier auch noch bei Patrick Berger, Can Araman, Alanca Schmid, Hanspeter Kählig, Björn Bielec und Martin Berger bedanken.

Es gibt natürlich auch viele Menschen außerhalb der Universität denen hier Dank gebührt.

Allen voran meinen Eltern und Christa Graf, die mich zu jeder Zeit emotional und finanziell unterstützt haben. Natürlich auch meiner Freundin Jennie die während der letzten Monate sehr viel Geduld und Verständnis gezeigt hat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden, die mich seit Jahren begleiten: Andreas Zausinger, Christian Herzig, Michael Knauseder, Kristina Schodl und Anna-Luise Braune die mich zusätzlich beim Verbessern dieser Arbeit unterstützt hat.

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Einleitung	3
2.1	Proteine	3
2.2	Peptidbindung	4
2.3	Proteinbiosynthese	5
2.3.1	Transkription	6
2.3.2	Translation	6
2.3.3	Posttranslationale Modifikationen	8
2.4	Synthese im Labor	9
2.4.1	Linker	9
2.4.2	Schutzgruppen	10
2.4.3	Elongation	14
2.4.4	Ligation	15
2.5	1,3-Dipolare Cycloaddition	16
2.6	Tetrazol	17
2.6.1	Synthese	19
2.7	Aminosäureazide durch Diazotransfer	20
3	Ergebnisse und Diskussion	22
3.1	Ziel der Arbeit	22
3.2	Substrat Herstellung	23
3.2.1	Imidazole-1-sulfonyl Azid	23
3.2.2	Aminosäureazid Herstellung	24
3.2.3	Aminosäurenitril Herstellung	26
3.3	Katalyse Experimente	29
4	Zusammenfassung	36
5	Abstract	37
6	Experimentalteil	38
6.1	Allgemeines	38
6.2	Durchführungen	39
6.2.1	Synthese von 1-Azidosulfonyl-1H-imidazol-3-ium Hydrogensulfat	39
6.2.2	Synthese von (S)-2-Azido-3-methylbutansäure	40
6.2.3	Synthese von (2S)-2-Azido-3-methylbutansäuremethylester	41

6.2.4	Synthese von (2S,3S)-2-Azido-3-methylpentansäure	42
6.2.5	Synthese von (2S,3S)-2-Azido-3-methylpentansäuremethylester	43
6.2.6	Synthese von (2S)-2-Azido-3-phenylpropansäure	44
6.2.7	Synthese von (2S)-2-Azido-3-phenylpropansäuremethylester	45
6.2.8	Synthese von 2-Azidoessigsäure	46
6.2.9	Synthese von 2-Azidoessigsäuremethylester	47
6.2.10	Synthese von Cbz-Glycin	48
6.2.11	Synthese von Benzyl(2-amino-2-oxoethyl)carbamate	49
6.2.12	Synthese von Benzyl(cyanomethyl)carbamate	50
6.2.13	Synthese von (2S,3S)-Benzyl(1-amino-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)carbamate .	51
6.2.14	Synthese von (1S,2S)-Benzyl(1-cyano-2-methylbutyl)carbamate.....	52
6.2.15	Synthese von (2S)-Cbz-Phenylalanin.....	53
6.2.16	Synthese von (2S)-Benzyl(1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamate	54
6.2.17	Synthese von (1S)-Benzyl(1-cyano-2-phenylethyl)carbamate	55
6.2.18	Synthese von (2S)-Cbz-Valin.....	56
6.2.19	Synthese Benzyl-(S)-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)carbamate.....	57
6.2.20	Synthese Benzyl-(S)-(1-cyano-2-methylpropyl)carbamate	58
6.2.21	Synthese von tert-Butyl (cyanomethyl)carbamate	59
6.2.22	Synthese von Methyl 2-(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)acetat	60
6.2.23	Synthese von Methyl (S)-2-(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)-3-methylbutanoat und Methyl (R)-2-(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)-3-methylbutanoat	61
6.2.24	Synthese von Methyl (2S,3S)-2-(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)-3-methylpentanoat und Methyl (2R,3S)-2-(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)-3-methylpentanoat	62
6.2.25	Synthese von Methyl (2S)-2-(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)-3-phenylpropanoat und Methyl (2R)-2-(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)-3-phenylpropanoat	63
7	Anhang.....	64
7.1	Abkürzungsverzeichnis	64
7.2	Abbildungsverzeichnis	67
7.3	Literaturzitate.....	69

2 Einleitung

2.1 Proteine

Proteine sind organische Makromoleküle aus Aminosäuren, die über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Natürliche Peptide und Proteine, die durch DNA kodiert sind, enthalten 20 unterschiedliche Aminosäuren, sie werden als Kanonische Aminosäuren bezeichnet.

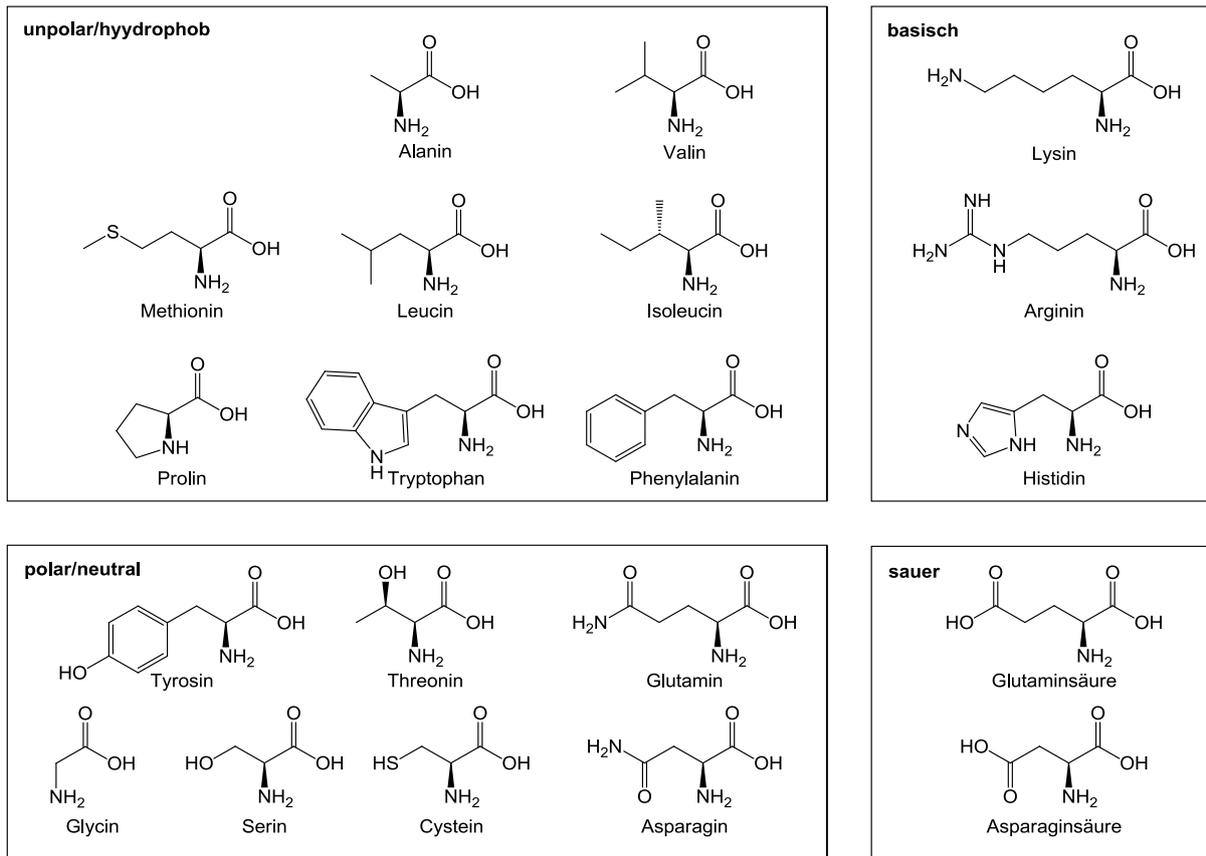


Abbildung 1, die 20 kanonischen Aminosäuren

Zusätzlich gibt es noch weitere natürlich vorkommende, nichtkanonische Aminosäuren wie Selenocystein oder Pyrrolysin. Sie besitzen keine eigene kanonische tRNA, sondern werden durch spezielle tRNA-Einheiten (zB.: tRNA^{Sec}) eingebaut.¹ Die unterschiedlichen Seitenketten der Aminosäuren liefern dabei einen großen Beitrag zu den unterschiedlichen Eigenschaften von Proteinen.

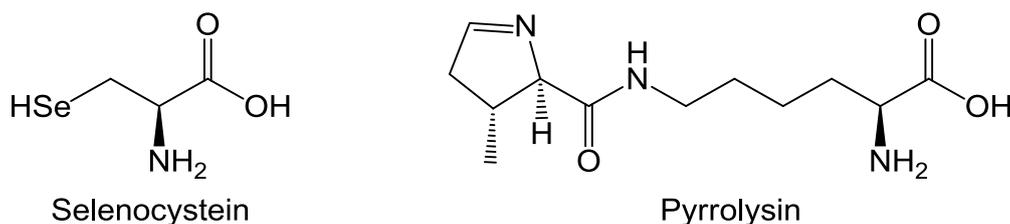


Abbildung 2, nichtkanonische Aminosäuren

Je nach ihrer Struktur kann man sie in globuläre und fibrilläre Proteine einteilen. Eine Einteilung nach der Funktion ist hingegen schwieriger, da Proteine im Körper unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Es gibt Strukturproteine, wie Keratin oder Kollagen, die dazu dienen, Geweben und Zellen die nötige Festigkeit oder Elastizität zu geben. Solche Proteine bestehen meist aus einer wiederkehrenden Aminosäuresequenz, wodurch sich eine geordnete Sekundärstruktur ergibt. Eine zweite wichtige Gruppe sind die Enzyme. Sie sind Biokatalysatoren und ermöglichen und beschleunigen eine Vielzahl von biochemischen Reaktionen. Sie werden unter anderem bei Stoffwechselfvorgängen, Transkription, Translation und DNA-Replikation eingesetzt. Transportproteine binden spezifisch Ionen oder Moleküle und transportieren sie durch Zellmembranen im Blutplasma oder innerhalb der Zelle, bekannte Beispiele dafür sind Hämoglobin, Albumin oder P-Glycoprotein. Weitere wichtige Klassen sind Bewegungsproteine, wie Actin und Myosin in Muskeln, Speicherproteine, Proteine des Immunsystems oder regulatorische Proteine, die als Hormone wirken.

2.2 Peptidbindung

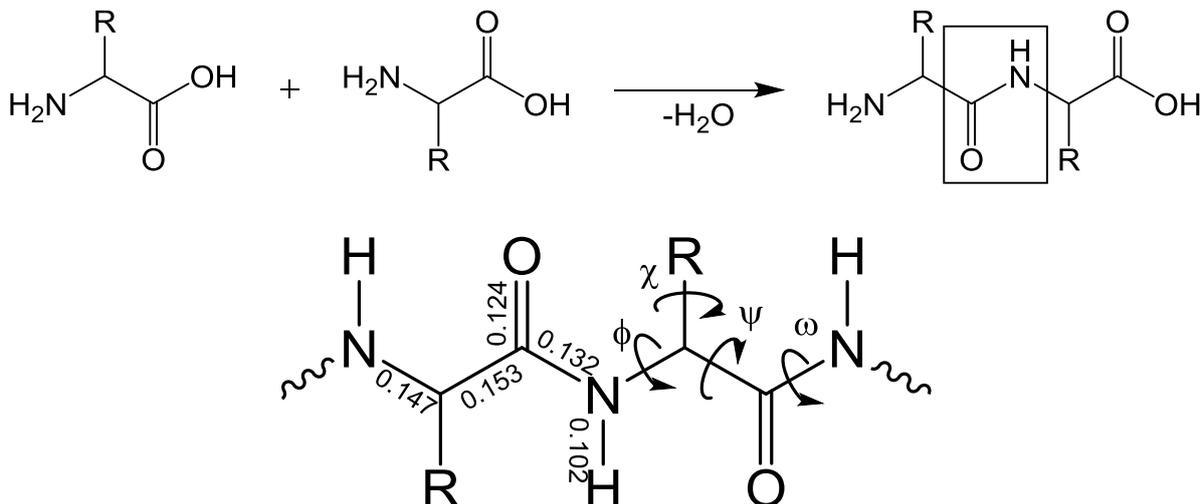


Abbildung 3, Peptidbindungswinkel und Bindungslängen

Die Peptidbindung ist eine Amidbindung, die formal aus der Kondensation von zwei Aminosäuren entsteht. Die Konformation der Peptidkette kann durch die Bindungswinkel ϕ (phi) ψ (psi) ω (omega) und die jeweiligen Bindungslängen charakterisiert werden.² 1952 konnte von Pauling und Corey durch Röntgenkristallographie festgestellt werden, dass der C-N Bindungswinkel in linearen Peptiden kürzer ist, als bei normalen Einfachbindungen.³ Dieser partielle Doppelbindungscharakter führt zu einer erheblichen Einschränkung der Rotationsfreiheit mit einer Rotationsbarriere von $\sim 105 \text{ kJ mol}^{-1}$.¹ Deshalb können Peptidbindungen auch als zwei unterschiedliche Rotamere vorliegen.

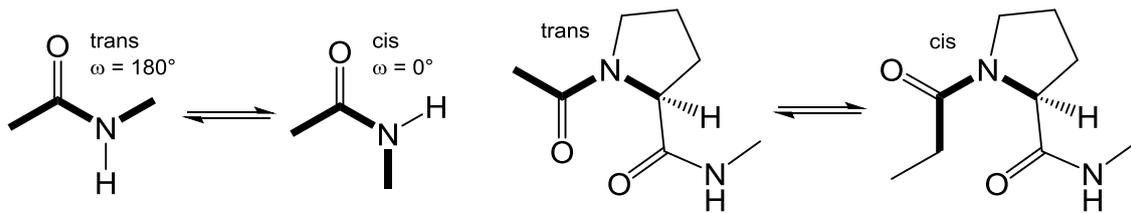


Abbildung 4, Konfiguration der Peptidbindung

In den meisten Fällen liegt die Peptidbindung in der trans-Konfiguration vor, die auch energetisch mit $\sim 8 \text{ kJ mol}^{-1}$ begünstigt ist. Einzige Ausnahme bildet hier die Aminosäure Prolin, bei der die Energie der trans-Konfiguration höher liegt, wodurch die Differenz der beiden Konfigurationen sinkt. Die Häufigkeit von cis-konfigurierten Peptidbindungen mit Prolin beträgt $\sim 6.0\%$, was im Vergleich zu allen anderen Aminosäuren mit $\sim 0.04\%$ cis einer 100 mal höheren Häufigkeit entspricht.^{1,4} Wie in der unten angeführten Tabelle zu sehen ist, werden cis-Peptidbindungen vor allem in niedrig aufgelösten Röntgenstrukturen deutlich seltener erkannt, wodurch man davon ausgehen kann, dass in Summe eigentlich eine viel höhere Anzahl an cis-Peptidbindungen vorliegt.^{4,5}

Auflösung	Alle	<2.0 Å	2.0 Å - 2.5 Å	$\geq 2.5 \text{ Å}$
Proteine	571	291	184	96
Peptidbindungen	153209	72567	52194	28448
Xaa-Pro	7413	3407	2566	1440
Xaa-nonPro	145796	69160	49628	27008
cis-Peptidbindungen	427 (0.28%)	232 (0.32%)	140 (0.27%)	55 (0.19%)
Xaa-Pro	386 (5.21%)	205 (6.02%)	129 (5.03%)	52 (3.61%)
Xaa-nonPro	41 (0.028%)	27 (0.039%)	11 (0.022%)	3 (0.011%)

Abbildung 5, Häufigkeit der cis-Peptidbindung

Doch obwohl die Häufigkeit von cis-Peptidbindungen relativ gering ist, spielen sie in vielen biologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Proteinfaltung, eine wichtige Rolle. NonProlin-cis-Peptidbindungen kommen in unterschiedlichen Proteinen vor, wie zum Beispiel Aminopeptidase (1amp), Mitochondrial F1-ATPase (1bmf), DNA-Polymerase β (1zqa) und Trimethylamin-Dehydrogenase (2tmd).⁵

2.3 Proteinbiosynthese

Die Bildung einer Peptidbindung ist grundsätzlich eine relativ einfache Reaktion, die Biosynthese von Peptiden und Proteinen ist jedoch ein hoch komplexer Prozess. Bei der ribosomalen Peptidsynthese wird der genetische Code der Desoxyribonukleinsäure (DNA) gelesen und von zwei unterschiedlichen Ribonukleinsäuren weiterverarbeitet. Messenger RNA (mRNA) schleust die Information der DNA aus dem Zellkern zu den Ribosomen, transfer RNA (tRNA) ist dafür zuständig, die Aminosäuren enzymatisch zum Ort der Proteinsynthese zu transportieren. Nach abgeschlossener Elongation wird das Peptid abgespalten und durch posttranslationale Modifikationen zu einem funktionsfähigen Protein beziehungsweise Enzym.

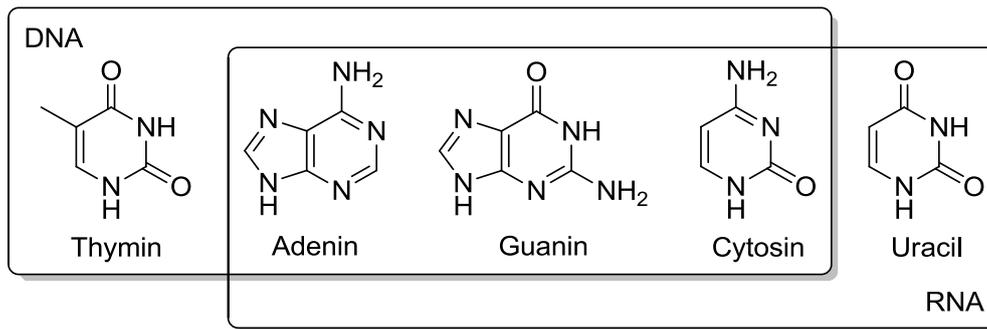


Abbildung 6, DNA und RNA Nucleobasen

2.3.1 Transkription

Im ersten Schritt der Transkription wird durch RNA-Polymerase die DNA entwunden und legt dadurch ca. 10-20 Basen frei. Hier können sich nun die komplementären Ribonukleotide anlagern. Thymin wird bei der RNA durch Uracil ersetzt, alle anderen Basen entsprechen denen der DNA. Die Translation führt vom 3'-Ende zum 5'-Ende der DNA und wird durch einen Terminator beendet. Die so hergestellte unreife RNA muss bei Eukaryoten nun durch posttranskriptionale Modifikationen noch stabilisiert und für den Transport aus dem Nukleus vorbereitet werden.

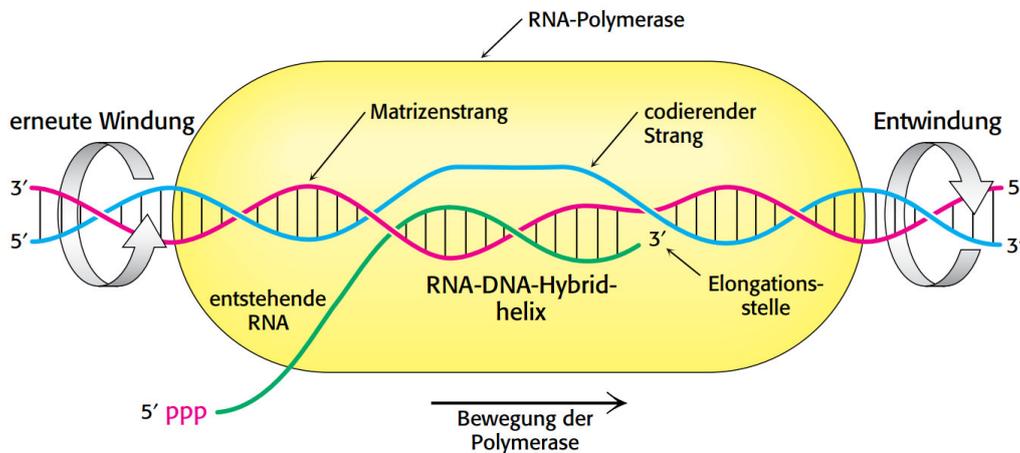


Abbildung 7, Transkription⁶

2.3.2 Translation

Als nächstes erfolgt die Translation. Dabei werden zuerst die Aminosäuren durch Aminoacyl-tRNA-Synthase(aatRS) aktiviert. In einem ersten Schritt reagieren sie dabei mit ATP unter Elimination von Pyrophosphat. Das dabei generierte gemischte Anhydrid bleibt dabei fest an das Enzym gebunden und wird anschließend auf die jeweilige tRNA übertragen. Die Triebkraft dieser Reaktion ist die Bildung von anorganischen Pyrophosphat im ersten Schritt. Für jede Aminosäure gibt es dabei mindestens eine spezifische tRNA und auch eine eigene Aminoacyl-tRNA-Synthase. Die Spezifität dieser Reaktion ist genauso essentiell für die Proteinsynthese, wie die Anticodon-Codon-Wechselwirkung zwischen DNA, mRNA und tRNA.

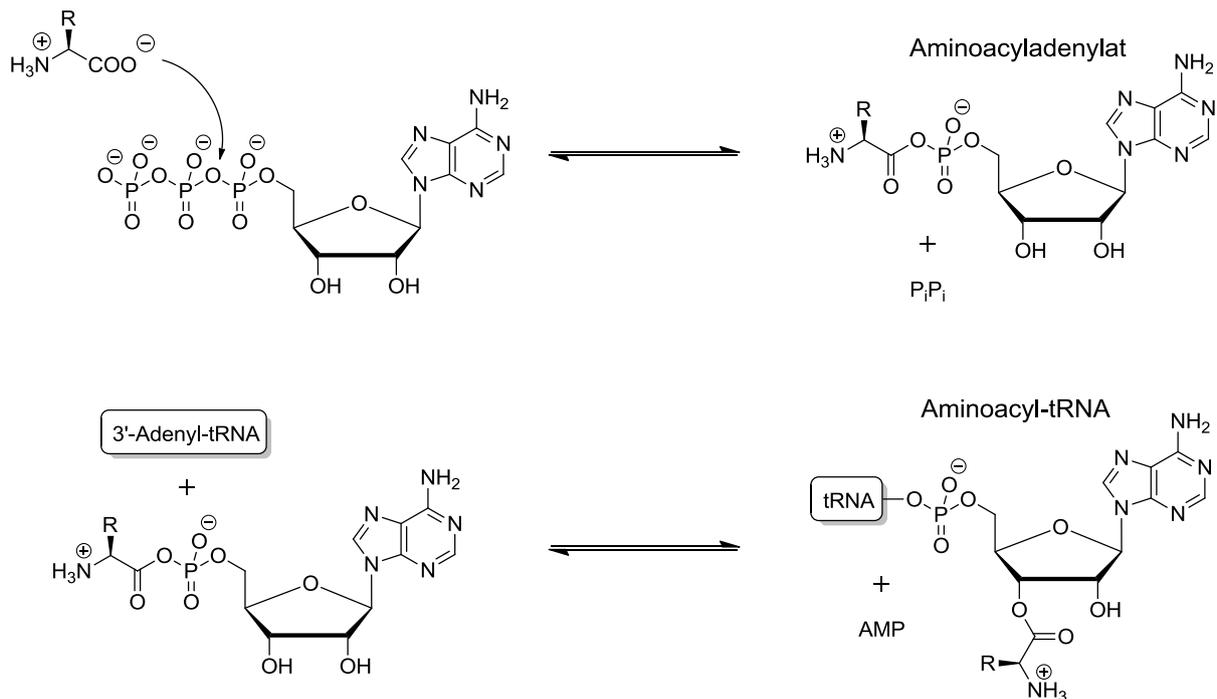


Abbildung 8, 2-stufige Katalyse durch Aminoacyl-tRNA-Synthase

Bei den Ribosomen wird nun die jeweilige tRNA durch Codon-Anticodon-Wechselwirkung mit der mRNA ausgewählt. Die Peptidsynthese startet beim N-Terminus, wobei das Lesen der mRNA von 5'-Ende in Richtung 3'-Ende erfolgt. Der Vorgang beginnt mit der Anlagerung der kleinen Untereinheit des Ribosoms, die so lange an der mRNA entlang wandert, bis sie das Startcodon AUG erreicht. Unter GTP-Verbrauch wird nun auch die große Untereinheit des Ribosoms angelagert, die sich in A- und P-Bindungsstelle gliedert. Die Elongation beginnt mit der zum Startcodon dazu passenden Methionin-tRNA in der P-Bindungsstelle. Die zweite tRNA kann sich nun an der A-Bindungsstelle anlagern. Durch Peptidyltransferase werden die Aminosäuren miteinander verknüpft und die erste tRNA verlässt ohne Aminosäure das Ribosom. Die Peptidbindungsknüpfung erfolgt durch nukleophilen Angriff des Amins der Aminosäure in der A-Bindungsstelle am Carboxylkohlenstoff der schon gebundenen Aminosäure. Nun wandert das Ribosom zum nächsten Basentriplett, wodurch sich die tRNA, die nun ein Dipeptid trägt, wieder in der P-Bindungsstelle befindet. Dieser Vorgang wird nun so lange wiederholt, bis das Ribosom ein Stopcodon erreicht. Terminationsfaktoren (RF1, RF2) erkennen diese Basenabfolgen und sorgen in weiterer Folge für die Bindungsspaltung zwischen letzter Aminosäure und tRNA.

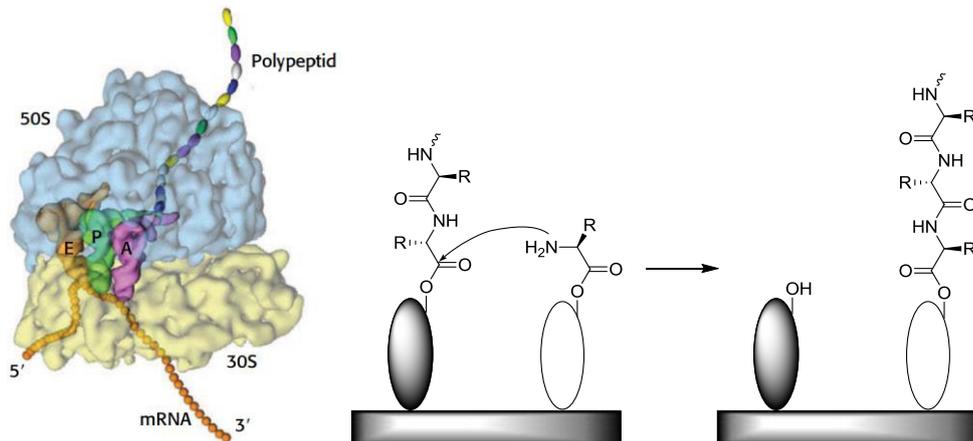


Abbildung 9, links: Ribosom⁶, rechts: Übergang der Peptidkette von der P- zur A-Bindungsstelle

2.3.3 Posttranslationale Modifikationen

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Proteinbiosynthese sind posttranslationale Modifikationen. Dabei werden Proteine nach abgeschlossener Translation und teilweise auch schon währenddessen durch spezielle Enzyme modifiziert, gefaltet oder mit speziellen prostetischen Gruppen verknüpft. Beispiele für solche Modifikationen sind die Abspaltung des N-terminalen Methionylrests, der aufgrund des Startcodons vorgegeben ist, durch das Membranprotein Methionyl-Aminopeptidase. Auch das selektive Entfernen von Signalsequenzen oder Teilsequenzen spielt bei der Herstellung vieler Proteine eine wichtige Rolle. Eines der bekanntesten Beispiele ist dabei wohl die Insulinherstellung. In einem ersten Schritt werden dabei drei Disulfidbrücken gebildet und am N-Terminus die Signalsequenz entfernt, wodurch Preproinsulin zu Proinsulin wird. Anschließend wird durch Proprotein-Convertase das sogenannte C-Peptid in der Mitte der Peptidkette entfernt. Es entstehen zwei Peptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Aus dem durch Translation erzeugten Präprotein, das aus 110 Aminosäuren besteht, wird so durch posttranslationale Modifikationen das nur noch 51 Aminosäuren große Insulin.^{1,7}

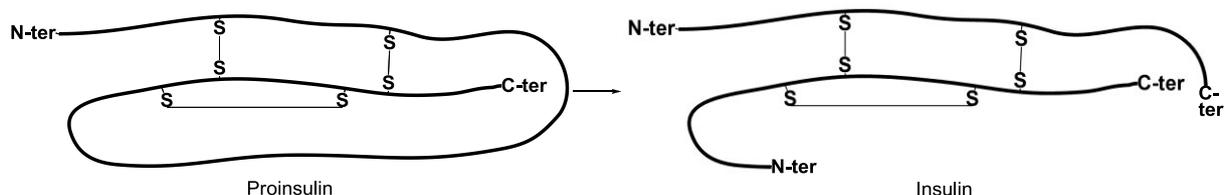


Abbildung 10, posttranslationale Modifikationen des Insulin

Weitere wichtige Modifikationen sind die Derivatisierung einzelner Aminosäuren durch anorganische Reste, wie zum Beispiel Prolin zu Hydroxyprolin. Auch eine Vielzahl von organischen Molekülen kann nachträglich in Proteine eingebaut werden. Wichtige Vertreter sind dabei Saccharide und Lipide, die unter anderem der Zell-Zell-Erkennung oder der Verankerung in der Zellmembran dienen. Unter diese Kategorie fällt auch die Verknüpfung mit Cofaktoren, die für die Funktion vieler Proteine und Enzyme entscheidend ist. Dabei handelt es sich um Substanzen wie Häme, Biotin oder Flavine, die im aktiven Zentrum von Proteinen sitzen und für katalytische Reaktionen oder die Bindung kleiner Moleküle, wie zum Beispiel Sauerstoff, unerlässlich sind.

2.4 Synthese im Labor

Im Gegensatz zur Proteinbiosynthese, die wohl über viele hundert Millionen Jahre perfektioniert wurde und große Proteine innerhalb von Minuten herstellen kann, ist die Synthese im Labor eine noch relativ junge Methode. Es dauerte über zwei Jahre bis Helmut Zahn 1963 die erste Synthese von funktionsfähigem Insulin publizieren konnte.⁸ Ein weiterer großer Durchbruch war die erste Festphasensynthese durch Merrifield 1963, die als der Vorläufer der modernen Peptidsynthese gilt.⁹

2.4.1 Linker

Bei der Festphasensynthese wird die erste Aminosäure kovalent durch Linker mit kleinen Polymerkügelchen aus Polystyrol oder Polyethylenglykol verknüpft. Einige der am Häufigsten verwendeten Linker sind Merrifield, Wang und Rink-Amid.

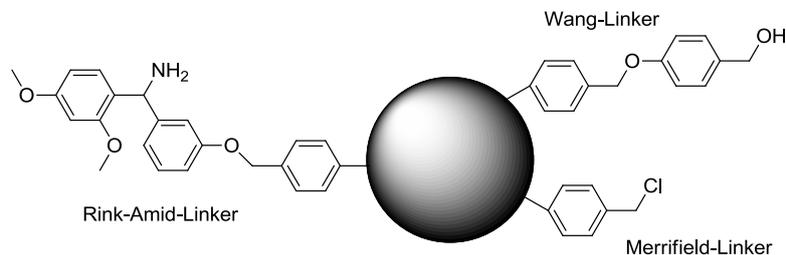


Abbildung 11, Linker-Systeme

Nun muss die erste Aminosäure mit dem Linker verknüpft werden. Je nach Schutzgruppenstrategie und Linker werden dafür natürlich andere Methoden verwendet. Beim Merrifield-Linker werden die Cäsiumsalze der jeweiligen Aminosäurecarboxylate zur nukleophilen Substitution unter Rückfluss in organischen Lösungsmitteln, wie Ethanol oder Dioxan erhitzt. Der entstandene Ester kann dann nach erfolgter Peptidsynthese durch sehr starke Säuren wie HF, TFMSA oder HBr/TFA abgespalten werden.¹ Diese Methode wurde vorwiegend mit Boc-Schutzgruppen verwendet, wird aber heutzutage nur noch für die Synthese kleiner Peptide eingesetzt, da die extrem sauren Bedingungen bei komplexen Peptiden zu Nebenreaktionen führen können. Ein weiterer Nachteil des Merrifield-Linkers ist die nicht vollständige Stabilität bei der sauren Abspaltung der Boc-Schutzgruppe.

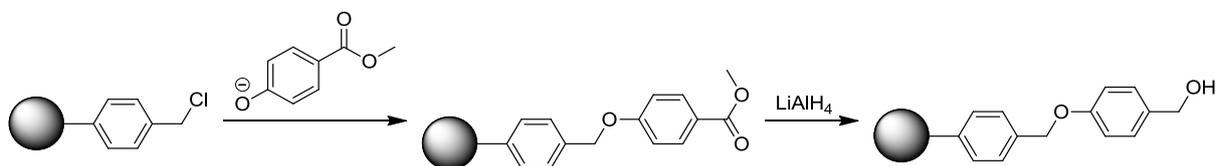


Abbildung 12, Synthese des Wang-Linkers

Der Wang-Linker kann durch eine Williamson-Ethersynthese mit Methyl-4-hydroxybenzoat und anschließender Reduktion mit LiAlH₄ aus dem Merrifield-Linker hergestellt werden.¹⁰ Zur Kupplung mit der ersten Aminosäure werden in diesem Fall aktive Ester, symmetrische Anhydride oder DCC verwendet. Der Linker ist deutlich säurelabiler und kann dadurch schon

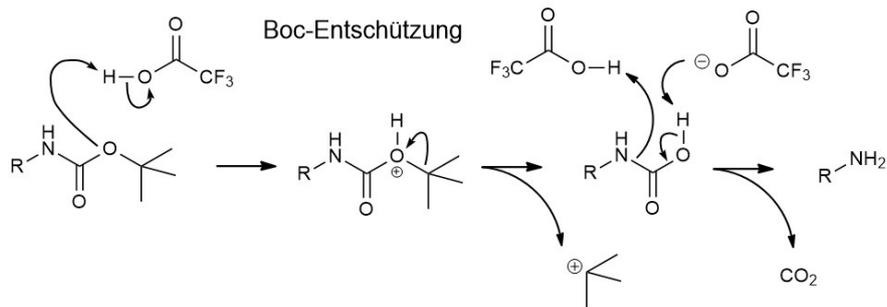


Abbildung 15, Mechanismus der Boc-Entschützung

Die für die finale Abspaltung vom Linker nötigen, sehr extremen Bedingungen haben auch dazu geführt, dass man auf der Suche nach neuen basenlabilen Schutzgruppen war, bei denen mit milderen Reaktionsbedingungen gearbeitet werden kann. Heutzutage ist deswegen in den meisten Fällen Fmoc die Methode der Wahl. Die Herstellung der geschützten Aminosäuren erfolgt dabei durch Reaktion mit Fmoc-Cl, die Ausbeuten sind hoch und die kristallinen Produkte können im Kühlschrank über längere Zeit gelagert werden. Nach erfolgreicher Verknüpfung erfolgt die Entschützung unter milden basischen Bedingungen durch Piperidin.

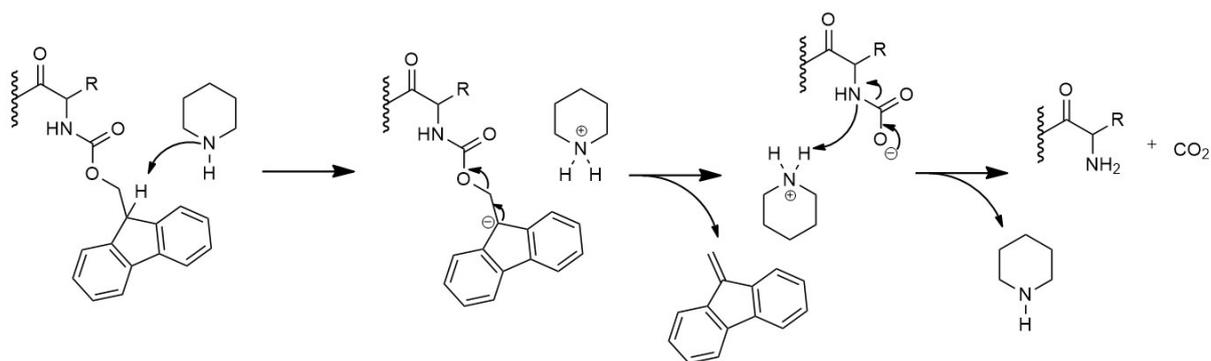


Abbildung 16, Mechanismus der Fmoc-Entschützung

Fmoc bietet jedoch auch noch weitere entscheidende Vorteile. Unter anderem ermöglicht es die direkte Reaktionskontrolle über UV-Spektroskopie durch die Fluorenyl-Gruppe, was vor allem in automatischen Synthesizern zur Anwendung kommt. Weiter können durch die orthogonale Fmoc-Methode auch säurelabile Seitenkettenschutzgruppen zum Einsatz kommen, die dann in Folge direkt mit dem Linker abgespalten werden können. Auch der Preis von geschützten Aminosäuren ist in den letzten Jahren durch die extreme Nachfrage deutlich gesunken. Die Nachteile gegenüber der Boc-Methode sind die etwas längeren Reaktionszeiten, die schlechtere Löslichkeit des entstehenden Peptids und Probleme mit Aggregation bei speziellen Aminosäuresequenzen.

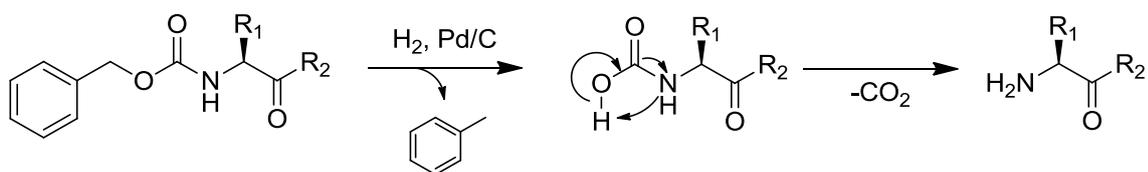


Abbildung 17, Cbz-Entschützung

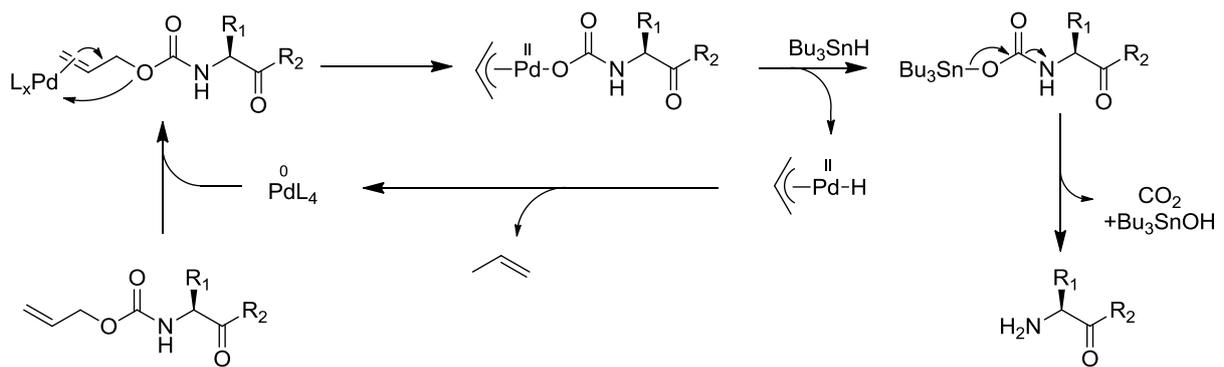


Abbildung 18, Alloc-Entschützung

Alle weiteren N-terminalen Schutzgruppen haben im Vergleich nur sehr geringe Bedeutung. Erwähnen sollte man jedoch noch die Cbz/Z-Schutzgruppe, die mittels HBr/Essigsäure oder Pd/H₂ abgespalten werden kann und auch teilweise zur Seitenkettenschutzgruppe eingesetzt wird. Außerdem relevant ist die Alloc-Schutzgruppe, sie ist ebenfalls orthogonal und kann mit Tetrakis(triphenylphosphan)palladium(0) und einem Nukleophil abgespalten werden. Sie findet ihre Anwendung vorwiegend bei der Synthese cyclischer Peptide oder in Seitenketten.

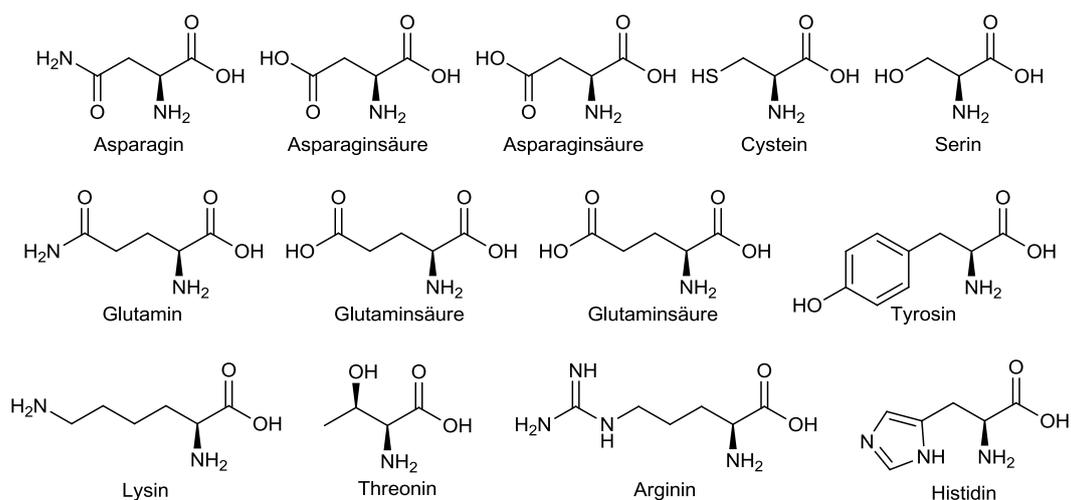


Abbildung 19, Aminosäuren die eventuell Seitenkettenschutzgruppen benötigen

Spezielle Seitenkettenschutzgruppen gibt es in unterschiedlichen Formen, sie müssen natürlich genau auf die N-terminale Schutzgruppe abgestimmt sein. In Abbildung 20 gibt es eine kurze Übersicht über einige der gängigen Schutzgruppen, Abspaltbedingungen und Stabilität gegenüber anderen Methoden.

AS	Struktur	Name	Abspaltung	Stabil gegen	AS	Struktur	Name	Abspaltung	Stabil gegen
Lys		Cl-Z	Pd/H ₂	Boc, Fmoc, Alloc	Cys		Tmob	1) 10% TFA 2) I ₂	Fmoc, Alloc
		Boc	25-50% TFA	Fmoc, Z, Alloc			Mob	1) HF 2) TFMSA	Boc, Fmoc, Alloc
		Fmoc	20% Piperidin in DMF	Boc, Z, Alloc		weitere siehe: Trt, Xan, Bn, tBu, Fmoc, Alloc			
		tfa	0,2N NaOH	Boc, Z, Alloc	Hys		Bum	TFA	Fmoc, Z
		Msc	0,025-0,5 M Ba(OH) ₂	Boc, Z, Alloc			Dmbz	NH ₃ Dioxan	Boc, Fmoc
		Alloc	Pd(PPh) ₃ cat.	Boc, Fmoc		weitere siehe: Tos, Trt, Boc, Fmoc			
Asp Glu		Bn	1) H ₂ cat. 2) TFMSA	Boc, Fmoc, Alloc	Ser Thr		TBDMS	1) TFA 2) AcOH/THF	Fmoc
		tBu	90% TFA	Fmoc, Z, Alloc			Poc	MoS-Salz	Boc, Fmoc
		pNB	1) SnCl ₂ 2) H ₂ cat.	Boc, Fmoc, Z, Alloc			Dmnb	Photolysis	Boc, Fmoc
		Al	Pd(PPh) ₃ cat.	Boc, Fmoc		weitere siehe: Bn, tBu, Trt			
Asn Gln		Xan	90% TFA	Fmoc, Alloc	Tyr		Dcb	HF	Boc, Fmoc, Alloc
		Trt	TFA/H ₂ O/EDT 90/5/5	Fmoc, Alloc			Nmec	25% TFA	Fmoc
Arg		Tos	1) HF 2) Na/NH ₃	Boc, Fmoc, Alloc	weitere siehe: Bn, Z, Boc, Trt; TBDMS, Al, Poc				
		MIS	50% TFA	Fmoc, Alloc	Trp		For	1) HF 2) NH ₂ OH	Boc
		Bis-Boc	90% TFA	Fmoc, Alloc			Hoc	HF	Boc, Fmoc, Alloc
	weitere siehe: tfa, Z, Alloc					weitere siehe: Boc, Alloc			

Abbildung 20, Seitenkettenschutzgruppen¹³

2.4.3 Elongation

Nach der Verknüpfung der ersten Aminosäure und der Wahl der Schutzgruppenstrategie folgt die Kettenverlängerung. Ein wichtiger Punkt dabei ist das richtige Kupplungsreagenz. Da sich die Kupplung, als auch die Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe bis zum Erreichen der gewünschten Kettenlänge viele Male wiederholt, ist besonders auf extrem hohe Ausbeuten und geringe Fehlerhäufigkeit zu achten. Generell versteht man unter Kupplungsreagenzien elektronenziehende Substanzen, die den Carbonyl-Kohlenstoff der einzuführenden Aminosäure soweit aktivieren, dass das Amin dort problemlos angreifen kann. Einige Beispiele für solche Kupplungsreagenzien sind Carbodiimide, gemischte oder symmetrische Anhydride, Phosphonium- oder Uroniumsalze.^{14,15}

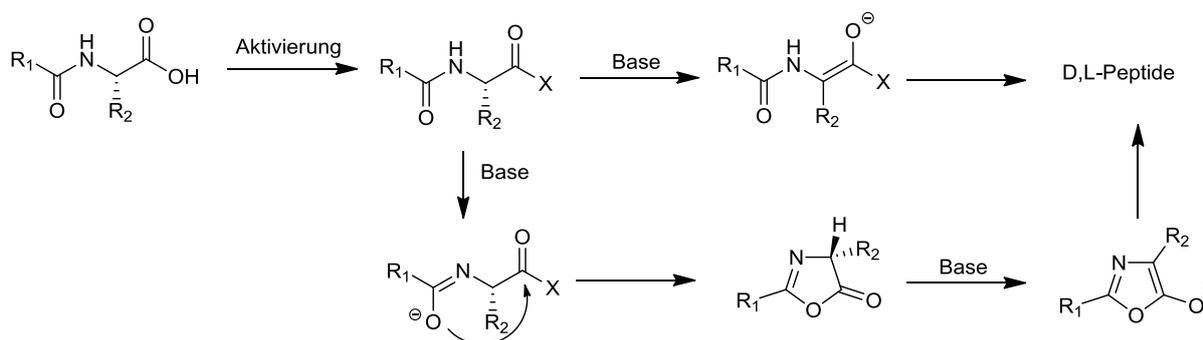


Abbildung 21, Aminosäureaktivierung mit Nebenreaktionen

Mögliche Nebenreaktionen bei der Aktivierung sind unter anderem Enolisation oder Oxazolone-Bildung. Diese sollten soweit wie möglich unterbunden werden, da sie zur Racemisierung führen können. Eine der vor allem früher häufig eingesetzten Kupplungsreagenzien sind Carbodiimide, davon sind vor allem DCC(Dicyclohexylcarbodiimid) und DIC(Diisopropylcarbodiimid) von Bedeutung. Sie werden mit Additiven, wie HOBt (1-Hydroxybenzotriazol) und HOAt (1-Hydroxy-7-azabenzotriazol) verwendet, um Racemisierung zu unterbinden. Außerdem können dadurch Reaktionszeiten und Ausbeuten verbessert werden.^{16,17} Der Mechanismus entspricht grundsätzlich der einer Steglich-Veresterung, wobei der gebildete O-Acylisoumstoff dann entweder direkt zum Amid oder vorher zu einem anderen aktiven Ester reagieren kann.

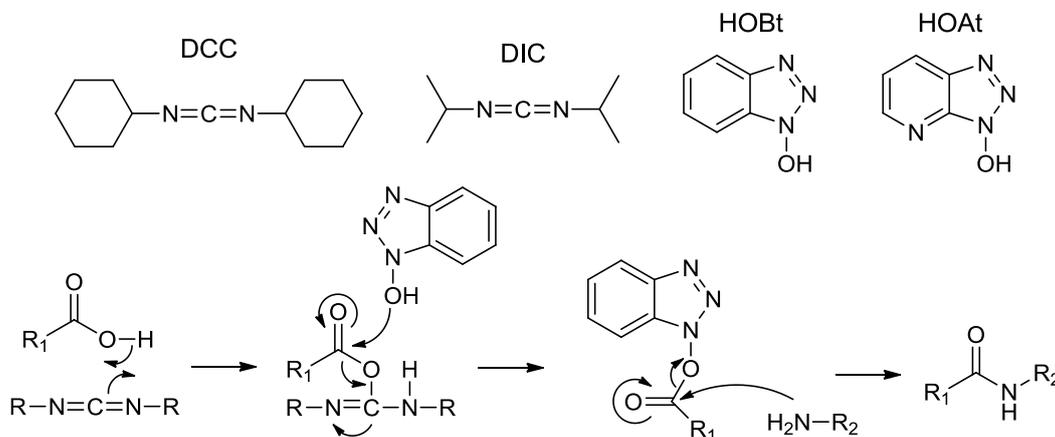


Abbildung 22, Carbodiimid-Mechanismus und Additive

Weitere Beispiele für häufig eingesetzte Kupplungsreagenzien sind Phosphoniumsalze, wie BOP oder PyBOP, die erstmals 1975 eingesetzt wurden.¹⁸ Sie werden mit einem Überschuss an Base, unter anderem DIEA, NMM oder TMP, eingesetzt um die Säurefunktion zu deprotonieren.^{19,20} Diese greift dann am positiv geladenen Phosphoratom an und bildet in weiterer Folge einen aktiven Ester oder ein symmetrisches Anhydrid, die dann in weiterer Folge mit einem Amin zum gewünschten Produkt reagieren.¹⁴

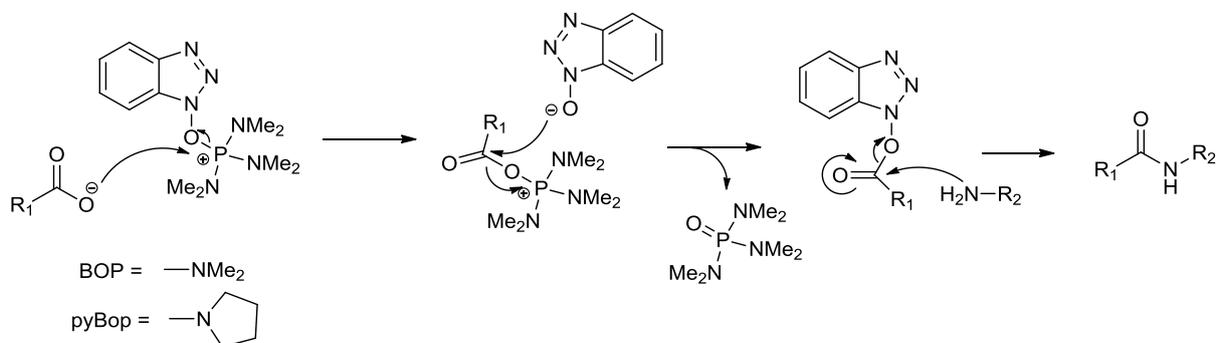


Abbildung 23, Amid-Bildung mittels BOP

Nur wenige Jahre später wurden Uroniumsalze wie HATU oder HBTU, eine neue ähnliche Gruppe von Verbindungen, erstmals in der Peptidsynthese eingesetzt.²¹ Wie auch bei den Phosphoniumsalzen wird Tetrafluorborat oder Hexafluorophosphat als nicht nukleophiles Anion verwendet. Diese Verbindungsklasse kann als Uroniumsalz(O-Form) oder als Guadiniumsalz(N-Form) vorliegen.²² Teilweise werden auch hier Additive, wie HOAt zugesetzt, um die Racemisierung zu minimieren.²³ Anstelle des Phosphors wird hier ein positiv geladenes Kohlenstoffatom von der Säurefunktion angegriffen. Abgesehen davon ist der Mechanismus dem der Phosphoniumsalze aber sehr ähnlich.

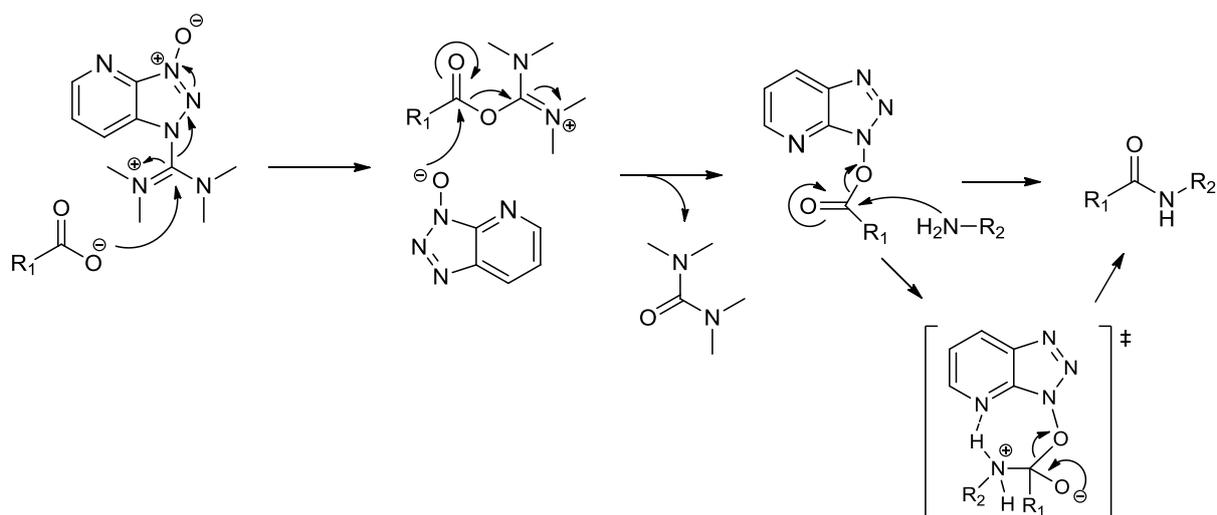


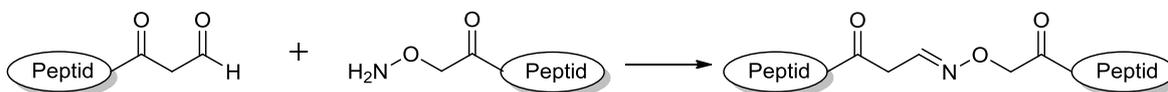
Abbildung 24, Amid-Bildung durch HATU

2.4.4 Ligation

Nach erfolgter Elongation muss die N-terminale Schutzgruppe abgespalten werden und der Vorgang kann erneut beginnen. Nachdem die gewünschte Kettenlänge erreicht wurde, muss

das Peptid vom Linker abgespalten und gereinigt werden. Für die Synthese längerer Ketten werden Teilstücke mittels Proteinligation verbunden.^{24,25} Es gibt dafür unterschiedliche Methoden, einige führen zu ungewöhnlichen Rückgratstrukturen, wie Oxim-Ligation oder 3+2 Cycloaddition. Es sind jedoch auch Methoden bekannt, die zu einer Amidbindung führen, wie die Staudinger-Ligation, native chemische Ligation oder KAHA-Ligation.²⁶

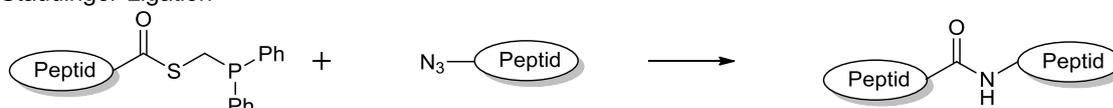
Oxim-Ligation



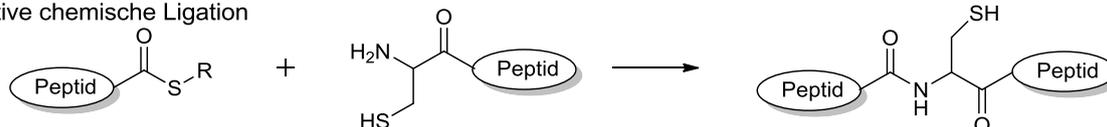
3+2 Cycloaddition



Staudinger-Ligation



Native chemische Ligation



KAHA-Ligation



Abbildung 25, Methoden zur Ligation

2.5 1,3-Dipolare Cycloaddition

Es handelt sich dabei um eine Reaktion zwischen einem Molekül mit einem 1,3-Dipol und einem Dipolarophil, die zusammen einen 5-gliedrigen Ring bilden. Als 1,3-Dipol können zum Beispiel Ozon, Azide, Diazoalkane oder Nitrone eingesetzt werden, diese können dann an Dipolarophile wie Alkene, Alkine, Imine oder Nitrile addiert werden. Mechanistische Untersuchungen und synthetische Anwendungen wurden anfangs vor allem durch Rolf Huisgen durchgeführt, deswegen wird die Reaktion auch oft als Huisgen-Cycloaddition bezeichnet.²⁷⁻³⁰ Obwohl es zu Beginn unterschiedliche Ansichten über den Mechanismus gab, gilt nun die von Huisgen vorgeschlagene konzertierte pericyclische Cycloaddition, für unkatalysierte Reaktionen, als allgemein anerkannt.^{28,31} Die beteiligten HOMOs und LUMOs sollten ähnlich sein, was durch elektronenziehende Gruppen am Dipolarophil bevorzugt werden kann. Die Regioselektivität der Reaktion für asymmetrische Dipol-Dipolarophil-Paare hängt von elektronischen und sterischen Effekten ab und kann je nach Resten stark variieren.³²⁻³⁴

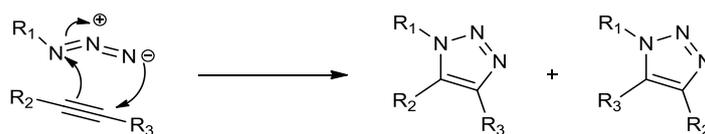


Abbildung 26, Mechanismus der 1,3-Dipolaren Cycloaddition

Die 1,3-Dipolare Cycloaddition zwischen organischen Aziden und terminalen Alkinen findet in der Biochemie und besonders in der Biokonjugation breite Anwendung. Da die Reaktion jedoch unter den dafür nötigen sehr milden Bedingungen nur sehr langsam oder gar nicht abläuft, werden Katalysatoren eingesetzt. Dabei haben sich Kupfer(I)-Katalysatoren durchgesetzt, da die Reaktionen damit unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden können.^{32,35} Ein großer Vorteil dieser Reaktion ist die Bioorthogonalität, beide Reaktionspartner kommen nahezu nie in biologischen Systemen vor und können deswegen auch unter sehr heterogenen Bedingungen und in und an Zellen selektiv verknüpft werden. Dadurch können Zellen zum Beispiel mit fluoreszierenden Gruppen markiert und später über Mikroskope beobachtet werden.³⁶ Eine weitere Anwendung ist die Ligation von Peptiden, die hier schon erwähnt wurde. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass es sich dabei um „cis-Peptidbindungen“ handelt.^{32,35,37} 1,2,3-Triazol gilt generell schon als sehr gutes Peptidbindungsmimetik, jedoch haben Tetrazole vor allem elektronisch noch deutlich bessere Übereinstimmung mit der natürlichen Peptidbindung.³⁸⁻⁴¹ Die Synthese solcher Verbindungen stellte sich allerdings als deutlich schwieriger heraus. Bislang gelang die Herstellung dieser Peptide nur ausgehend von einer nativen Peptidbindung durch Einsatz von Phosphorpentaoxid und Stickstoffwasserstoffsäure oder durch Alkylierung an terminale, einfach substituierte Tetrazole.^{39,42,43}

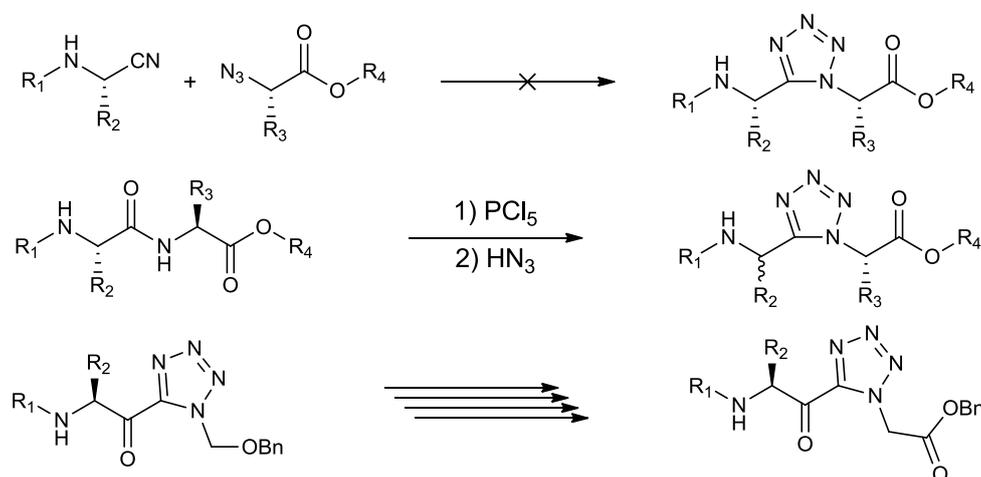


Abbildung 27, Synthese von Tetrazol-Peptidbindungsmimetika

2.6 Tetrazol

Tetrazole sind stickstoffhaltige, heterocyclische Verbindungen mit vier Stickstoffatomen. Bei unsubstituierten Tetrazol unterscheidet man zwischen drei isomeren Strukturen 1H-, 2H- und 5H-Tetrazol. 1H-, und 2H- Tetrazol sind Heteroaromaten, welche in Lösung ein Tautomeriegleichgewicht ausbilden, das auf der Seite von 1H-Tetrazol liegt.

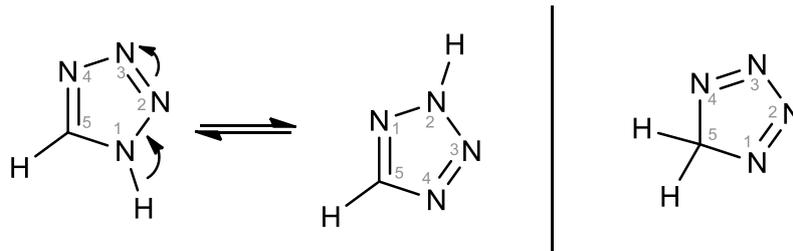


Abbildung 28, Tautomerie von 1H- und 2H-Tetrazol sowie das nichtaromatische 5H-Tetrazol

Tetrazol hat mit 11.3 eV das höchste Ionisationspotential aller Azole. Das Dipolmoment in Dioxan liegt bei 5.15 D. Tetrazol ist eine sehr schwache Base mit einem pK_a Wert (der protonierten Form) von -3, von allen Azolen ist es jedoch die stärkste Säure $pK_a = 4.89$. Aufgrund der ähnlichen Säurestärke kann 5-substituiertes-1H-Tetrazol als Carbonsäure-Analog betrachtet werden.^{44,45} Substituierte Tetrazole treten in verschiedenen Formen auf, 5-substituiertes Tetrazol und sein Anion, sowie die zwei Regioisomere 1,5- und 2,5-disubstituiertes Tetrazol. Darüber hinaus können Tetrazole mit weiteren Ringen verknüpft sein oder als dreifachsubstituiertes Kation vorliegen.⁴⁴

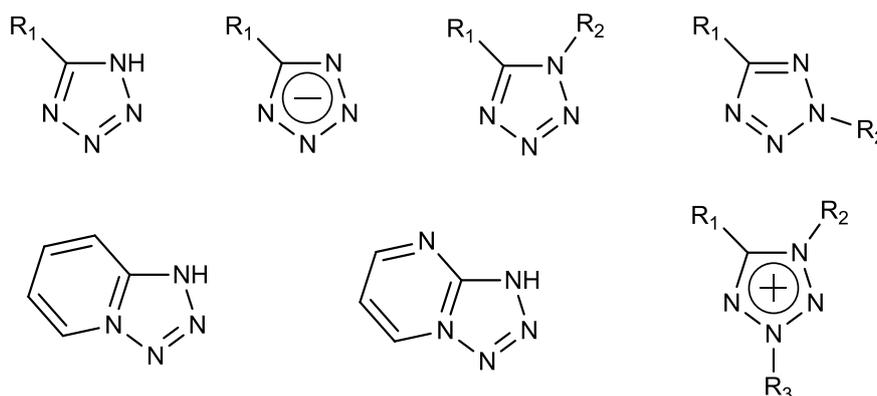


Abbildung 29, unterschiedliche substituierte Tetrazole

Tetrazole sind Bestandteil vieler Medikamente mit unterschiedlichen Einsatzgebieten, wie zum Beispiel antibakterieller, entzündungshemmender oder blutdrucksenkender Wirkung.^{46,47} Sie werden dabei unter anderem als Carboxylsäuremimetika eingesetzt, die eine Reihe positiver Effekte nach sich ziehen. Tetrazole haben im Vergleich eine hohe metabolische Stabilität und gute Zell-Permeabilität.⁴⁴

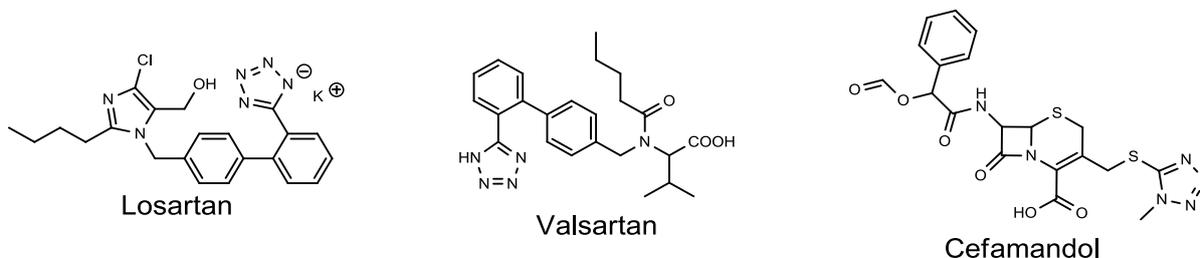


Abbildung 30, Medikamente die Tetrazol enthalten

2.6.1 Synthese

Unsubstituiertes Tetrazol kann durch die Reaktion von Cyanwasserstoff und Stickstoffwasserstoffsäure unter Druck hergestellt werden. Die erste bekannte Synthese wurde von Bladin 1885 durchgeführt. Er kam nach der Reaktion von Dicyanophenylhydrazin und Salpetriger Säure allerdings zu der falschen Struktur, was vor allem daran lag, dass die Struktur von Dicyanophenylhydrazin noch nicht genau bekannt war.⁴⁸ Dieser Fehler wurde schließlich 1893 von Bamberger und De Gryter nachweisen.⁴⁹

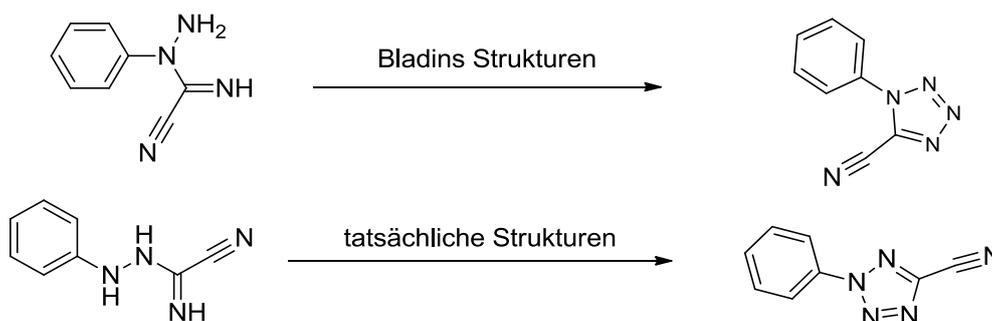


Abbildung 31, Tetrazol Synthese durch Bladin

Hantzsch und Vagt waren 1901 die ersten die durch eine 1,3-Cycloaddition Tetrazol herstellen konnten.⁵⁰ Dabei wurde 5-Aminotetrazol aus Cyanamid und Stickstoffwasserstoffsäure hergestellt.

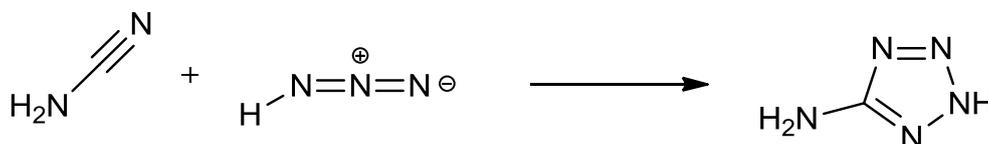


Abbildung 32, 5-Aminotetrazol Synthese

Es dauerte einige Jahrzehnte bis ein deutlicher Fortschritt im Bereich der Tetrazol-Synthese durch 1,3-Dipolare Cycloaddition gemacht wurde. 1932 konnten von Braun und Keller erste Alkyl- und Aryltetrazole hergestellt werden.⁵¹ Finnegan schaffte es 1958, durch den Einsatz von Bortrifluorid, nochmals eine deutlich größere Anzahl an 5-Substituierten-Tetrazolen herzustellen.⁵²

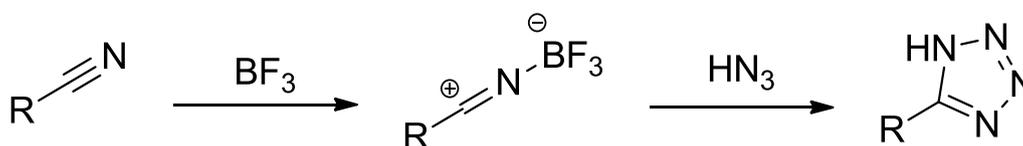


Abbildung 33, Finnegan et al. 1958

Einer der ersten Einsätze von Katalysatoren in diesem Bereich wurde von Sharpless durchgeführt. Er verwendete anfangs Zinkbromid und schlussendlich Kupfer(I)triflat und war damit auch in der Lage, erste Disubstituierte-Tetrazole herzustellen.^{32,53,54}

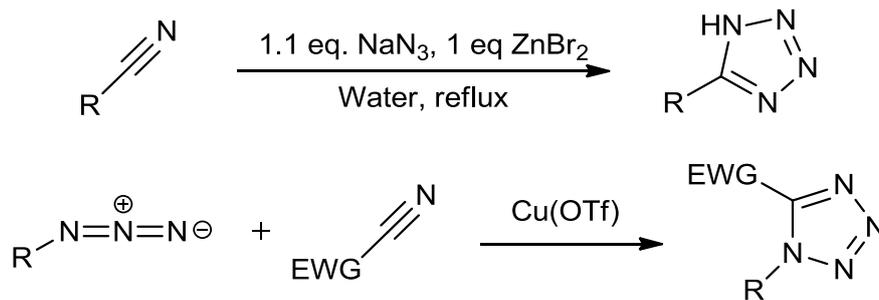


Abbildung 34, Tetrazol-Herstellung mit Katalysatoren durch Sharpless

Der Mechanismus der Cu(I)-katalysierten Cycloaddition ist nicht endgültig geklärt. Man geht davon aus, dass Kupfer an den Nitril-Stickstoff addiert und es anschließend zum Ringschluss kommt. Der hier gezeigte Mechanismus wurde 2007 von Bosch und Vilarrasa vorgeschlagen.⁵⁵ Sie konnten eine Reihe von disubstituierten Tetrazolen unter Mikrowellen-Bedingungen herstellen. Allerdings war auch hier mindestens eine Carbonyl-Funktion, als elektronenziehende Gruppe, α zum Nitril nötig.

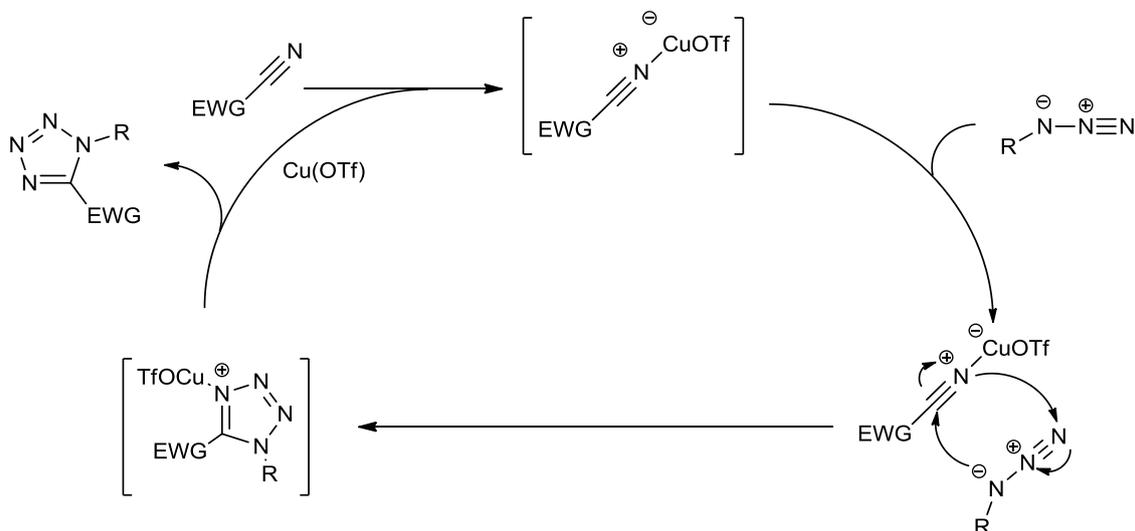


Abbildung 35, Mechanismus für die Cu(I)-katalysierte Cycloaddition

2.7 Aminosäureazide durch Diazotransfer

Zur Herstellung von Aminosäureaziden stehen grundsätzlich zwei unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Die erste ist die Substitution eines Halogenids durch Natriumazid und die zweite Möglichkeit ist der Einsatz von Diazotransfer-Reagenzien.^{56,57}

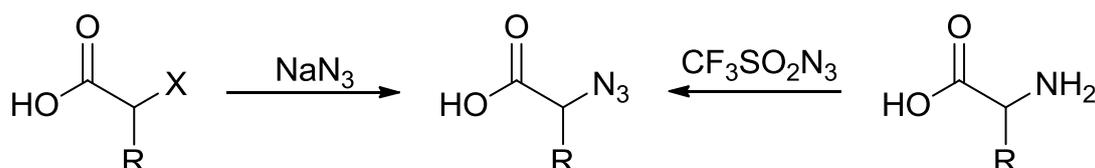


Abbildung 36, Methoden zur Herstellung eines Aminosäureazids

Lange Zeit war Trifluormethansulfonylazid das am häufigsten verwendete Diazotransferreagenz. Es kann in situ aus Trifluormethansulfonsäureanhydrid und Natriumazid generiert werden und die Ausbeuten sind üblicherweise sehr gut.

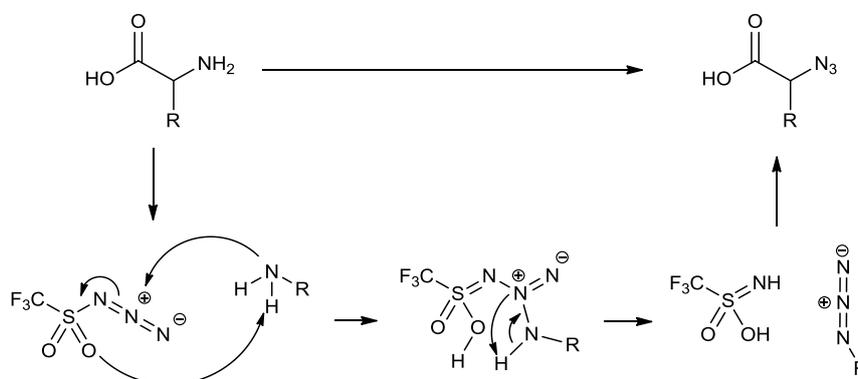


Abbildung 37, plausibler Diazotransfermechanismus ohne Metallkatalyse

Die Reaktion kann durch den Einsatz von Kupfer oder Zinksalzen deutlich beschleunigt werden. Der Mechanismus des metallkatalysierten Diazotransfers läuft wahrscheinlich über einen cyclischen Übergangszustand.^{57,58}

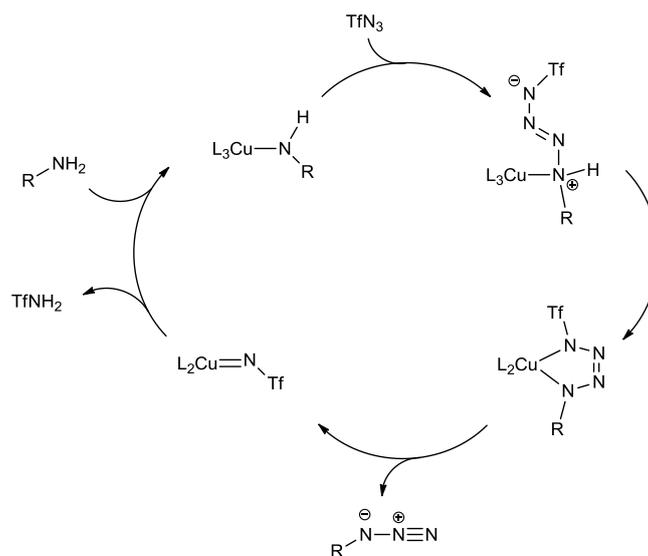


Abbildung 38, Mechanismus des Cu-katalysierten Diazotransfers

Da Trifluormethansulfonylazid aufgrund der hohen Explosionsgefahr nicht gelagert werden kann, hat sich in den letzten Jahren der Bedarf an neuen lagerstabilen Diazotransferreagenzien entwickelt. Dabei hat sich vor allem Imidazole-1-sulfonyl Azid beziehungsweise dessen Salze durchgesetzt.

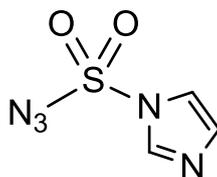


Abbildung 39, Imidazole-1-sulfonyl Azid

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, Dipeptide mit Tetrazol als Peptidbindungsmimetika herzustellen. Im Gegensatz zu den schon bekannten Methoden sollten jedoch die jeweiligen Aminosäurederivate, hergestellt aus den natürlichen Aminosäuren, als Ausgangsmaterial verwendet werden. Die Säurefunktion der N-terminalen Aminosäure muss dafür zum Nitril umgesetzt werden und die C-terminale Aminosäure muss zum Azid umgesetzt werden.⁴³

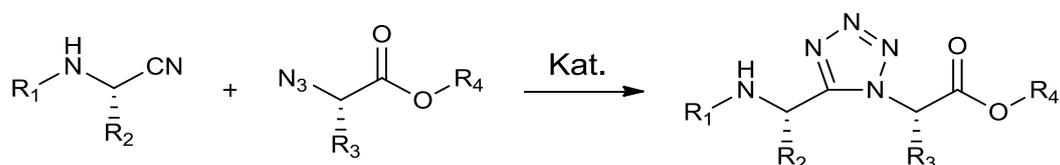


Abbildung 40, 1,5-substituiertes Tetrazol aus Aminosäurederivaten

Zu Beginn galt es also, die jeweiligen Substrate herzustellen und erste Katalysatoren zu testen. Nach erfolgter Synthese sollten die Stereochemie und die Regiochemie bestimmt werden.

3.2 Substrat Herstellung

3.2.1 Imidazole-1-sulfonyl Azid

Erster Schritt in der Synthese der Substrate war die Wahl eines geeigneten Diazotransfer-Reagenz für die Herstellung der Aminosäureazide. Aufgrund der eher problematischen Eigenschaften von Trifluormethansulfonylazid fiel die Wahl auf Imidazole-1-sulfonyl Azid **1**.

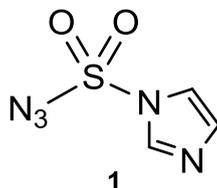


Abbildung 41, Imidazole-1-sulfonyl Azid

Nach einiger Recherche stellt sich heraus, dass das Schwefelsäuresalz wohl die meisten Vorteile bietet. Bis vor einigen Jahren wurde in den meisten Fällen das Hydrochlorid-Salz eingesetzt.^{59,60} Allerdings ist es auch damit zu Zwischenfällen gekommen, was in weiterer Folge auch zu genauen Untersuchungen der Stabilität der jeweiligen Salze von Imidazole-1-sulfonyl Azid geführt hat.⁶¹ Die Salze wurden auf die nötige Reibungs-, Stoß-, und Wärmeenergie getestet, die nötig ist, um sie zur Explosion zu bewegen. Die besten Ergebnisse konnten dabei **1.H₂SO₄** und **1.HBF₄** erzielen.

Für die Synthese des Schwefelsäuresalzes **2** wird Natriumazid in Acetonitril suspendiert und Sulfonylchlorid langsam bei 0°C zugetropft und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wird wieder auf 0°C gekühlt und portionsweise Imidazol zugegeben. Nach weiteren vier Stunden bei Raumtemperatur wird extrahiert, um überschüssiges Imidazol abzutrennen. Die erhaltene organische Lösung wird nun bei 0°C langsam mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt, wobei das Schwefelsäuresalz als weiße Kristalle ausfällt. Es konnten so bis zu 85% Ausbeute erreicht werden.

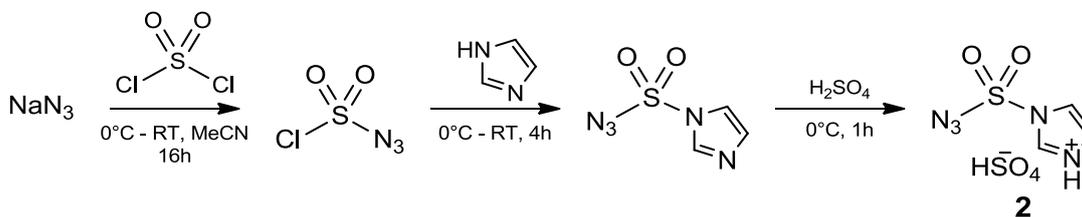


Abbildung 42, Synthese des Imidazole-1-sulfonyl Azid-Salzes

Im Laufe dieser Arbeit kam es, beim Umgang mit diesen Verbindungen, zu keinerlei Komplikationen. Es wurde jedoch sehr gründlich darauf geachtet, die Substanzen bis zum fertigen Salz nie zu isolieren oder in irgendeiner Form trocknen zu lassen.

3.2.2 Aminosäureazid Herstellung

Die Aminosäureazide wurden ausgehend von den natürlichen Aminosäuren hergestellt. Für die ersten Synthesen wurde Valin verwendet. Der Diazotransfer wurde grundsätzlich nach literaturbekannten Methoden durchgeführt.⁵⁹ Die jeweilige Aminosäure wurde dabei gemeinsam mit Verbindung **2**, Kaliumcarbonat und Kupfer(II)sulfat-pentahydrat in Methanol über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend extrahiert. Durch diese Methode wurden im Rahmen dieser Arbeit die Aminosäureazide von Valin **3**, Phenylalanin **4** und Isoleucin **5** durchwegs mit sehr guten Ausbeuten hergestellt.

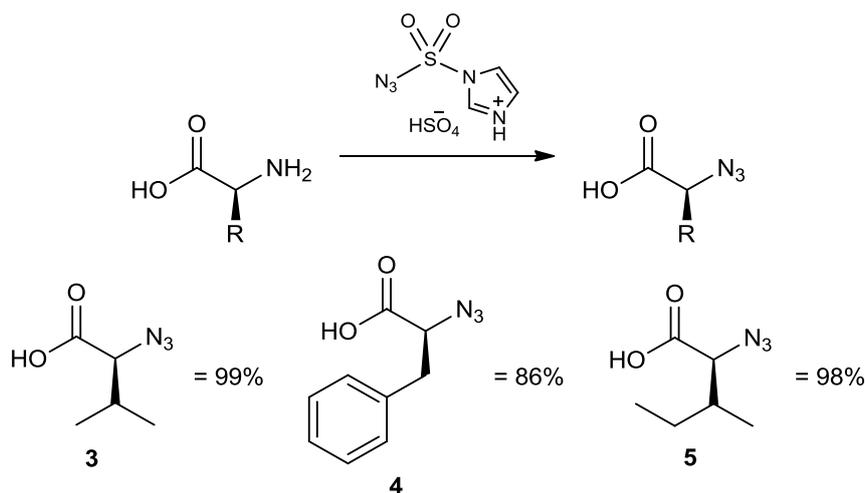


Abbildung 43, Synthese und Ausbeuten der Aminosäureazide

Mit Glycin als Ausgangsmaterial konnten jedoch über diese Methode keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden. Das jeweilige Glycin-Derivat kann aber relativ einfach, ausgehend von Bromessigsäure, hergestellt werden. Dazu wird Bromessigsäure in Wasser gelöst und mit Natriumazid über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Aufarbeitung erhält man 2-Azidoessigsäure **6** in sehr guten Ausbeuten.

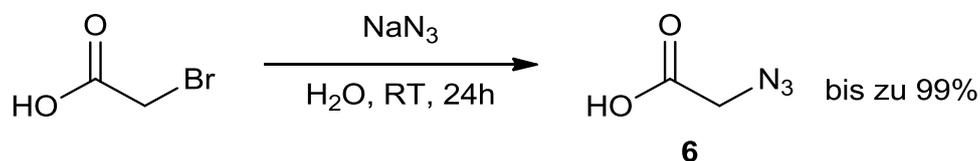


Abbildung 44, Synthese von 2-Azidoessigsäure

Mit dieser Verbindungsklasse, im Speziellen mit dem Valin-Derivat **3** wurden anschließend die ersten Katalyse-Experimente durchgeführt. Es stellte sich dabei allerdings schnell heraus, dass für die anschließende Trennung eine Veresterung der Säurefunktion erforderlich ist.

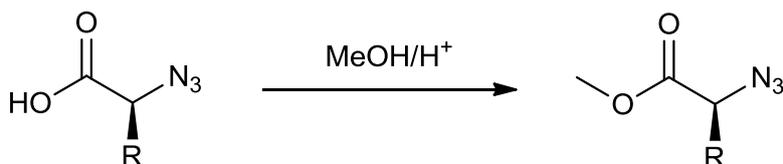


Abbildung 45, Veresterung der Aminosäureazide

Es wurden dafür zwei Methoden getestet, der Einsatz von Acetylchlorid und die Reaktion mit Dowex H⁺ als Katalysator.

Aminosäure	Methode	Ausbeute in %
Valin 7	Dowex/H ⁺	99
Valin 7	AcCl	69
Isoleucin 8	Dowex/H ⁺	82
Isoleucin 8	AcCl	65

Abbildung 46, Vergleich der Methoden zur Veresterung

Generell waren die Ausbeuten mit saurem Ionenaustauscher höher. Der einzige Nachteil waren die teilweise etwas längeren Reaktionszeiten, was aber in diesem Fall kein Problem darstellte.

Aminosäure	Dauer in h	Ausbeute in %
Valin 7	24	99
Isoleucin 8	48	82
Phenylalanin 9	24	85
Glycin 10	24	65

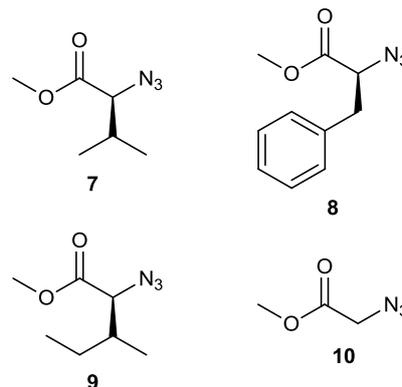


Abbildung 47, Ausbeuten der Veresterung

Nach der Veresterung wurden die öligen Verbindungen über Kieselgelchromatographie gereinigt, getrocknet und für die 1,3-Dipolare Cycloaddition eingesetzt.

3.2.3 Aminosäurenitril Herstellung

Für die Herstellung der Nitrile wurden als Ausgangsmaterial wieder die natürlichen Aminosäuren verwendet. In den Fällen, in denen die gewünschten Aminosäuren mit N-terminalen Schutzgruppen schon zur Verfügung standen, wurden diese als Ausgangsmaterial verwendet. Für die ersten Versuche wurde Glycin gewählt, die Synthese startete also ausgehend von dem schon Vorhandenen Boc-Glycin. Erst wurde es durch Triethylamin und Ethylchlorformiat in das gemischte Anhydrid überführt und anschließend mit wässriger Ammoniak-Lösung zum Amid umgesetzt.

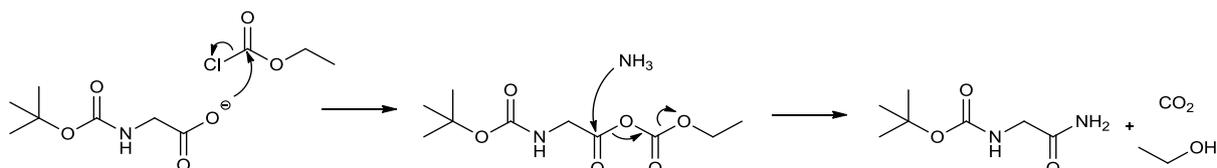


Abbildung 48, Mechanismus der Amid-Bildung

Das Amid wird extrahiert, getrocknet und im nächsten Schritt mit Phosphorylchlorid zum Nitril (**11**) dehydratisiert.^{62,63}

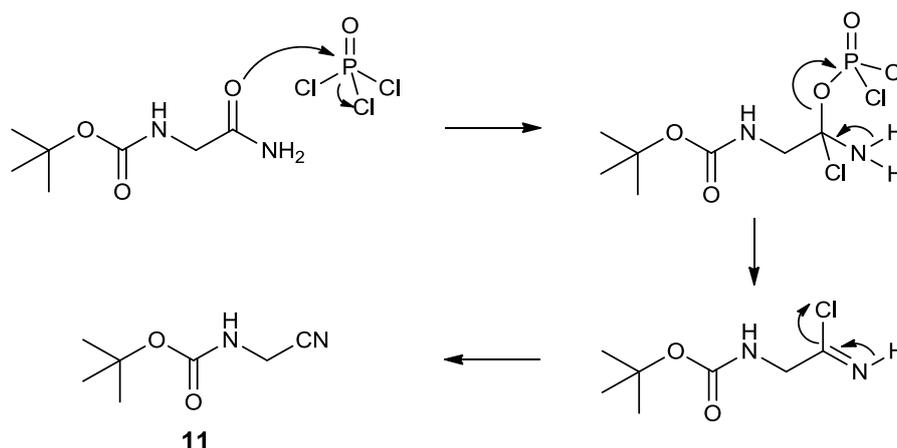


Abbildung 49, Dehydratisierung des Amids

Nach den ersten Versuchen stellte sich allerdings heraus, dass Boc-Schutzgruppen unter den eingesetzten Bedingungen nicht stabil sind. In weiterer Folge wurden deswegen Cbz-Schutzgruppen eingesetzt. Die geschützten Aminosäuren wurden dabei durch Reaktion mit Chlorameisensäurebenzylester in wässriger Natriumhydroxid-Lösung hergestellt.

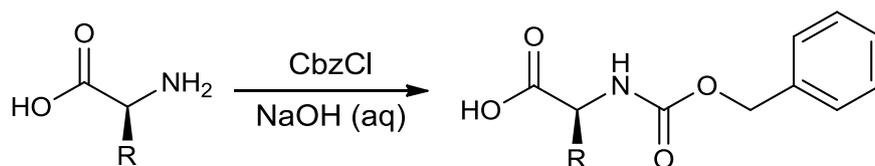


Abbildung 50, einführen der Cbz-Schutzgruppe

Die weiteren Schritte waren dieselben, es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Ausbeuten durch die neue Schutzgruppe erhöht werden konnten. Das liegt wohl an Verlusten, die bei der säurelabilen Boc-Schutzgruppe, durch die Reaktion mit Phosphorylchlorid und deren saure Aufarbeitung entstanden sind.

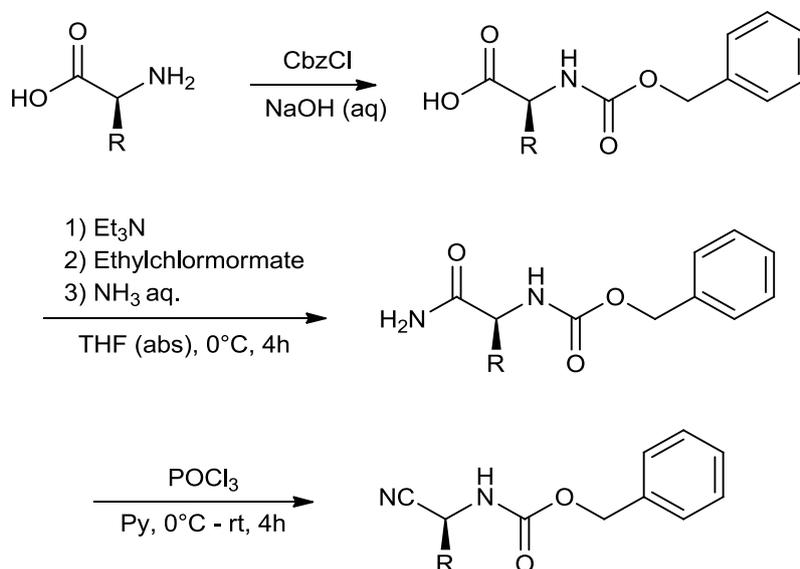


Abbildung 51, 3-stufige Nitril-Herstellung

Die Derivate der Aminosäuren Glycin (**14**), Phenylalanin (**23**) und Valin (**17**) konnten also über drei Stufen erzeugt werden. Im Fall von Isoleucin (**20**) war die Cbz-geschützte Aminosäure (**18**) verfügbar und musste vor der Reaktion nur noch im Vakuum getrocknet werden.

Aminosäure	Schätzung	Amid	Nitril	Gesamt
Glycin	96	78	69	52
Valin	>99	78	61	48
Isoleucin	-	>99	83	83
Phenylalanin	>99	94	34	32

Abbildung 52, Ausbeuten der Nitril-Herstellung in %

Alle Nitrile wurden nach erfolgter Synthese über Kieselgelchromatographie gereinigt und anschließend für die Cycloaddition eingesetzt. Die doch sehr niedrige Ausbeute des Phenylalanin-Derivats (**23**) liegt nicht an der Reaktion selbst, sondern an Problemen bei der Aufarbeitung und der anschließenden Säule. Durch die schlechte Löslichkeit begann es teilweise in der Säule zu kristallisieren, wodurch einiges an Produkt verloren ging. Es war jedoch genügend Material für die anschließenden Reaktionen vorhanden.

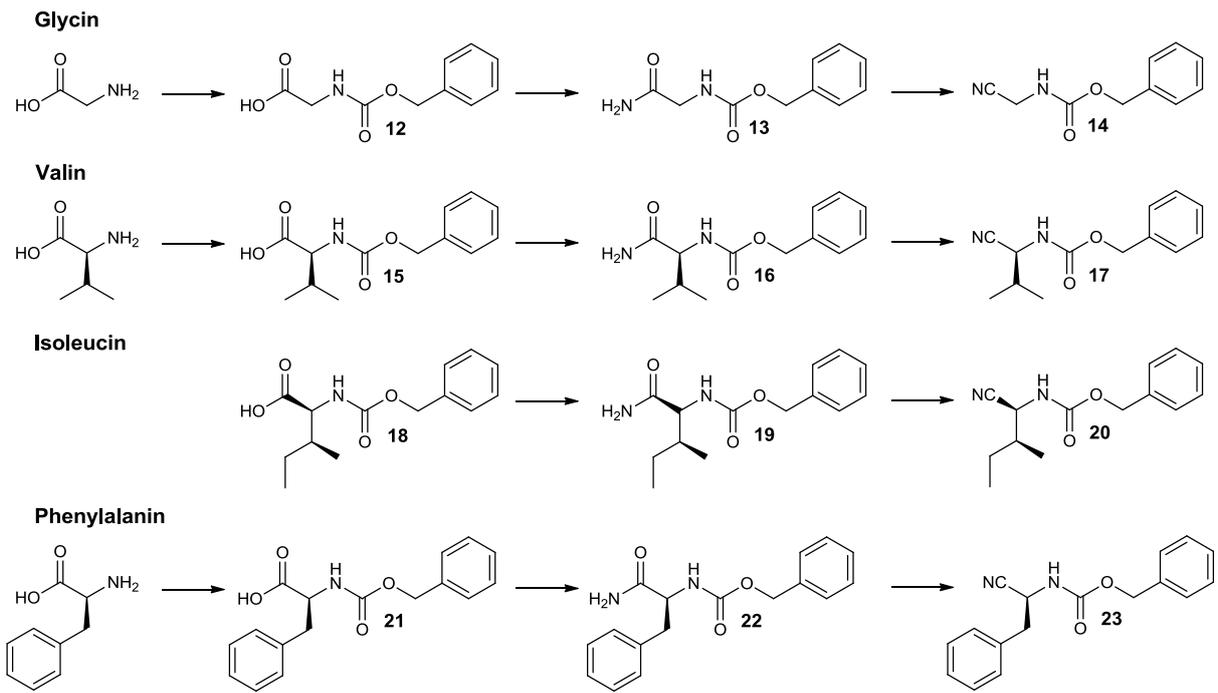


Abbildung 53, Übersicht über die Herstellung der Nitril-Derivate

3.3 Katalyse Experimente

Die ersten Versuche zur Herstellung von Tetrazolen wurden mit den Verbindungen **11** und **3** durchgeführt.

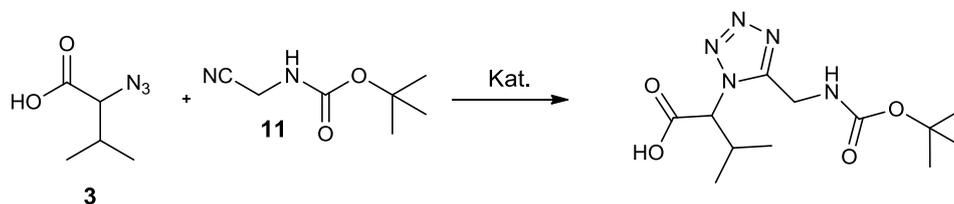


Abbildung 54, erste Versuche der 1,3-Dipolaren Cycloaddition

Als Katalysatoren wurden CuCl_2 , Cu_2Cl_2 und $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ verwendet. Die Kupfertriflate wurden aus den jeweiligen Chloriden durch Reaktion mit Trifluormethansulfonsäure in Wasser und anschließendem Trocknen im Vakuum hergestellt. Als Lösungsmittel wurden DCM, Wasser und Methanol getestet und der Reaktionsfortschritt mittel Dünnschichtchromatographie verfolgt.

Nr.	Kat.	Mol %	Eq. Azid	Temp.	Dauer	LM	Massenspektrum	Ausbeute
1	CuCl_2	20	1	RT	16d	DCM	-	-
2	Cu_2Cl_2	20	1	RT	15d	DCM	-	-
3	$\text{Cu}(\text{OTf})_2$	20	1	RT	14 d	DCM	-	-
4	CuCl_2	20	1	50°C	16 d	MeOH(abs)	-	-
5	Cu_2Cl_2	20	1	50°C	15 d	MeOH(abs)	-	-
6	$\text{Cu}(\text{OTf})_2$	20	1	50°C	8 d	MeOH(abs)	-	-
7	CuCl_2	20	1	80°C	1 d	H_2O	-	-
8	Cu_2Cl_2	20	1	80°C	1 d	H_2O	-	-
9	$\text{Cu}(\text{OTf})_2$	20	1	80°C	1 d	H_2O	Ja	-

Abbildung 55, Ergebnisse der ersten 1,3-Dipolaren Cycloadditionen

Es konnte bei keiner der Reaktionen Produkt isoliert werden, jedoch wurde im Massenspektrum von Reaktion Nr.9 ein Signal gefunden, das wahrscheinlich vom entschützten Tetrazol stammt.

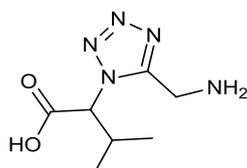
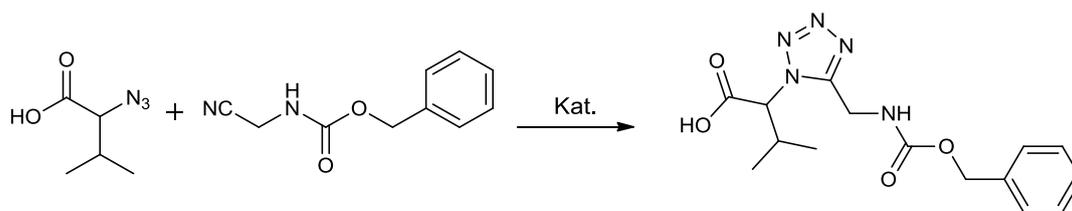


Abbildung 56, in Masse gefundenes Tetrazol

Wie bei der Synthese der Substrate schon erwähnt, wurde deswegen von nun an Cbz-Schutzgruppen verwendet. Als Katalysator wurde vorerst vor allem Kupfer(I)- und Kupfer(II)triflat eingesetzt.



Nr.	Kat.	Mol %	Eq. Azid	Temp.	Dauer	LM	Massenspektrum	Ausbeute
10	Cu(OTf) ₂	20	1	reflux	14d	MeOH(abs)	-	-
11	Cu(OTf)	20	1	reflux	6d	MeOH(abs)	Ja	-
12	Cu(OTf) ₂	20	1	80°C	14d	H ₂ O	-	-
13	Cu(OTf)	20	1	80°C	14d	H ₂ O	-	-

Abbildung 57, erste Versuche mit Cbz-geschützten Substraten

Die bei Reaktion 11 gefundene Masse war nun das noch Cbz-geschützte Tetrazol. Da es jedoch noch immer nicht möglich war Produkte zu isolieren, wurden ab diesem Zeitpunkt zusätzlich nur noch die jeweiligen Methylester der Azide eingesetzt.

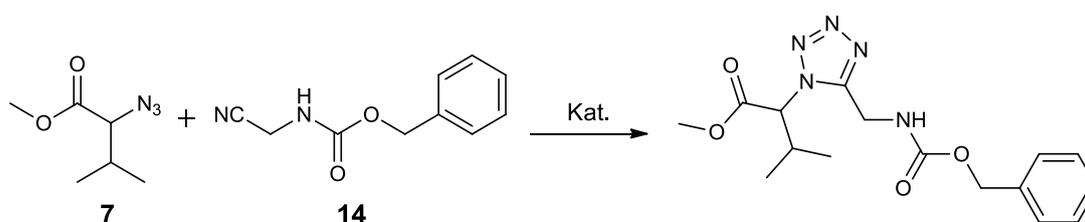


Abbildung 58, Finale Schutzgruppenstrategie

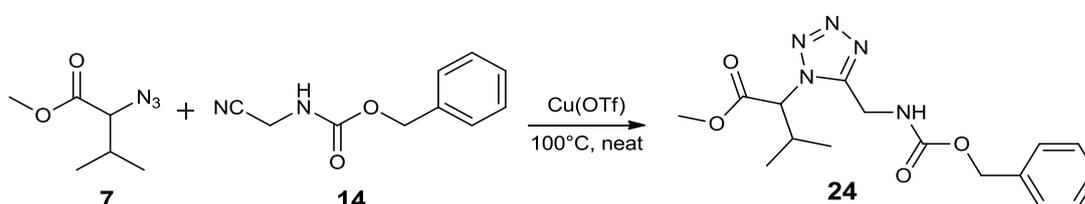
In den bisherigen Versuchen zeigte sich auch, dass das Nitril vor allem in protischen Lösungsmitteln und ganz besonders Wasser, bei längeren Reaktionszeiten hydrolysiert. Außerdem wurde klar, dass wohl höhere Temperaturen notwendig sind, um wirklich eine isolierbare Menge an Produkt generieren zu können. In weiterer Folge wurden also vor allem aprotische, im Vergleich zu Dichlormethan eher höher siedende Lösungsmittel, wie Chloroform (CHCl₃), Tetrahydrofuran (THF) und Dimethylformamid (DMF) eingesetzt. Nachdem weiterhin keine Produkte isoliert werden konnten, obwohl die jeweiligen Tetrazole im Massenspektrum nachgewiesen werden konnten, wurde die Menge an zugegeben Azid erhöht und die Reaktion nur noch über die Menge des vorhandenen Nitrils mittels Dünnschichtchromatographie überwacht. Wenn die Reaktion nach ungefähr zwei Wochen laut DC immer noch nicht abgeschlossen war, wurden die Reaktionen unabhängig davon aufgearbeitet und untersucht. Es wurden auch einige Tests in der Mikrowelle durchgeführt. Da aber dabei keine laufende Reaktionskontrolle möglich war und die Aufarbeitung der Reaktionen sehr arbeitsaufwendig ist, beschloss man erst dann wieder auf die Mikrowelle zurückzugreifen, wenn die nötigen Reaktionsbedingungen zumindest grob bekannt sind. Zusätzlich wurden in diesem Durchgang auch einige neue Katalysatoren getestet, die bei ähnlichen Reaktionen erfolgreich waren. Darunter waren unter anderem CuI, AgNO₃ und Yb(OTf)₃.

Nr.	Kat.	Mol %	Eq. Azid	Temp.	Dauer	LM	Massenspektrum	Ausbeute
14	Cu(OTf) ₂	20	1	50°C	14d	CHCl ₃	Ja	-
15	Cu(OTf)	30	1	50°C	14d	CHCl ₃	Ja	-
16	Cu(OTf)	30	1	100°C	2h MW	THF	-	-
17	Cu(OTf)	30	4	reflux	4d	THF	Ja	-
18	CuI	20	3	reflux	12d	THF	Spuren	-
19	CuI	20	3	reflux	12d	CHCl ₃	-	-
20	AgNO ₃	30	4	reflux	12d	THF	-	-
21	Yb(OTf) ₃	20	5	reflux	12d	THF	-	-
22	Cu(OTf)	30	10	120	14d	DMF	Ja	-
23	Cu(OTf)	30	10	130	14d	DMF	Spuren	-
24	BF ₃ OEt ₂	20	5	reflux	14d	CHCl ₃	-	-

Abbildung 59, Test neuer Katalysatoren und Lösungsmittel

Die hier abgebildeten Reaktionen sind nur ein Überblick über die durchgeführten Versuche und sollen ein ungefähres Bild der unterschiedlichen Bedingungen liefern. Es werden jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht alle Reaktionen angeführt. In dieser Serie wurde deutlich, dass ab ungefähr 100°C unerwünschte heterogene Nebenreaktionen auftreten. Die Lösung wurde dabei nach circa zwei Tagen trüb und anschließend völlig schwarz. Nach der Aufarbeitung blieb ein schwarzer Feststoff zurück, der sich auch in sehr polaren Lösungsmitteln nicht vollständig auflöste. Es handelte sich dabei wohl um Polymerisationsreaktionen. Trotz teilweise vielversprechenden Ergebnissen bei Massenspektren und Dünnschichtchromatographie war es auch hier leider nicht möglich, Produkt so isolieren.

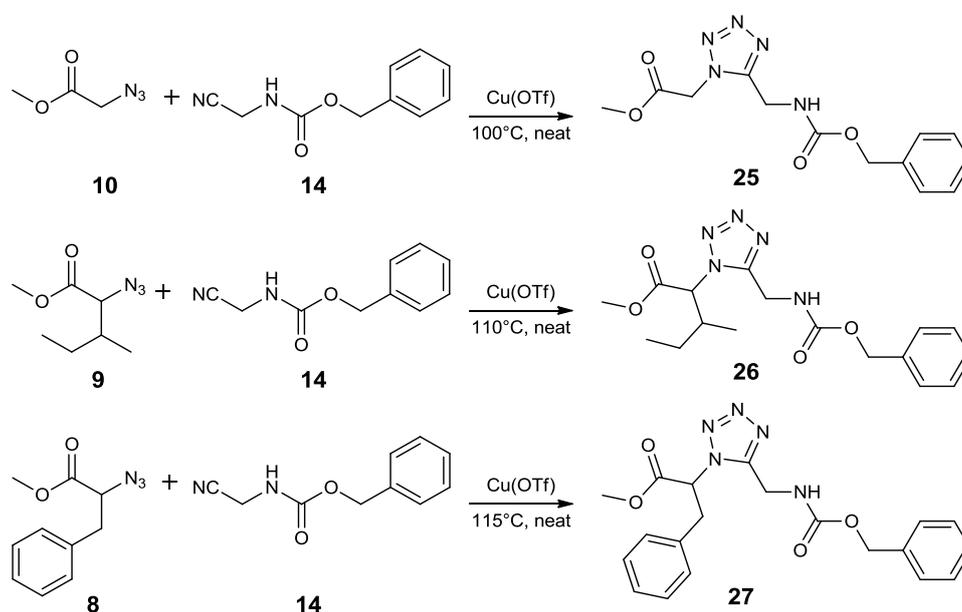
Es zeigte sich jedoch beim Ansetzen einer der Reaktionen, dass sich das feste Nitril in einem Überschuss an Azid teilweise schon bei Raumtemperatur vollständig auflöste. Deswegen entschied man sich in weiter Folge, einige Versuche ohne Lösungsmittel durchzuführen. Es wurde also das Nitril und der Katalysator in einem Überschuss an Azid gelöst und die Reaktion im Ölbad bei 100°C mehrere Tage gerührt.



Nr.	Kat.	Mol %	Nitril	Azid	Eq. Azid	Temp.	Dauer	Massenspektrum	Ausbeute
24	Cu(OTf)	20	14	7	10	100°C	14d	Ja	7%

Abbildung 60, erste erfolgreiche Tetrazol-Synthese

Dabei konnte festgestellt werden, dass schon beim ersten Versuch, nach der Aufarbeitung und Säulenchromatographie, 7 % des gewünschten Produkts isoliert werden konnten. Leider kam es aber auch dabei zu den Nebenreaktionen, was die Aufarbeitung erschwerte. Dennoch wurden unter diesen Bedingungen, anschließend unterschiedliche Substrate und auch nochmals verschiedene Katalysatoren getestet.



Nr.	Kat.	Mol %	Nitril	Azid	Eq. Azid	Temp.	Dauer	Ausbeute
25	Cu(OTf)	30	14	10	8	100°C	7d	20%
26	Cu(OTf)	30	14	9	5	110°C	3d	19%
27	Cu(OTf)*	30	14	9	5	110°C	3d	21%
28	Cu(OTf)	10	14	8	5	115°C	4d	7%
29	AgNO ₃	30	14	9	5	110°C	12d	-
30	Yb(OTf) ₃	30	14	9	5	110°C	7d	-
31	Zn(OTf) ₂	25	14	9	5	110°C	12d	1,3%
32	Cu(OTf)	30	14	7	5	140°C	2d	11%

Abbildung 61, Ergebnisse der Reaktionen ohne Lösungsmittel; *gekaufter Katalysator

Verbindung **25** und **26** konnten mit Kupfer(I)triflat jeweils mit ungefähr 20% Ausbeute hergestellt werden. Verbindung **27** konnte mit bis zu 7% Ausbeute synthetisiert werden. Die Ausbeute von Verbindung **24** konnte auf bis zu 11% gesteigert werden. Von allen anderen getesteten Katalysatoren konnte nur bei Zink(II)triflat ebenfalls Produkt isoliert werden. Wobei die Ausbeute mit 1,3% Prozent deutlich unter der des Kupfer-Katalysators lag. Es wurde außerdem getestet, ob gekauftes Kupfer(I)triflat (Sigma Aldrich, Toluol-Komplex) im Vergleich zum selbst hergestellten Katalysator bessere Ausbeuten liefert. Die Unterschiede waren allerdings nur sehr gering, die Ausbeute konnte im hier gezeigten, deutlichsten Fall nur um 2% gesteigert werden, was den hohen Preis von über 70€ pro Gramm nicht rechtfertigte. Außerdem konnte beobachtet werden, dass der gekaufte Katalysator nach erstmaliger Öffnung im Vergleich zu den hergestellten Triflaten schneller an Aktivität verlor. Was der Grund für dieses Phänomen war, konnte allerdings nicht festgestellt werden.

Nachdem man die ersten Tetrazole hergestellt hat, sollte natürlich auch die Stereochemie und die erhaltenen Regioisomere untersucht werden. Anhand der Masse kann natürlich nicht zwischen 1,5- und 2,5-disubstituierten Tetrazol unterschieden werden.

Bei genauer Betrachtung der C^{13} -NMR-Spektren der Tetrazole die Isoleucin enthalten wurde relativ rasch klar, dass bei den doch relativ hohen Temperaturen am α -Kohlenstoff der C-terminalen Aminosäure Racemisierung eintritt. Man erhielt also im Fall von Isoleucin aufgrund des zweiten Stereozentrums ein 1:1 Gemisch der Diastereomere.

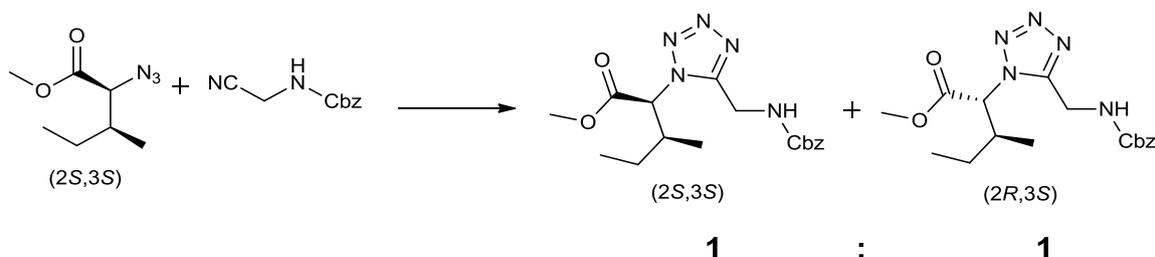


Abbildung 62, Racemisierung bei der Cycloaddition

Zur endgültigen Bestimmung des vorliegenden Regioisomers wurde versucht die erhaltenen Tetrazole zu kristallisieren. Was aber leider weder durch die Abspaltung der Schutzgruppen noch durch die Herstellung unterschiedlicher Ester erreicht werden konnte. Jedoch kann durch die NMR-Spektren mit recht großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es sich in allen drei Fällen um die 1,5-disubstituierten Tetrazole handelt. Nach Untersuchung von unzähligen NMR-Spektren unterschiedlicher Tetrazole zeigt sich, dass sich die C^{13} -Signale von 1,5 und 2,5-Tetrazolen recht deutlich voneinander unterscheiden.

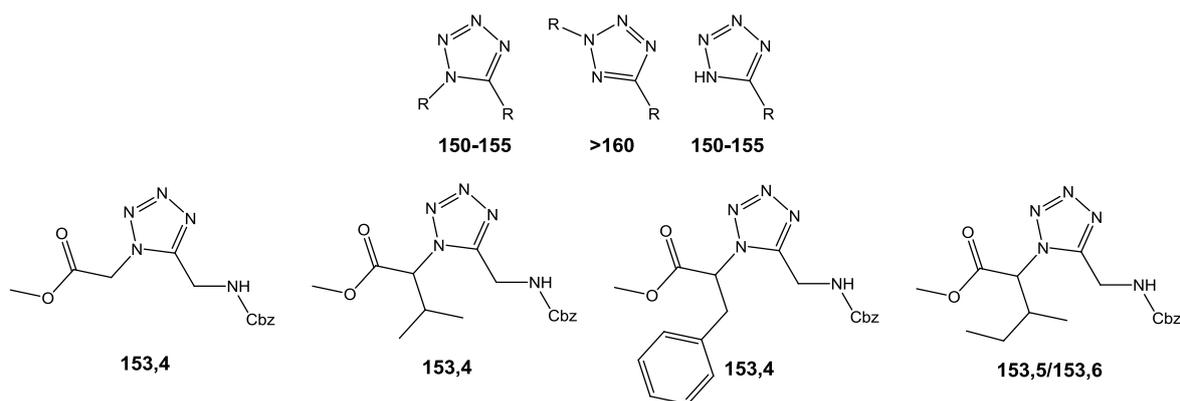


Abbildung 63, C^{13} -NMR-Shift in ppm

Wenn also 2,5-disubstituierte Tetrazole vorliegen würden, sollten demnach die Signale deutlich höher liegen. Leider konnten durch die nicht geglückte Kristallisation keine zusätzlichen Beweise dafür gefunden werden.

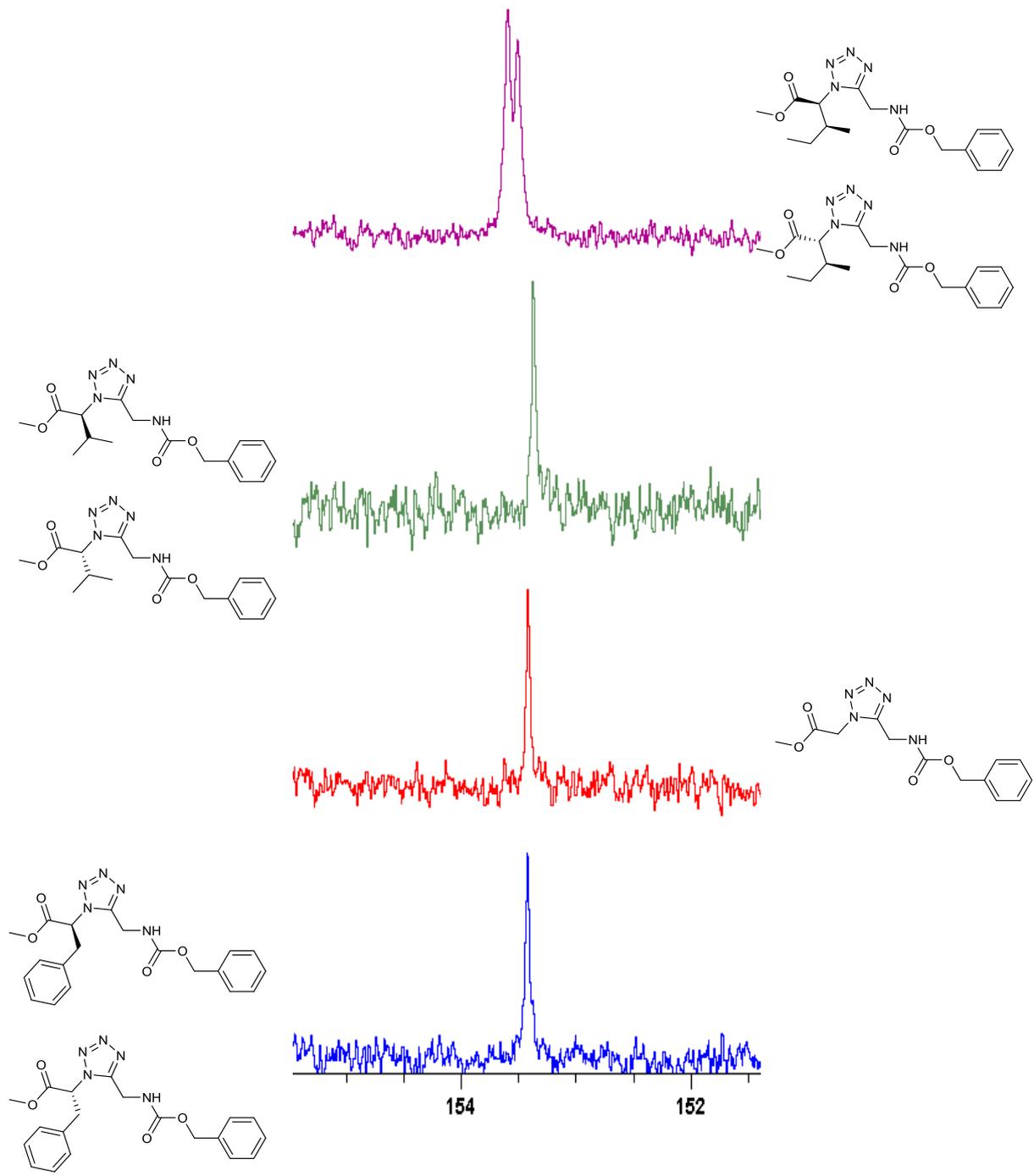
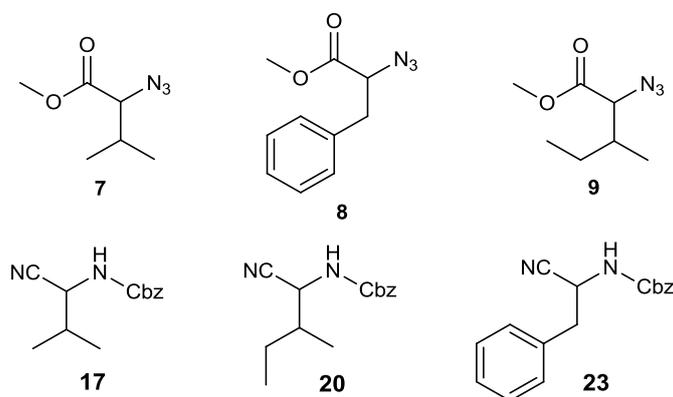


Abbildung 64, C^{13} -NMR der Tetrazole

Es wurde nun natürlich auch versucht, weitere Tetrazole, vor allem mit unterschiedlichen N-terminalen Aminosäuren herzustellen.



Nr.	Kat.	Mol %	Nitril	Azid	Eq. Azid	Temp.	Dauer	Ausbeute
32	Cu(OTf)	30	23	7	5	110°C	3d	-
33	Cu(OTf)	30	23	8	5	110°C	5d	-
34	Cu(OTf)	30	23	9	5	110°C	5d	-
35	Cu(OTf)	30	20	8	5	110°C	3d	-
36	Cu(OTf)	30	20	9	5	110°C	6d	-
37	Cu(OTf)	30	17	8	5	110°C	5d	-
38	Cu(OTf)	30	17	9	5	110°C	5d	-

Abbildung 65, Versuche zur Herstellung von Tetrazolen mit zwei Seitenketten

Obwohl einige der Reaktionen bei der Überprüfung mittels Dünnschichtchromatographie sehr vielversprechend aussahen, war es leider nicht möglich, die jeweiligen Produkte zu isolieren. Die gewünschten Tetrazole wären aufgrund der Seitenketten auch sterisch sehr Anspruchsvoll, was wohl der Grund dafür ist, dass kein Produkt isoliert werden konnte.

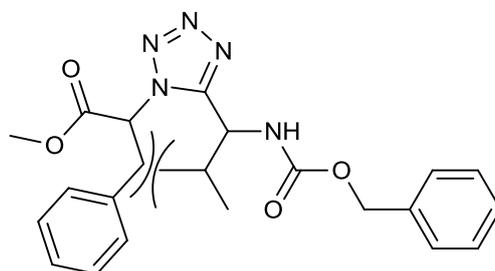


Abbildung 66, sterische Hinderung der Tetrazole mit zwei Seitenketten

4 Zusammenfassung

Es wurden jeweils vier Nitril- und Azid-Derivate ausgehend von den natürlichen Aminosäuren hergestellt. Die Schutzgruppen wurden im Laufe der Arbeit für die 1,3-Dipolaren Cycloadditionen optimiert.

Nach Untersuchung unterschiedlicher Katalysatoren, konnten mit Kupfer(I)triflat die besten Ergebnisse erzielt werden. Die Reaktionen wurden ohne Lösungsmittel bei 100 – 140°C durchgeführt.

Es konnten unterschiedliche Tetrazole aus den jeweiligen Aminosäurederivaten durch 1,3-Dipolare Cycloaddition hergestellt werden. Es handelte sich dabei aufgrund der NMR-Daten höchstwahrscheinlich auch um die gewünschten 1,5-disubstituierten Tetrazole. Es kam bei der Reaktion allerdings, wohl durch die sehr hohen Temperaturen, zu vollständiger Racemisierung am α -Kohlenstoff der C-terminalen Aminosäure. Es konnten bis zu 21% des gewünschten Produkts isoliert werden.

Die Synthese von Tetrazolen, in denen beide verwendeten Aminosäuren eine Seitenkette aufweisen, war leider erfolglos.

5 Abstract

Four different nitrile and azide derivatives were synthesized starting from the natural amino acids. In the course of this work, the protecting groups were optimized for the 1,3-dipolar cycloaddition.

After investigation of different catalysts, copper(I)triflate showed the best results. The reactions were performed without solvent at 100 – 140°C.

The synthesis of four different tetrazole cis-peptide bond mimetics could be achieved, through 1,3-dipolar cycloaddition. The desired tetrazole derivatives could be synthesized with up to 21% yield. The produced compounds are highly likely to be the 1,5-disubstituted tetrazole derivatives, due to comparison with published NMR spectra. In the course of the reaction the α -carbon of the C-terminal amino acid racemised, probably because of the rather harsh conditions.

The synthesis of additional tetrazole derivatives, starting from two side chain containing amino acids, was not possible.

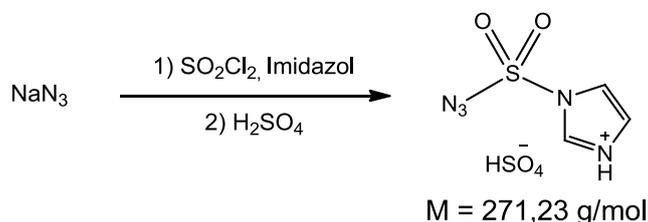
6 Experimentalteil

6.1 Allgemeines

Alle Reaktionen wurden magnetisch gerührt und die Ausbeuten beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf die sauberen Verbindungen. ^1H bzw. ^{13}C -Spektren wurden auf einem Bruker Avance DRX 400 bzw. einem Avance DPX 600 Spektrometer aufgenommen. Die chemische Verschiebung (δ) ist in parts per million [ppm] angegeben. Multiplizitäten sind als s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multipllett) verzeichnet und die entsprechenden Kopplungskonstanten (J) sind in Hertz [Hz] angegeben. Es wurde bei 298 K gemessen und auf den jeweiligen Lösungsmittelpeak referenziert (CDCl_3 : δ 7.26 for ^1H NMR, δ 77.16 for ^{13}C NMR, DMSO: δ 2.54 for ^1H NMR, δ 40.45 for ^{13}C NMR). IR Spektren wurden mit einem FT-IR-Bruker Vertex 70-Spektrometer mit dem Programm OPUS aufgenommen. Die Massen wurden auf einem ESI-Massenspektrometer Bruker maXis bzw. Bruker HCT aufgenommen, die EI-Massenspektren mit einem MAT-95S von Finnigan. Für säulenchromatographische Trennungen wurde Merck-Kieselgel 60 (40 – 63 μm) verwendet. Filtriert wurde mit Celite[®] S von Sigma Aldrich. Für die Dünnschichtchromatographie wurden Glasplatten der Firma Merck verwendet, DC Kieselgel 60 F₂₅₄. Die Detektion erfolgte im UV-Licht bei 254 nm mit einer "UVAC-60 neolab" UV-Lampe und durch Anfärben mit den Färbereagenzien Ammoniummolybdat-Cersulfat, Ninhydrin, Kaliumpermanganat bzw. Anisaldehyd und nachfolgender Verkohlung mit der Hotgun. Alle verwendeten Lösungsmittel wurden vor Verwendung destilliert. Absolutierte Lösungsmittel wurden über 4 Å Molekularsieb gelagert. Dichlormethan wurde durch destillieren über Phosphorpentoxid getrocknet. Deionisiertes Wasser wurde über ein Milli-Q* Reference Wasseraufbereitungssystem gereinigt.

6.2 Durchführungen

6.2.1 Synthese von 1-Azidosulfonyl-1H-imidazol-3-ium Hydrogensulfat



Durchführung:

In einem Rundkolben wird Natriumazid (1 Äq., 50 mmol, 3,25 g) in 30 mL Acetonitril suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wird Sulfurylchlorid (1 Äq., 50 mmol, 6,75 g, 4,05 mL) über 15 min zugetropft und die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am nächsten Tag wird die Lösung wieder auf 0 °C gekühlt und Imidazol (2 Äq., 100 mmol, 6,8 g) portionsweise innerhalb von 30 min zugegeben, bevor die Reaktionslösung 4 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt wird. Nach Reaktionsende wird die Lösung mit 30 mL Ethylacetat verdünnt und jeweils 2 mal mit je 30 mL destilliertem Wasser und gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Der Feststoff wird abfiltriert und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Anschließend wird langsam konzentrierte Schwefelsäure (1 Äq., 50 mmol, 5,15 g, 2,8 mL) zugetropft und die Reaktionsmischung 30 min bei 0 °C gerührt. Das erhaltene Gemisch wird über Nacht im Kühlschrank gekühlt und am nächsten Tag werden die weißen Kristalle abfiltriert. Der Niederschlag wird 2 mal mit je 10 mL Ethylacetat gewaschen und es wird keine weitere Reinigung benötigt.

Ausbeute: 11,536 g (43 mmol, 85% der Theorie).

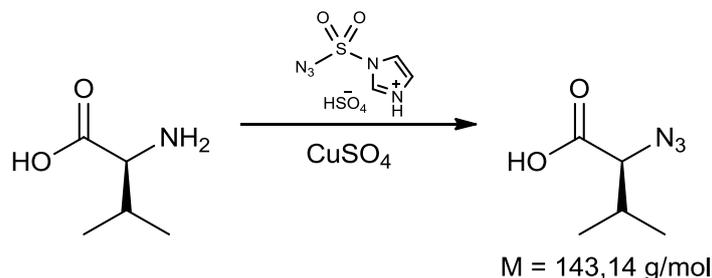
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400,27 MHz, D₂O) δ (ppm) 7.67 (dd, *J*₄₋₂ = 0.8 Hz, *J*₄₋₅ = 1.7 Hz, 1H, H-4), 7.79 (dd, *J*₅₋₂ = 1.4 Hz, *J*₅₋₄ = 1.7 Hz, 1H, H-5), 8.40 (m, 1H, H-2).

¹³C NMR (100,66 MHz, D₂O) δ (ppm) 119.28 (C-5), 134.37 (C-4), 137.59 (C-2).

HRMS (ESI⁺) *m/z* = 174.0082 [M+H]⁺, berechnet für C₃H₄N₅O₂S⁺: 174.0080.

6.2.2 Synthese von (S)-2-Azido-3-methylbutansäure



Durchführung:

In einem Rundkolben werden Valin (1 Äq., 17 mmol, 2 g), 1-Azidosulfonyl-1H-imidazol-3-ium Hydrogensulfat (1,1 Äq., 18,7 mmol, 5,4 g), K_2CO_3 (2,7 Äq., 45,9 mmol, 6,34 g), Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat (0,01 Äq., 0,17 mmol, 43 mg) und 100 mL Methanol vereinigt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in destilliertem Wasser und Methylenchlorid aufgenommen. Das Gemisch wird mit 6 M HCl auf pH = 1 gebracht und danach 3 mal mit je 30 mL Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne Reinigung weiterverarbeitet.

Ausbeute: 2,438 g (17 mmol, >99% der Theorie).

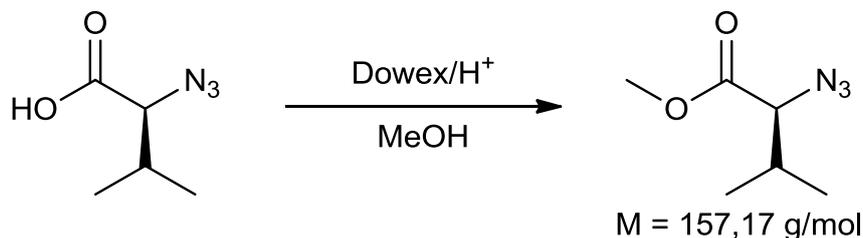
Produktcharakterisierung:

1H NMR (400,27 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 1.02 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3), 1.07 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3), 2.26 (m, 1H, $CH-CH_3$), 3.78 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, $CH-COOH$), 7.98 (b, 1H, $COOH$).

^{13}C NMR (100,66 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 17.7 (CH_3), 19.4 (CH_3), 30.9 ($CH-CH_3$), 67.9 ($CH-COOH$), 175.5 ($COOH$).

HRMS (ESI⁺) $m/z = 166.0579$ [$M+Na$]⁺, berechnet für $C_5H_9N_3O_2Na^+$: 166.0587.

6.2.3 Synthese von (2S)-2-Azido-3-methylbutansäuremethylester



Durchführung:

In einem Rundkolben werden (S)-2-Azido-3-methylbutansäure (14 mmol, 2 g) in 70 mL absolutem Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze Dowex H^+ versetzt. Die Reaktionslösung wird 24 h unter Rückfluss erhitzt. Der Fortschritt der Reaktion wird mittels NMR beobachtet. Nach Reaktionsende wird der Ionenaustauscher abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Das ölige Produkt wird mittels Kieselgelchromatographie (40 g Kieselgel) gereinigt (Laufmittel:Hexan:Ethylacetat = 19:1).

Ausbeute: 2,206 g (14 mmol, >99% der Theorie).

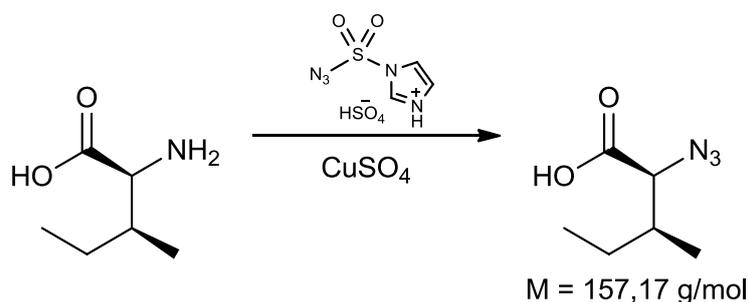
Produktcharakterisierung:

1H NMR (400,27 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 0.99 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3), 1.00 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3), 2.20 (m, 1H, $CH-CH_3$), 3.67 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, $CH-COOH$), 3.80 (s, 3H, $COOCH_3$).

^{13}C NMR (100,66 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 18.0 (CH_3), 19.3 (CH_3), 30.9 ($CH-CH_3$), 52.4 ($COOCH_3$), 68.2 ($CH-COOCH_3$), 170.6 ($COOCH_3$).

HRMS (ESI $^+$) $m/z = 180.0739$ [$M+Na$] $^+$, berechnet für $C_6H_{11}N_3O_2Na$: 180.0743.

6.2.4 Synthese von (2S,3S)-2-Azido-3-methylpentansäure



Durchführung:

In einem Rundkolben werden L-Isoleucin (1 Äq., 36,8 mmol, 4,836 g), 1-Azidosulfonyl-1H-imidazol-3-ium Hydrogensulfat (1 Äq., 36,8 mmol, 10 g), K_2CO_3 (2,7 Äq., 99,5 mmol, 13,7 g), Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat (0,01 Äq., 0,37 mmol, 92 mg) und 120 mL Methanol vereinigt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in destilliertem Wasser und Methylenchlorid aufgenommen. Das Gemisch wird mit 6 M HCl auf $\text{pH} = 1$ gebracht und danach 3 mal mit je 60 mL Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne Reinigung weiterverarbeitet.

Ausbeute: 5,68 g (36,1 mmol, 98% der Theorie).

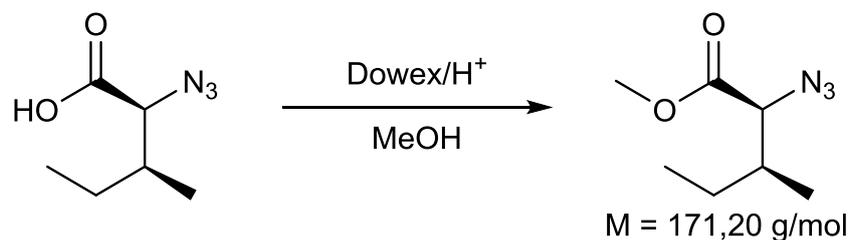
Produktcharakterisierung:

$^1\text{H NMR}$ (400,27 MHz, DMSO) δ (ppm) 0.86 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 0.93 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH-CH_3), 1.18 (m, 1H, CHHa-CH), 1.40 (m, 1H, CHHb-CH), 1.87 (m, 1H, CH-CH_2), 4.05 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, CH-COOH), 13.27 (b, 1H, COOH).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,66 MHz, DMSO) δ (ppm) 11.7 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 16.4 (CH-CH_3), 24.9 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 36.9 (CH-CH_3), 66.9 (CH-COOH), 171.8 (COOH).

HRMS (ESI) $m/z = 156,0780$ $[\text{M-H}]^-$, berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_2^-$: 156,0779.

6.2.5 Synthese von (2S,3S)-2-Azido-3-methylpentansäuremethylester



Durchführung:

In einem Rundkolben werden (2S,3S)-2-Azido-3-methylpentansäure (34,1 mmol, 5,36 g) in 70 mL absolutem Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze Dowex H⁺ versetzt. Die Reaktionslösung wird 48 h unter Rückfluss erhitzt. Der Fortschritt der Reaktion wird mittels NMR beobachtet. Nach Reaktionsende wird der Ionenaustauscher abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Das ölige Produkt wird mittels Kieselgelchromatographie (70 g Kieselgel) gereinigt (Laufmittel:Hexan:Ethylacetat = 19:1).

Ausbeute: 4,76 g (27,8 mmol, 82% der Theorie).

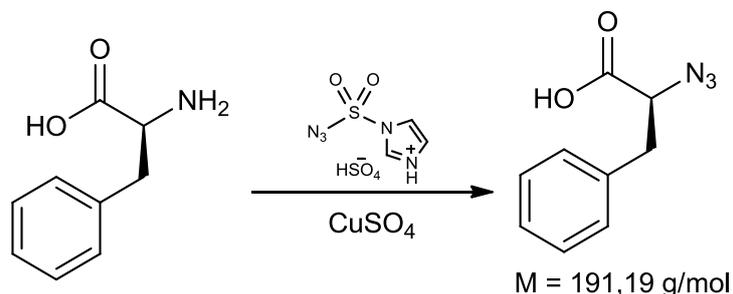
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400,27 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.92 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 0.97 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH-CH₃), 1.27 (m, 1H, CH^{H_a}-CH), 1.53 (m, 1H, CH^{H_b}-CH), 1.96 (m, 1H, CH-CH₂), 3.72 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, CH-COOCH₃), 3.80 (s, 3H, COOCH₃).

¹³C NMR (100,66 MHz, DMSO) δ (ppm) 11.1 (CH₂-CH₃), 15.8 (CH-CH₃), 25.0 (CH₂-CH₃), 37.2 (CH-CH₃), 52.3 (COOCH₃), 67.2 (CH-COOCH₃), 170.7 (COOCH₃).

HRMS (ESI⁺) *m/z* = 194,0896 [M+Na]⁺, berechnet für C₇H₁₃N₃O₂Na⁺: 194.0900.

6.2.6 Synthese von (2S)-2-Azido-3-phenylpropansäure



Durchführung:

In einem Rundkolben werden L-Phenylalanin (1 Äq., 30,3 mmol, 5 g), 1-Azidosulfonyl-1H-imidazol-3-ium Hydrogensulfat (1,1 Äq., 33 mmol, 9 g), K_2CO_3 (2,7 Äq., 81,8 mmol, 11,3 g), Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat (0,01 Äq., 0,3 mmol, 100 mg) und 120 mL Methanol vereinigt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in destilliertem Wasser und Methylenchlorid aufgenommen. Das Gemisch wird mit 6 M HCl auf pH = 1 gebracht und danach 3 mal mit je 60 mL Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne Reinigung weiterverarbeitet.

Ausbeute: 4,95 g (25,9 mmol, 86% der Theorie).

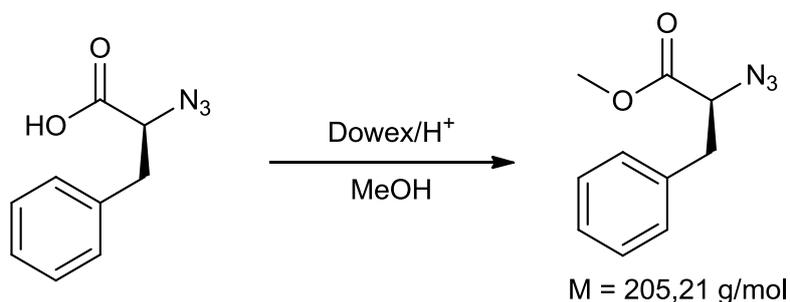
Produktcharakterisierung:

$^1\text{H NMR}$ (400,27 MHz, DMSO) δ (ppm) 2.92 (dd, $J_{\text{Hb}} = 14.2 \text{ Hz}$, $J_{\text{CH}} = 8.8 \text{ Hz}$, 1H, **CHa-Ph**), 3.11 (dd, $J_{\text{Ha}} = 14.2 \text{ Hz}$, $J_{\text{CH}} = 5.0 \text{ Hz}$, 1H, **CHb-Ph**), 4.37 (dd, $J_{\text{Ha}} = 8.8 \text{ Hz}$, $J_{\text{Hb}} = 5.0 \text{ Hz}$, 1H, **CH-COOH**), 7.21-7.35 (m, 5H, **CH_{Aromat}**).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,66 MHz, DMSO) δ (ppm) 36.6 (**CH₂**), 62.2 (**CH-COOH**), 126.7 - 129.2 (**CH_{Aromat}**), 136.7 (**C_{q Aromat}**), 171.2 (**COOH**).

HRMS (ESI-) $m/z = 190.0621$ [M-H]⁻, berechnet für $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_2^-$: 190.0662.

6.2.7 Synthese von (2S)-2-Azido-3-phenylpropansäuremethylester



Durchführung:

In einem Rundkolben werden (2S)-2-Azido-3-phenylpropansäure (30,48 mmol, 5,829 g) in 100 mL absolutem Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze Dowex H⁺ versetzt. Die Reaktionslösung wird 24 h unter Rückfluss erhitzt. Der Fortschritt der Reaktion wird mittels NMR beobachtet. Nach Reaktionsende wird der Ionenaustauscher abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Das ölige Produkt wird mittels Kieselgelchromatographie (70 g Kieselgel) gereinigt (Laufmittel:Hexan:Ethylacetat = 9:1).

Ausbeute: 5,332 g (25,9 mmol, 85% der Theorie).

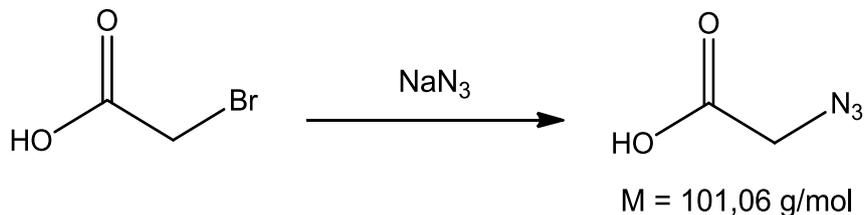
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400.27 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.01 (dd, $J_{Hb} = 14.0 \text{ Hz}$, $J_{CH} = 8.8 \text{ Hz}$, 1H, **CHa**-Ph), 3.18 (dd, $J_{Ha} = 14.0 \text{ Hz}$, $J_{CH} = 5.4 \text{ Hz}$, 1H, **CHb**-Ph), 3.78 (s, 3H, COO**CH**₃), 4.07 (dd, $J_{Ha} = 8.8 \text{ Hz}$, $J_{Hb} = 5.4 \text{ Hz}$, 1H, **CH**-COOH), 7.20-7.37 (m, 5H, **CH**_{Aromat}).

¹³C NMR (100,66 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 37.7 (**CH**₂), 52.6 (COO**CH**₃), 63.3 (**CH**-COOH), 127.3 - 129.2 (**CH**_{Aromat}), 135.9 (**C**_q _{Aromat}), 170.4 (COO**CH**₃).

HRMS (ESI⁺) $m/z = 228.0740$ [M+Na]⁺, berechnet für C₁₀H₁₁N₃O₂Na⁺: 228.0743.

6.2.8 Synthese von 2-Azidoessigsäure



Durchführung:

Bromessigsäure (1 Äq., 8,6 mmol, 1,2 g) wird in einem Rundkolben in 20 mL destiliertem Wasser gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wird Natriumazid (2 Äq., 18,4 mmol, 1,2 g) portionsweise zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht bei RT gerührt. Nach 24 h wird die Lösung mit 6 M HCl auf pH = 2 gebracht und 3 mal mit je 25 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne Reinigung weiterverarbeitet.

Ausbeute: 861 mg (8,5 mmol, 99% der Theorie).

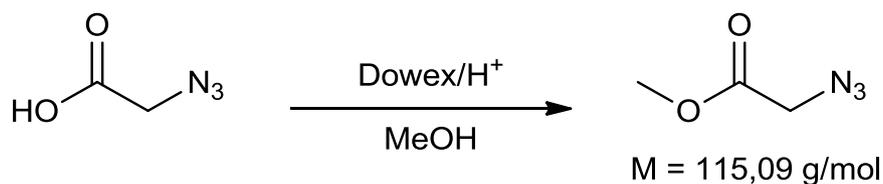
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400,27 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.98 (s, 2H, CH₂-COOH), 8.93 (b, 1H, COOH).

¹³C NMR (100,66 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 50.0 (CH₂), 173.7 (COOH).

HRMS (ESI) $m/z = 100,0156[M-H]^-$, berechnet für C₂H₂N₃O₂⁻: 100,0152.

6.2.9 Synthese von 2-Azidoessigsäuremethylester



Durchführung:

In einem Rundkolben werden 2-Azidoessigsäure (30,48 mmol, 5,829 g) in 100 mL absolutem Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze Dowex H^+ versetzt. Die Reaktionslösung wird 24 h unter Rückfluss erhitzt. Der Fortschritt der Reaktion wird mittels NMR beobachtet. Nach Reaktionsende wird der Ionenaustauscher abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Das ölige Produkt wird mittels Kieselgelchromatographie (15 g Kieselgel) gereinigt (Laufmittel:Hexan:Ethylacetat = 9:1).

Ausbeute: 634 mg (5,5 mmol, 65% der Theorie).

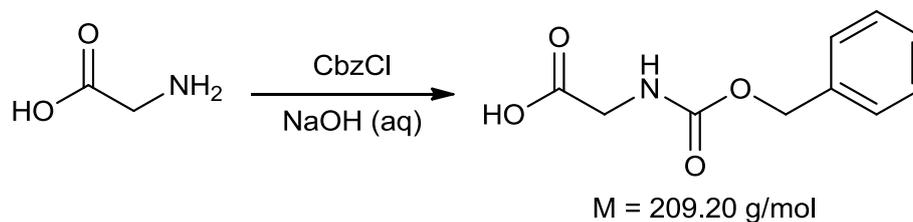
Produktcharakterisierung:

$^1\text{H NMR}$ (400,27 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.81 (s, 3H, CH_3), 3.88 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,66 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 50.3 (CH_2), 52.6 (CH_3), 168.7 (COOH).

HRMS (EI^+) $m/z = 115,0377[\text{M}]^+$, berechnet für $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2^+$: 115,0376.

6.2.10 Synthese von Cbz-Glycin



Durchführung:

In einem Dreihalsrundkolben wird Glycin (1 Äq., 13 mmol, 1 g) in 10 mL 2 M NaOH (aq) gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend werden Chlorameisensäurebenzylester (1,2 Äq., 16 mmol, 2,73 g, 2,3 mL) und 5 mL 4 M NaOH (aq) gleichzeitig über 30 min zugetropft, wobei darauf geachtet wird dass der pH deutlich basisch bleibt. Die Reaktionslösung wird nun 2h bei RT gerührt. Um überschüssigen Chlorameisensäurebenzylester abzutrennen, wird die Lösung 2 mal mit je 20 mL Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wird nun mit 6 M HCl auf pH = 1 gebracht und anschließend 3 mal mit je 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetat Phasen werden nun mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne Reinigung weiterverarbeitet.

Ausbeute: 2,673 (12,8 mmol, 98% der Theorie).

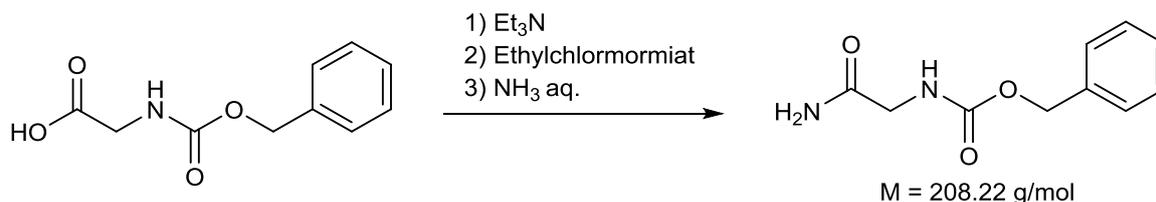
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400.27 MHz, DMSO) δ (ppm): 3.71 (d, $J_{NH} = 6.1$ Hz, 2H, CH₂-COOH), 5.08 (s, 2H, Ph-CH₂-O), 7.32-7.43 (m, 5H, C-H_{Aromat}), 7.58 (t, $J_{CH2} = 6.1$ Hz, 1H, NH).

¹³C NMR (100,66 MHz, DMSO) δ (ppm): 42.5 (CH₂-NH), 67.4 (Ph-CH₂), 127.1-129.0 (CH_{Aromat}), 136.0 (C_q-Aromat), 156.7 (COO-NH), 174.1 (COOH).

HRMS (ESI) $m/z = 208,0605[M-H]^-$, berechnet für C₁₀H₁₀NO₄⁻: 208,0615.

6.2.11 Synthese von Benzyl(2-amino-2-oxoethyl)carbamat



Durchführung:

Cbz-Glycin (1 Äq., 12,3 mmol, 2,577 g) wird in einem Rundkolben unter Argonatmosphäre in 25 mL absolutem Tetrahydrofuran gelöst und auf 0°C gekühlt. Triethylamin (1,02 Äq., 12,5 mmol, 1,27 g, 1,75 mL) wird langsam zugetropft und die Lösung 15 min gerührt. Anschließend wird Ethylchlorformiat (1,02 Äq., 12,5 mmol, 1,36 g, 1,2 mL) bei 0°C zugegeben. Nach 30 min Rühren werden 10 mL NH₃-Lösung (25% in Wasser) zugegeben und danach das Eisbad entfernt. Die Reaktionslösung wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 5 mal mit 50 mL Diethylether extrahiert. Das Lösungsmittel wird entfernt und der weiße Feststoff im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung für die nächste Stufe verwendet.

Ausbeute: 1,891 (9,08 mmol, 74% der Theorie).

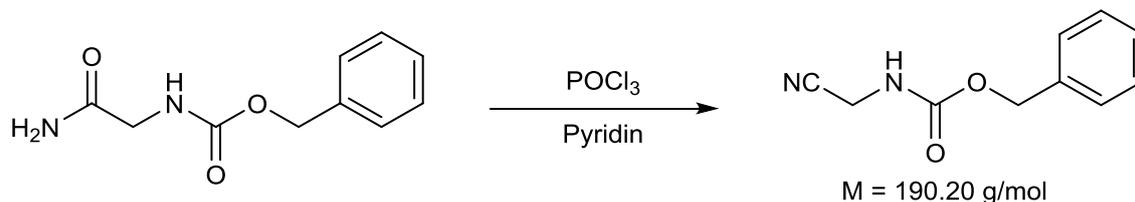
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400,27 MHz, DMSO) δ (ppm): 3.56 (d, $J_{NH} = 6.2$ Hz, 2H, CH₂-CONH₂), 5.04 (s, 2H, Ph-CH₂-O), 6.99 (m, 1H, NH), 7.23-7.49 (m, 7H, C-H_{Aromat} + NH₂).

¹³C NMR (100,66 MHz, DMSO) δ (ppm): 43.8 (CH₂-NH), 65.9 (Ph-CH₂), 128.2-128.9 (CH_{Aromat}), 137.6 (C_q-Aromat), 156.9 (COO-NH), 171.6 (CONH₂).

HRMS (ESI⁺) $m/z = 231.0738$ [M+Na]⁺, berechnet für C₁₀H₁₂N₂O₃Na⁺: 231.0740.

6.2.12 Synthese von Benzyl(cyanomethyl)carbamat



Durchführung:

In einem Rundkolben wird Benzyl(2-amino-2-oxoethyl)carbamate (1 Äq., 8,07 mmol, 1,68 g) unter Argonatmosphäre in 25 mL Pyridin gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wird Phosphorylchlorid (1,2 Äq., 9,8 mmol, 1,512 g, 0,9 mL) langsam zugetropft und die Lösung 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird nun mit 25 mL 2 M HCl gequench und 3 mal mit je 30 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit je 60 mL gesättigter CuSO₄ Lösung, destilliertem Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Kieselgelchromatographie (40 g Kieselgel) gereinigt (Laufmittel:Hexan:Ethylacetat = 2:1).

Ausbeute: 1,162 g (6,1 mmol, 76% der Theorie).

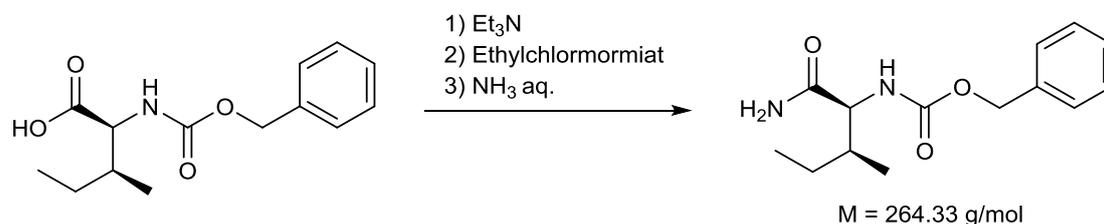
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400,27 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.13 (d, $J_{NH} = 5.2$ Hz, 2H, CH₂-CONH₂), 5.10 (m, 1H, NH), 5.16 (s, 2H, Ph-CH₂-O), 7.31-7.43 (m, 5H, C-H_{Aromat}).

¹³C NMR (100,66 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 29.5 (CH₂-NH), 68.0 (Ph-CH₂), 115.9 (CN), 128.4-128.7 (CH_{Aromat}), 135.5 (C_q-Aromat), 155.5 (COO-NH).

HRMS (ESI⁺) $m/z = 213,0638$ [M+Na]⁺, berechnet für C₁₀H₁₂N₂O₃Na⁺: 231,0634.

6.2.13 Synthese von (2S,3S)-Benzyl(1-amino-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)carbamat



Durchführung:

Cbz-Isoleucin (1 Äq., 18,85 mmol, 5 g) wird in einem Rundkolben unter Argonatmosphäre in 40 mL absolutem Tetrahydrofuran gelöst und auf 0°C gekühlt. Triethylamin (1 Äq., 19 mmol, 1,92 g, 2,65 mL) wird langsam zugetropft und die Lösung 15 min gerührt. Anschließend wird Ethylchlorformiat (1 Äq., 19 mmol, 2,06 g, 1,81 mL) bei 0°C zugegeben. Nach 30 min Rühren werden 10 mL NH₃-Lösung (25% in Wasser) zugegeben und danach das Eisbad entfernt. Die Reaktionslösung wird 4 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 5 mal mit je 100 mL Diethylether extrahiert. Das Lösungsmittel wird entfernt und der weiße Feststoff im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung für die nächste Stufe verwendet.

Ausbeute: 5,39 g (20 mmol, >99% der Theorie).

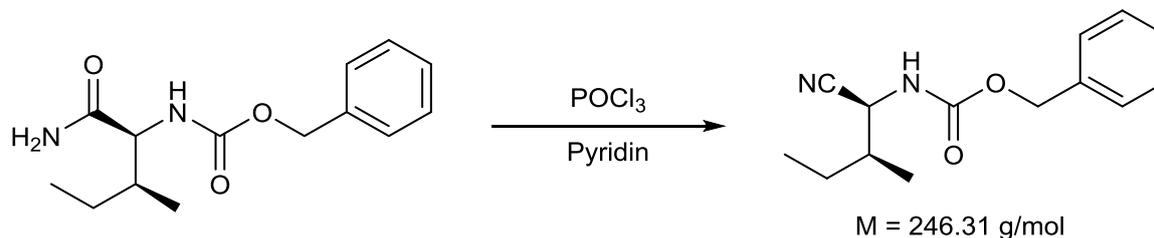
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400,27 MHz, DMSO) δ (ppm): 0.81 (m, 3H, CH₂-CH₃), 0.84 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH-CH₃), 1.13 (m, 1H, CH^{H_a}-CH), 1.42 (m, 1H, CH^{H_b}-CH), 1.70 (m, 1H, CH-CH₂), 3.84 (dd, *J*_{CH} = 7.6 Hz, *J*_{NH} = 8.7 Hz, 1H, CH-NH), 5.03 (s, 2H, Ph-CH₂-O), 7.16 (d, *J*_{CH} = 8.7 Hz, 1H, NH), 7.32-7.42 (m, 5H, C-H_{Aromat}).

¹³C NMR (100,66 MHz, DMSO) δ (ppm): 11.5 (CH₂-CH₃), 16.0 (CH-CH₃), 24.8 (CH₂-CH₃), 36.8 (CH-CH₃), 59.6 (CH-NH), 65.8 (Ph-CH₂), 128.1-128.9 (CH_{Aromat}), 137.6 (C_{q-Aromat}), 156.5 (COO-NH), 173.7 (CONH₂).

HRMS (ESI⁺) *m/z* = 287,1370 [M+Na]⁺, berechnet für C₁₄H₂₀N₂O₃Na⁺: 287,1366.

6.2.14 Synthese von (1S,2S)-Benzyl(1-cyano-2-methylbutyl)carbamat



Durchführung:

In einem Rundkolben wird Benzyl(1-amino-3-methyl-1-oxopentane-2-yl)carbamate (1 Äq., 18,85 mmol, 5,1 g) unter Argonatmosphäre in 40 mL Pyridin gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wird Phosphorylchlorid (1 Äq., 19 mmol, 2,91 g, 1,74 mL) langsam zugetropft und die Lösung 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird nun mit 25 mL 2 M HCl gequenchet und 3 mal mit je 80 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit je 150 mL gesättigter CuSO₄ Lösung, destilliertem Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Kieselgelchromatographie (70 g Kieselgel) gereinigt (Laufmittel:Hexan:Ethylacetat = 2:1).

Ausbeute: 3,845 g (15,6 mmol, 83% der Theorie).

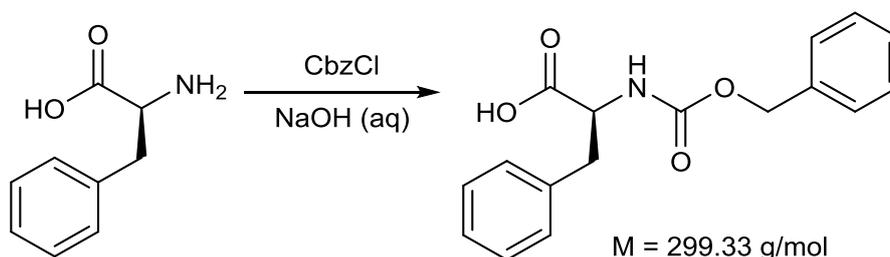
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400,27 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 1.08 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH-CH₃), 1.32 (m, 1H, CH^{H_a}-CH), 1.58 (m, 1H, CH^{H_b}-CH), 1.79 (m, 1H, CH-CH₂), 4.63 (m, 1H, CH-CN), 5.07 (m, 1H, NH), 5.15 (s, 2H, Ph-CH₂-O), 7.32-7.42 (m, 5H, C-H_{Aromat}).

¹³C NMR (100,66 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11.1 (CH₂-CH₃), 14.9 (CH-CH₃), 25.7 (CH₂-CH₃), 38.1 (CH-CH₃), 47.8 (CH-NH), 67.8 (Ph-CH₂), 117.5 (CN), 128.3-128.7 (CH_{Aromat}), 135.6 (C_q-Aromat), 155.2 (COO-NH).

HRMS (ESI⁺) *m/z* = 269,1263 [M+Na]⁺, berechnet für C₁₄H₁₈N₂O₂Na⁺: 269,1260.

6.2.15 Synthese von (2S)-Cbz-Phenylalanin



Durchführung:

In einem Dreihalsrundkolben wird Phenylalanin (1 Äq., 30,25 mmol, 5 g) in 15 mL 2 M NaOH (aq) gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend werden Chlorameisensäurebenzylester (1,14 Äq., 34 mmol, 5,82 g, 4,9 mL) und 5 mL 4 M NaOH (aq) gleichzeitig über 30 min zutropft, wobei darauf geachtet wird, dass der pH deutlich basisch bleibt. Die Reaktionslösung wird nun 2h bei RT gerührt. Um überschüssigen Chlorameisensäurebenzylester abzutrennen, wird die Lösung 2 mal mit je 30 mL Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wird nun mit 6 M HCl auf pH = 1 gebracht und anschließend 3 mal mit je 80 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetat-Phasen werden nun mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne Reinigung weiterverarbeitet.

Ausbeute: 9,05 g (30,23 mmol, >99% der Theorie).

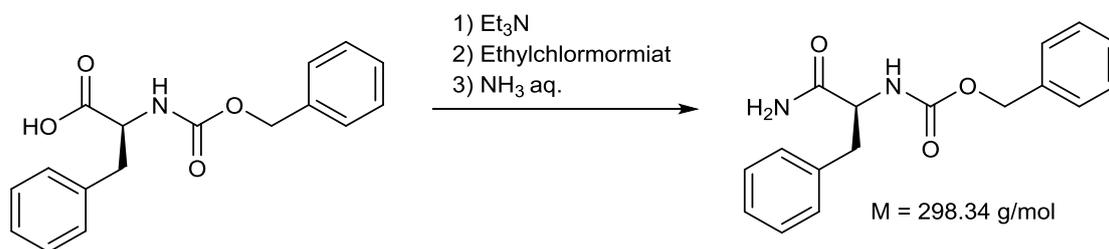
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400,27 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.11 (dd, $J_{Ha} = 13.9 \text{ Hz}$, $J_{CH} = 6.2 \text{ Hz}$, 1H, CH_a-Ph), 3.16 (dd, $J_{Ha} = 13.9 \text{ Hz}$, $J_{CH} = 5.2 \text{ Hz}$, 1H, CH_b-Ph), 4.70 (m, 1H, CH-COOH), 5.10 (s, 2H, Ph-CH₂-O), 5.18 (d, $J = 7.8 \text{ Hz}$ 1H, NH), 7.11-7.41 (m, 10H, C-H_{Aromat}).

¹³C NMR (100,66 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 37.7 (CH₂-CH), 54.6 (CH-NH), 67.2 (Ph-CH₂), 127.3-129.3 (CH_{Aromat}), 135.4, 136.1 (C_q-Aromat), 155.9 (COO-NH), 175.8 (COOH).

HRMS (ESI⁺) $m/z = 322,1053 [M+Na]^+$, berechnet für C₁₇H₁₇NO₄Na⁺: 322,1050.

6.2.16 Synthese von (2S)-Benzyl(1-amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamat



Durchführung:

Cbz-Phenylalanin (1 Äq., 30,25 mmol, 9,05 g) wird in einem Rundkolben unter Argonatmosphäre in 50 mL absolutem Tetrahydrofuran gelöst und auf 0°C gekühlt. Triethylamin (1,1 Äq., 33,27 mmol, 3,37 g, 4,61 mL) wird langsam zugetropft und die Lösung 15 min gerührt. Anschließend wird Ethylchloroformiat (1,1 Äq., 33,27 mmol, 3,61 g, 3,17 mL) bei 0°C zugegeben. Nach 30 min Rühren werden 9 mL NH₃-Lösung (25% in Wasser) zugegeben und danach das Eisbad entfernt. Die Reaktionslösung wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 5 mal mit je 100 mL Diethylether extrahiert. Das Lösungsmittel wird entfernt und der weiße Feststoff im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung für die nächste Stufe verwendet.

Ausbeute: 8,54 g (28,62 mmol, 95% der Theorie).

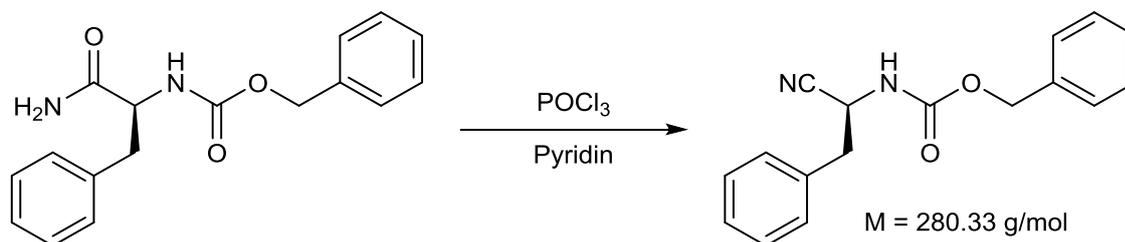
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400,27 MHz, DMSO) δ (ppm): 2.76 (dd, $J_{Ha} = 13.7$ Hz, $J_{CH} = 10.6$ Hz, 1H, CH_a-Ph), 3.00 (m, 1H, CH_b-Ph), 4.18 (m, 1H, CH-NH), 4.95 (s, 2H, Ph-CH₂-O), 7.02-7.53 (m, 12H, C-H_{Aromat} + NH₂).

¹³C NMR (100,66 MHz, DMSO) δ (ppm): 46.1 (CH₂-CH), 56.6 (CH-NH), 65.6 (Ph-CH₂), 126.7-129.6 (CH_{Aromat}), 137.6, 138.8 (C_q-Aromat), 156.3 (COO-NH), 173.9 (CONH₂).

HRMS (ESI⁺) $m/z = 321,1213$ [M+Na]⁺, berechnet für C₁₇H₁₈N₂O₃Na⁺: 321,1210.

6.2.17 Synthese von (1S)-Benzyl(1-cyano-2-phenylethyl)carbamat



Durchführung:

In einem Rundkolben wird Benzyl(1-amino-2-oxo-3-phenylpropan-2-yl)carbamat (1 Äq., 28,62 mmol, 8,54 g) unter Argonatmosphäre in 70 mL Pyridin gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wird Phosphorylchlorid (1,1 Äq., 31,49 mmol, 4,83 g, 2,87 mL) langsam zugetropft und die Lösung 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird nun mit 70 mL 2 M HCl gequenchet und 3 mal mit je 100 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit je 150 mL gesättigter CuSO₄ Lösung, destilliertem Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Kieselgelchromatographie (70 g Kieselgel) gereinigt (Laufmittel:Hexan:Ethylacetat = 2:1).

Ausbeute: 2,74 g (9,77 mmol, 34% der Theorie).

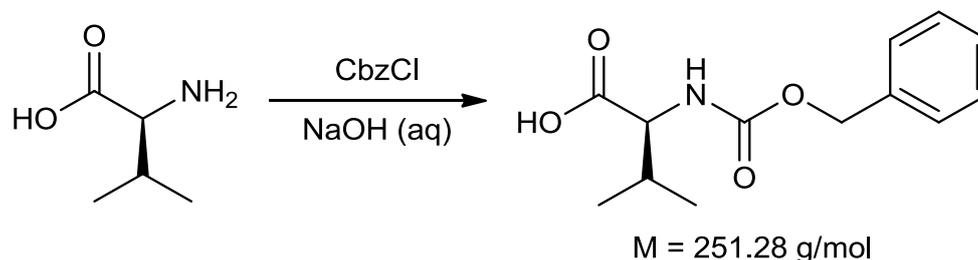
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400,27 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.07 (dd, $J_{Ha} = 13.8$ Hz, $J_{CH} = 6.9$ Hz, 1H, CH_a-Ph), 3.14 (dd, $J_{Ha} = 13.8$ Hz, $J_{CH} = 5.3$ Hz, 1H, CH_b-Ph), 4.94 (m, 1H, CH-CN), 5.13 (s, 2H, Ph-CH₂-O), 7.21-7.42 (m, 10H, C-H_{Aromat}).

¹³C NMR (100,66 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 39.0 (CH₂-CH), 43.8 (CH-CN), 67.8 (CH₂-O), 118.0 (CH-CN), 128.1-129.5 (CH_{Aromat}), 133.6, 135.6 (C_q-Aromat), 154.1 (COO-NH).

HRMS (ESI⁺) $m/z = 303,1110$ [M+Na]⁺, berechnet für C₁₇H₁₆N₂O₂Na⁺: 303,1104.

6.2.18 Synthese von (2S)-Cbz-Valin



Durchführung:

In einem Dreihalsrundkolben wird Valin (1 Äq., 34,14 mmol, 4 g) in 15 mL 2 M NaOH (aq) gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend werden Chlorameisensäurebenzylester (1,14 Äq., 38,93 mmol, 6,64 g, 5,6 mL) und 25 mL 2 M NaOH (aq) gleichzeitig über 30 min zugetropft, wobei darauf geachtet wird, dass der pH deutlich basisch bleibt. Die Reaktionslösung wird nun 2h bei RT gerührt. Um überschüssigen Chlorameisensäurebenzylester abzutrennen, wird die Lösung 2 mal mit je 30 mL Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wird nun mit 6 M HCl auf pH = 1 gebracht und anschließend 3 mal mit je 100 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetat-Phasen werden nun mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde ohne Reinigung weiterverarbeitet.

Ausbeute: 8,54 g (9,77 mmol, 99% der Theorie).

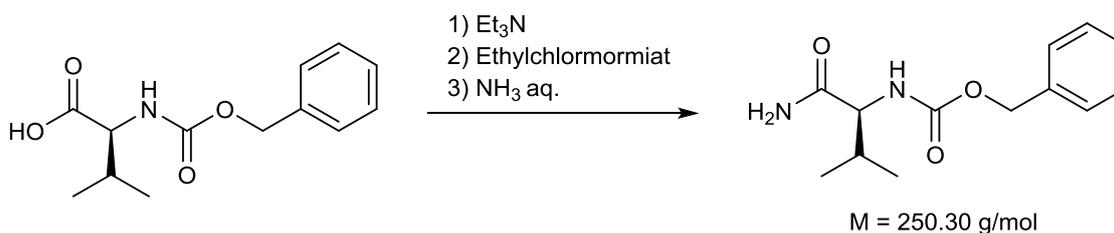
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400,27 MHz, DMSO) δ (ppm): 0.89 (t, $J_{CH} = 6.8$ Hz, 6H, CH-(CH₃)₂), 2.05 (m, 1H, CH-CH₃), 3.87 (dd, $J_{NH} = 8.3$ Hz, $J_{CH} = 5.8$ Hz, 1H, CH-COOH), 5.04 (s, 2H, Ph-CH₂-O), 7.28-7.41 (m, 5H, C-H_{Aromat}), 7.45 (t, $J_{CH2} = 8.3$ Hz, 1H, NH).

¹³C NMR (100,66 MHz, DMSO) δ (ppm): 18.0 (CH-CH₃), 19.1 (CH-CH₃), 29.5 (CH-CH₃), 59.4 (Ph-CH₂), 65.4 (CH-NH), 127.7-128.3 (CH_{Aromat}), 137.0 (C_q-Aromat), 156.4 (COO-NH), 173.2 (COOH).

HRMS (ESI⁺) $m/z = 274,1055$ [M+Na]⁺, berechnet für C₁₃H₁₇NO₄Na⁺: 274,1050.

6.2.19 Synthese Benzyl-(S)-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)carbamat



Durchführung:

Cbz-Valin (1 Äq., 36,61 mmol, 9,20 g) wird in einem Rundkolben unter Argonatmosphäre in 50 mL absolutem Tetrahydrofuran gelöst und auf 0°C gekühlt. Triethylamin (1,1 Äq., 40,27 mmol, 4,06 g, 5,58 mL) wird langsam zugetropft und die Lösung 20 min gerührt. Anschließend wird Ethylchlorformiat (1,1 Äq., 40,27 mmol, 4,37 g, 3,83 mL) bei 0°C zugegeben. Nach 30 min Rühren werden 9 mL NH₃-Lösung (25% in Wasser) zugegeben und danach das Eisbad entfernt. Die Reaktionslösung wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 5 mal mit je 100 mL Diethylether extrahiert. Das Lösungsmittel wird entfernt und der weiße Feststoff im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung für die nächste Stufe verwendet.

Ausbeute: 7,11 g (28,41 mmol, 78% der Theorie).

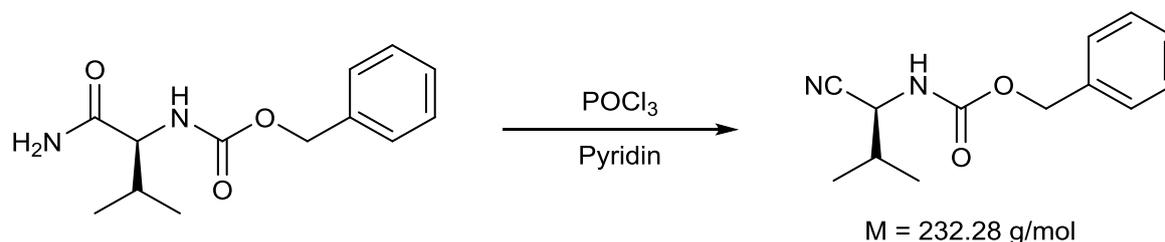
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400,27 MHz, DMSO) δ (ppm): 0.84 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 0.88 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.96 (m, 1H, CH-CH₃), 3.87 (dd, *J*_{NH} = 8.8 Hz, *J*_{CH} = 6.8 Hz, 1H, CH-CONH₂), 5.04 (s, 2H, Ph-CH₂-O), 7.28-7.42 (m, 5H, C-H_{Aromat}), 7.12 (t, *J*_{CH2} = 8.8 Hz, 1H, NH).

¹³C NMR (100,66 MHz, DMSO) δ (ppm): 18.4 (CH-CH₃), 19.8 (CH-CH₃), 30.6 (CH-CH₃), 60.5 (Ph-CH₂), 65.8 (CH-NH), 128.1-128.8 (CH_{Aromat}), 137.6 (C_q-Aromat), 156.6 (COO-NH), 173.6 (CONH₂).

HRMS (ESI⁺) *m/z* = 273,1215 [M+Na]⁺, berechnet für C₁₃H₁₈N₂O₃Na⁺: 273,1210.

6.2.20 Synthese Benzyl-(S)-(1-cyano-2-methylpropyl)carbamat



Durchführung:

In einem Rundkolben wird Benzyl-(S)-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)carbamat (1 Äq., 28,36 mmol, 7,10 g) unter Argonatmosphäre in 50 mL Pyridin gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wird Phosphorylchlorid (1,1 Äq., 29,57 mmol, 4,54 g, 2,70 mL) langsam zugetropft und die Lösung 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird nun mit 60 mL 2 M HCl gequenchet und 3 mal mit je 80 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit je 100 mL gesättigter CuSO₄ Lösung, destilliertem Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Kieselgelchromatographie (70 g Kieselgel) gereinigt (Laufmittel:Hexan:Ethylacetat = 2:1).

Ausbeute: 4,04 g (17,39 mmol, 61% der Theorie).

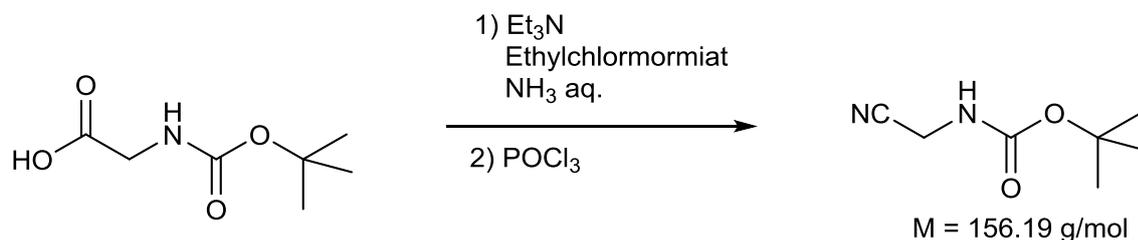
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400,27 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.08 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.10 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 2.05 (m, 1H, CH-CH₃), 4.53 (m, 1H, CH-CN), 5.07 (m, 1H, NH), 5.15 (s, 2H, Ph-CH₂-O), 7.31-7.41 (m, 5H, C-H_{Aromat}).

¹³C NMR (100,66 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 17.9 (CH-CH₃), 18.5 (CH-CH₃), 31.8 (CH-CH₃), 49.0 (CH-CN), 67.8 (Ph-CH₂), 117.6 (CN), 128.3-128.7 (CH_{Aromat}), 135.6 (C_q-Aromat), 155.2 (COO-NH).

HRMS (ESI⁺) *m/z* = 255,1109[M+Na]⁺, berechnet für C₁₃H₁₆N₂O₂Na⁺: 255,1104.

6.2.21 Synthese von tert-Butyl (cyanomethyl)carbamate



Durchführung:

Boc-Glycin (1 Äq., 17, 1 mmol, 3 g) wird in einem Rundkolben unter Argonatmosphäre in 50 mL absolutem Methylenchlorid gelöst und auf -5°C gekühlt. Triethylamin (1,1 Äq., 19 mmol, 1,92 g, 2,6 mL) wird langsam zugegeben und die Lösung 15 min gerührt. Anschließend wird Ethylchlorformiat (1,1 Äq., 19 mmol, 2,06 g, 1,8 mL) bei -5°C zugegeben. Nach 30 min Rühren werden 10 mL NH₃-Lösung (25% in Wasser) zugegeben und danach das Eisbad entfernt. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit Wasser verdünnt und 3 mal mit je 50 mL Diethylether extrahiert. Das entstandene Amid wird nun unter Argonatmosphäre in 25 mL Pyridin gelöst und auf 0°C gekühlt. In Folge wird Phosphorylchlorid (0,7 Äq., 13 mmol, 2 g, 1,2 mL) langsam zugegeben und die Lösung 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird auf 0°C gekühlt mit 40 mL 1 M HCl gequench und zügig 3 mal mit je 50 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit je 80 mL gesättigter CuSO₄ Lösung, destilliertem Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Kieselgelchromatographie (25 g Kieselgel) gereinigt (Laufmittel:Hexan:Ethylacetat = 2:1).

Ausbeute: 0,84 g (5,18 mmol, 30% der Theorie).

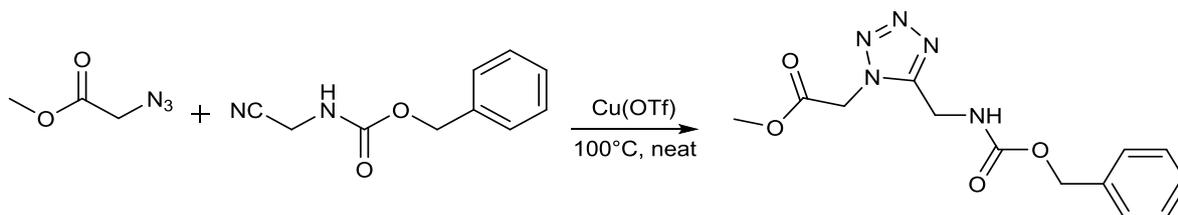
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400,27 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.47 (s, 9H, C-(CH₃)₃), 4.06 (m, 2H, CH₂), 4,84 (m, 1H, NH).

¹³C NMR (100,66 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 28.2 ((CH₃)₃), 29.1 (CH₂-NH), 81.5 (C-(CH₃)₃), 116.3 (CN).

HRMS (ESI⁺) *m/z* = 179,0793[M+Na]⁺, berechnet für C₇H₁₂N₂O₂Na⁺: 179,0791.

6.2.22 Synthese von Methyl 2-(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)acetat



Durchführung:

In einem Rundkolben wird Benzyl(cyanomethyl)carbamate (1 Äq., 0,63 mmol, 118 mg) in 2-Azidoessigsäuremethylester (13,4 Äq., 8,33 mmol, 950 mg) gelöst und mit Kupfer(I)triflat (0,5 Äq., 0,33 mmol, 70 mg) versetzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 7 Tage bei 100°C gerührt. Der Reaktionsfortschritt wird mittels Dünnschichtchromatographie beobachtet. Nachdem mittels Dünnschichtchromatographie kein Benzyl(cyanomethyl)carbamate mehr nachgewiesen werden kann, wird die Lösung auf Raumtemperatur gebracht und direkt mittels Kieselgelchromatographie (70 g Kieselgel) gereinigt (Laufmittel:Hexan:Ethylacetat = 2:1).

Ausbeute: 37 mg (0,12 mmol, 20% der Theorie).

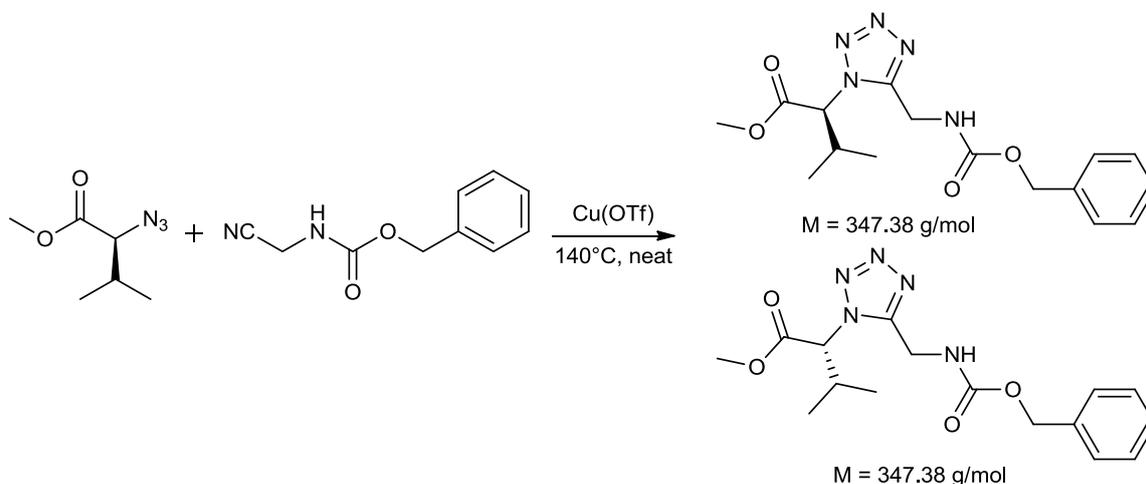
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400,27 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.77 (s, 3H, CH₃), 4.64 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH₂-NH), 5.08 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.39 (s, 2H, CH₂-CO), 5.75 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, NH), 7.24-7.38 (m, 5H, C-H_{Aromat}).

¹³C NMR (100,66 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 33.6 (CH₂-NH), 48.1 (CH₂-CO), 53,3 (O-CH₃), 67.5 (Ph-CH₂), 128.1-128.6 (CH_{Aromat}), 135.6 (C_{q-Aromat}), 153.4 (CN₄), 156.7 (COO-NH), 166.1 (COOCH₃).

HRMS (ESI⁺) *m/z* = 328,1010[M+Na]⁺, berechnet für C₁₃H₁₅N₅O₄Na⁺: 328,1016.

6.2.23 Synthese von Methyl (S)-2-(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)-3-methylbutanoat und Methyl (R)-2-(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)-3-methylbutanoat



Durchführung:

In einem Rundkolben wird Benzyl(cyanomethyl)carbamate (1 Äq., 2,68 mmol, 510 mg) in 2-Azido-3-methylbutansäuremethylester (4,8 Äq., 12,86 mmol, 2,02 g) gelöst und mit Kupfer(I)triflat (0,17 Äq., 0,47 mmol, 100 mg) versetzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 2 Tage bei 140°C gerührt. Der Reaktionsfortschritt wird mittels Dünnschichtchromatographie beobachtet. Nachdem mittels Dünnschichtchromatographie kein Benzyl(cyanomethyl)carbamate mehr nachgewiesen werden kann, wird die Lösung auf Raumtemperatur gebracht und direkt mittels Kieselgelchromatographie (70 g Kieselgel) gereinigt (Laufmittel:Hexan:Ethylacetat = 2:1).

Ausbeute: 100 mg (0,29 mmol, 11% der Theorie).

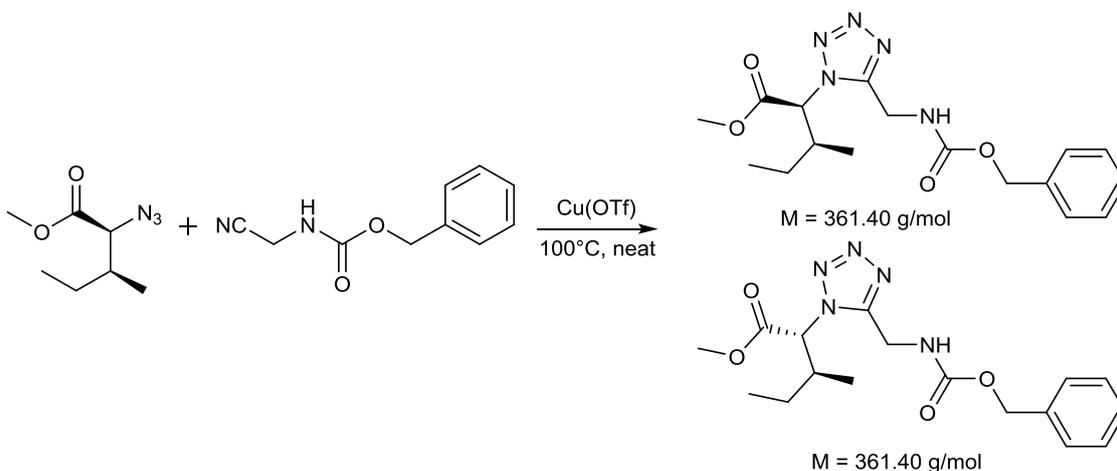
Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400,27 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.89 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, CH₃), 1.07 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, CH₃), 2.85 (m, 1H, CH-CH₃), 3.70 (s, 3H, CH₃), 4.69 (m, 1H, CH-CO), 5.11 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.18 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, CH₂-NH), 5.78 (m, 1H, NH), 7.27-7.39 (m, 5H, C-H_{Aromat}).

¹³C NMR (100,66 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 18.8 (CH-CH₃), 19.2 (CH-CH₃), 30.4 (CH-CH₃), 34.0 (CH₂-NH), 53.0 (O-CH₃), 66.0 (CH-CO), 67.5 (Ph-CH₂), 128.1-128.6 (CH_{Aromat}), 135.7 (C_q-Aromat), 153.4 (CN₄), 156.4 (COO-NH), 167.6 (COOCH₃).

HRMS (ESI⁺) *m/z* = 370,1489[M+Na]⁺, berechnet für C₁₆H₂₁N₅O₄Na⁺: 370,1486.

6.2.24 Synthese von Methyl (2S,3S)-2-(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)-3-methylpentanoat und Methyl (2R,3S)-2-(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)-3-methylpentanoat



Durchführung:

In einem Rundkolben wird Benzyl(cyanomethyl)carbamate (1 Äq., 1,05 mmol, 200 mg) in 2-Azido-3-methylpentansäuremethylester (4,5 Äq., 4,7 mmol, 806 mg) gelöst und mit Kupfer(I)triflat (0,31 Äq., 0,33 mmol, 70 mg) versetzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 3 Tage bei 110°C gerührt. Der Reaktionsfortschritt wird mittels Dünnschichtchromatographie beobachtet. Nachdem mittels Dünnschichtchromatographie kein Benzyl(cyanomethyl)carbamate mehr nachgewiesen werden kann, wird die Lösung auf Raumtemperatur gebracht und direkt mittels Kieselgelchromatographie (70 g Kieselgel) gereinigt (Laufmittel:Hexan:Ethylacetat = 2:1). Die entstandenen Diastereomere konnten nicht voneinander getrennt werden.

Ausbeute: 80 mg (0,22 mmol, 21% der Theorie).

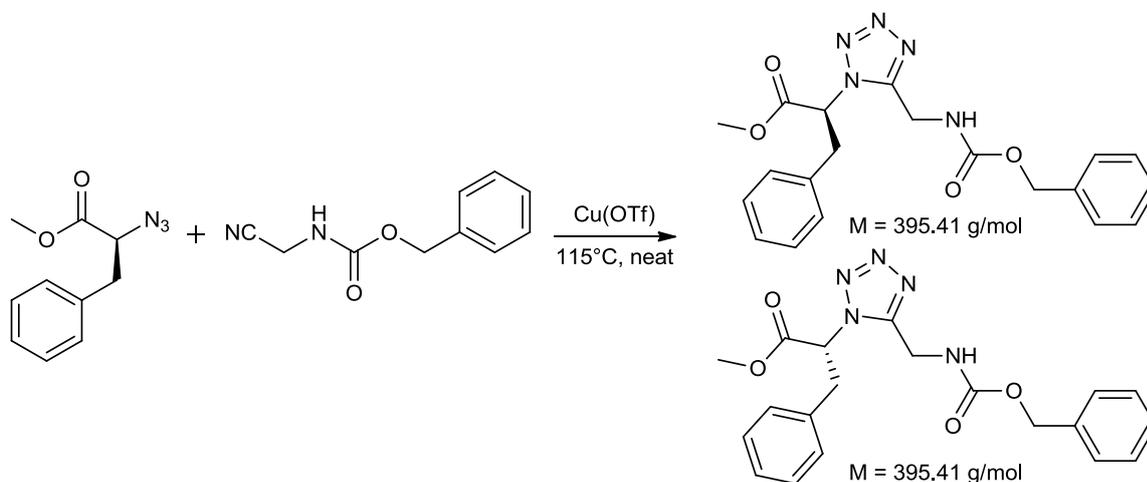
Produktcharakterisierung:

$^1\text{H NMR}$ (400,27 MHz, CDCl_3) δ (ppm):) 0.85 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 0.91 (m, 3H, CH-CH_3), 1.22 (m, 1H, CHHa-CH), 1.50 (m, 1H, CHHb-CH), 2.60 (m, 1H, CH-CH_2), 3.67 (s, 3H, CH_3), 4.66 (m, 1H, CH-CO), 5.09 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 5.27 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 6.08 (m, 1H, NH), 7.24-7.36 (m, 5H, $\text{C-H}_{\text{Aromat}}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (100,66 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 11.0, 11.1 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 15.3, 15,6 (CH-CH_3), 25.5, 25.8 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 34.0, 34.1 (CH-CH_3), 36.0, 36.0 ($\text{CH}_2\text{-NH}$), 53.0, 53.0 (O-CH_3), 64.7, 65.1 (CH-CO), 67.4, 67.4 (Ph-CH_2), 128.1-128.5 ($\text{CH}_{\text{Aromat}}$), 135.9, 135.9 ($\text{C}_{\text{q-Aromat}}$), 153.5, 153.6 (CN_4), 156.5, 156.5 (COO-NH), 167.8, 167.8 (COOCH_3).

HRMS (ESI⁺) $m/z = 384,1635[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_4\text{Na}^+$: 384,1642.

6.2.25 Synthese von Methyl (2S)-2-(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)-3-phenylpropanoat und Methyl (2R)-2-(5-(((benzyloxy)carbonyl)amino)methyl)-1H-tetrazol-1-yl)-3-phenylpropanoat



Durchführung:

In einem Rundkolben wird Benzyl(cyanomethyl)carbammat (1 Äq., 1,31 mmol, 250 mg) in (2S)-2-Azido-3-phenylpropanensäuremethylester (4,8 Äq., 4,87 mmol, 1,00 g) gelöst und mit Kupfer(I)triflat (0,10 Äq., 0,13 mmol, 28 mg) versetzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 4 Tage bei 115°C gerührt. Der Reaktionsfortschritt wird mittels Dünnschichtchromatographie beobachtet. Nachdem mittels Dünnschichtchromatographie kein Benzyl(cyanomethyl)carbammat mehr nachgewiesen werden kann, wird die Lösung auf Raumtemperatur gebracht und direkt mittels Kieselgelchromatographie (70 g Kieselgel) gereinigt (Laufmittel:Hexan:Ethylacetat = 2:1).

Ausbeute: 35 mg (0,09 mmol, 7% der Theorie).

Produktcharakterisierung:

¹H NMR (400.27 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.18 (d, *J*_{Hb} = 13.5 Hz, 1H, CH_a-Ph), 3.41 (d, *J*_{Ha} = 13.5 Hz, 1H, CH_b-Ph), 3.64 (s, 3H, COOCH₃), 4.18 (m, 2H, CH₂-NH), 5.11 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.63 (m, 1H, CH-COOH), 5.35 (m, 1H, NH), 7.04-7.30 (m, 10H, C-H_{Aromat}).

¹³C NMR (100,66 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 33.2 (CH₂-CH), 34.4 (CH₂-NH), 53.4 (O-CH₃), 61.8 (CH-CO), 67.5 (Ph-CH₂), 127.3-129.2 (CH_{Aromat}), 135.1, 135.8 (C_q-Aromat), 153.4 (CN₄), 156.4 (COO-NH), 167.3 (COOCH₃).

HRMS (ESI⁺) *m/z* = 418,1494[M+Na]⁺, berechnet für C₂₀H₂₁N₅O₄Na⁺: 418,1486.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Alloc	Allyloxycarbonyl-Schutzgruppe
Äq	Äquivalente
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe
BOP	Benzotriazol-1-yl-N-oxy-tris(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphat
Cbz	Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe
Cu(I)OTf	Kupfer(I)triflat
Cu(II)OTf ₂	Kupfer(II)triflat
CuI	Kupfer(I)iodid
CuSO ₄	Kupfer(II)sulfat
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIEA	N,N-Diisopropylethylamine
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat

BF ₄ ⁻	Tetrafluoroborsäure
HBr	Bromwasserstoff
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HCl	Chlorwasserstoff
HF	Fluorwasserstoff
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
KAHA-Ligation	α -Ketoacid-Hydroxylamin-Ligation
LiAlH ₄	Lithiumaluminiumhydrid
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
m	Multiplett
MeOH	Methanol
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mRNA	messenger RNA
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₃	Ammoniak
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
POCl ₃	Phosphoroxychlorid
ppm	parts per million
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
q	Quartett
RF1	Terminationsfaktor 1
RF2	Terminationsfaktor 2
RNA	Ribonukleinsäure

s	Singulett
SO ₂ Cl ₂	Sulfurylchlorid
t	Triplett
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMP	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin
tRNA	Transfer-RNA
UV	Ultraviolett

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1, die 20 kanonischen Aminosäuren	3
Abbildung 2, nichtkanonische Aminosäuren	3
Abbildung 3, Peptidbindungswinkel und Bindungslängen	4
Abbildung 4, Konfiguration der Peptidbindung	5
Abbildung 5, Häufigkeit der cis-Peptidbindung	5
Abbildung 6, DNA und RNA Nukleobasen	6
Abbildung 7, Transkription ⁶	6
Abbildung 8, 2-stufige Katalyse durch Aminoacyl-tRNA-Synthase	7
Abbildung 9, links: Ribosom ⁶ , rechts: Übergang der Peptidkette von der P- zur A-Bindungsstelle	8
Abbildung 10, posttranslationale Modifikationen des Insulin	8
Abbildung 11, Linker-Systeme	9
Abbildung 12, Synthese des Wang-Linkers	9
Abbildung 13, Aminosäuren mit unterschiedlichen Schutzgruppen ¹³	10
Abbildung 14, Mechanismus der Boc-Schützung	10
Abbildung 15, Mechanismus der Boc-Entschützung	11
Abbildung 16, Mechanismus der Fmoc-Entschützung	11
Abbildung 17, Cbz-Entschützung	11
Abbildung 18, Alloc-Entschützung	12
Abbildung 19, Aminosäuren die eventuell Seitenkettenschutzgruppen benötigen	12
Abbildung 20, Seitenkettenschutzgruppen ¹³	13
Abbildung 21, Aminosäureaktivierung mit Nebenreaktionen	14
Abbildung 22, Carbodiimid-Mechanismus und Additive	14
Abbildung 23, Amid-Bildung mittels BOP	15
Abbildung 24, Amid-Bildung durch HATU	15
Abbildung 25, Methoden zur Ligation	16
Abbildung 26, Mechanismus der 1,3-Dipolaren Cycloaddition	17
Abbildung 27, Synthese von Tetrazol-Peptidbindungsmimetika	17
Abbildung 28, Tautomerie von 1H- und 2H-Tetrazol sowie das nichtaromatische 5H-Tetrazol	18
Abbildung 29, unterschiedliche substituierte Tetrazole	18
Abbildung 30, Medikamente die Tetrazol enthalten	18
Abbildung 31, Tetrazol Synthese durch Bladin	19
Abbildung 32, 5-Aminotetrazol Synthese	19
Abbildung 33, Finnegan et al. 1958	19
Abbildung 34, Tetrazol-Herstellung mit Katalysatoren durch Sharpless	20
Abbildung 35, Mechanismus für die Cu(I)-katalysierte Cycloaddition	20
Abbildung 36, Methoden zur Herstellung eines Aminosäureazids	20
Abbildung 37, plausibler Diazotransfermechanismus ohne Metallkatalyse	21
Abbildung 38, Mechanismus des Cu-katalysierten Diazotransfers	21
Abbildung 39, Imidazole-1-sulfonyl Azid	21
Abbildung 40, 1,5-substituiertes Tetrazol aus Aminosäurederivaten	22

Abbildung 41, Imidazole-1-sulfonyl Azid	23
Abbildung 42, Synthese des Imidazole-1-sulfonyl Azid-Salzes	23
Abbildung 43, Synthese und Ausbeuten der Aminosäureazide	24
Abbildung 44, Synthese von 2-Azidoessigsäure	24
Abbildung 45, Veresterung der Aminosäureazide	25
Abbildung 46, Vergleich der Methoden zur Veresterung	25
Abbildung 47, Ausbeuten der Veresterung	25
Abbildung 48, Mechanismus der Amid-Bildung	26
Abbildung 49, Dehydratisierung des Amids	26
Abbildung 50, einführen der Cbz-Schutzgruppe	26
Abbildung 51, 3-stufige Nitril-Herstellung	27
Abbildung 52, Ausbeuten der Nitril-Herstellung in %	27
Abbildung 53, Übersicht über die Herstellung der Nitril-Derivate	28
Abbildung 54, erste Versuche der 1,3-Dipolaren Cycloaddition	29
Abbildung 55, Ergebnisse der ersten 1,3-Dipolaren Cycloadditionen	29
Abbildung 56, in Masse gefundenes Tetrazol	29
Abbildung 57, erste Versuche mit Cbz-geschützten Substraten	30
Abbildung 58, Finale Schutzgruppenstrategie	30
Abbildung 59, Test neuer Katalysatoren und Lösungsmittel	31
Abbildung 60, erste erfolgreiche Tetrazol-Synthese	31
Abbildung 61, Ergebnisse der Reaktionen ohne Lösungsmittel; *gekaufter Katalysator	32
Abbildung 62, Racemisierung bei der Cycloaddition	33
Abbildung 63, C ¹³ -NMR-Shift in ppm	33
Abbildung 64, C ¹³ -NMR der Tetrazole	34
Abbildung 65, Versuche zur Herstellung von Tetrazolen mit zwei Seitenketten	35
Abbildung 66, sterische Hinderung der Tetrazole mit zwei Seitenketten	35

7.3 Literaturzitate

- (1) Sewald, N.; Hans-Dieter, J. *Peptides : Chemistry and Biology*; Wiley-VCH Verlag, **2002**; Vol. 3.
- (2) Zimmerman, S. S.; Scheraga, H. A. *Macromolecules* **1976**, 9 (3), 408–416.
- (3) Pauling, L.; Corey, R. B. *Nature* **1952**, 169, 494–495.
- (4) Weiss, M. S.; Jabs, A.; Hilgenfeld, R. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5 (8), 676–676.
- (5) Weiss, M. S.; Hilgenfeld, R. *Biopolymers* **1999**, 50 (5), 536–544.
- (6) Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L. *Biochemie*, 7th ed.; Springer Spektrum Verlag, **2013**.
- (7) Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L. *Biochemistry*, 5th ed.; Springer Spektrum Verlag, **2002**.
- (8) Zahn, H.; Schnabel, E.; Bremer, H. *Z Naturforsch* **1963**, 18 (1120), 1120–1121.
- (9) Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85 (14), 2149–2154.
- (10) Fuller, W. D.; Goodman, M. *Pept. Sci.* **1996**, 40 (2), 183–254.
- (11) Rink, H. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28 (33), 3787–3790.
- (12) Stathopoulos, P.; Papas, S.; Tsikaris, V. *J. Pept. Sci.* **2006**, 12 (3), 227–232.
- (13) Isidro-Ilobet, A.; Mercedes, A, Fernando, A. *Chem. Rev.* **2009**, No. 109, 2455–2504.
- (14) El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2011**, 111 (11), 6557–6602.
- (15) Taylor, P.; Albericio, F.; Chinchilla, R.; Dodsworth, D. J. *Org. Prep. Proced. Inc* **2001**, 33 (3), 205–282.
- (16) Lerner, A. B.; Lee, T. E. H. H.; Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77 (4), 1067–1068.
- (17) Rebek, J.; Feitler, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96 (5), 1606–1607.
- (18) Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16 (14), 1219–1222.
- (19) Gawen, G.; Kenner, G. W.; Sheppard, R. . *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91 (20), 5669–5671.
- (20) Gairí, M.; Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31 (50), 7363–7366.
- (21) Dourtoglou, V.; Ziegler, J.-C.; Gross, B. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19 (15), 1269–1272.
- (22) Carpino, L. A.; Imazumi, H.; El-Faham, A.; Ferrer, F. J.; Zhang, C.; Lee, Y.; Foxman, B. M.; Henklein, P.; Hanay, C.; Mügge, C.; Wenschuh, H.; Klose, J.; Beyermann, M.; Bienert, M. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, 41 (3), 441–445.
- (23) Ehrlich, A.; Heyne, H. U.; Winter, R.; Beyermann, M.; Haber, H.; Carpino, L. a.; Bienert, M. *J. Org. Chem.* **1996**, 61 (25), 8831–8838.

- (24) Kent, S. B. H. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38 (2), 338–351.
- (25) Rose, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 30–33.
- (26) Kochendoerfer, G. G.; Kent, S. B. H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3 (6), 665–671.
- (27) Huisgen, R. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1963**, 2 (11), 633–645.
- (28) Huisgen, R. *J. Org. Chem.* **1976**, 41 (3), 403–419.
- (29) Huisgen, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108 (2), 6401–6402.
- (30) Huisgen, R. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1963**, 2 (10), 565–598.
- (31) Firestone, R. a. *J. Org. Chem.* **1968**, 33 (June), 2285–2290.
- (32) Rostovtsev, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, 41 (14), 2596–2599.
- (33) Caramella, P.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98 (20), 6397–6399.
- (34) Caramella, P.; Ruth, I.; Gandour, W.; Hall, J. A.; Deville, C. G.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99 (2), 358–392.
- (35) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, 67 (9), 3057–3064.
- (36) Breidenbach, M. A.; Gallagher, J. E. G.; King, D. S.; Smart, B. P.; Wu, P.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, 107 (9), 3988–3993.
- (37) Tam, A.; Arnold, U.; Soellner, M. B.; Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (42), 12670–12671.
- (38) Valle, G.; Johnson, R. L. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1988**, 53, 2863–2876.
- (39) May, B. C. H.; Abell, A. D. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42 (33), 5641–5644.
- (40) Hung, K. Y.; Harris, P. W. R.; Brimble, M. A. *Synlett* **2009**, No. 8, 1233–1236.
- (41) Nachman, R. J.; Zabrocki, J.; Olczak, J.; Williams, H. J.; Moyna, G.; Ian Scott, a.; Coast, G. M. *Peptides* **2002**, 23 (4), 709–716.
- (42) Zabrocki, J.; Dunbar, J. J. B.; Marshall, K. W.; Toth, M. V; Marshall, G. R. *J. Org. Chem.* **1992**, 57 (1), 202–209.
- (43) Yu, K.; Johnson, R. L. *J. Org. Chem.* **1987**, 2 (3), 2051–2059.
- (44) Ostrovskii, V. A.; Trifonov, R. E.; Popova, E. A. *Russ. Chem. Bull.* **2012**, 61 (4), 768–780.
- (45) Myznikov, L. V; Hrabalek, A.; Koldobskii, G. I. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2007**, 43 (1), 1–9.
- (46) Malik, M. A.; Wani, M. Y.; Al-Thabaiti, S. A.; Shiekh, R. A. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2014**, 78 (1-4), 15–37.
- (47) Butler, R. N. *Tetrazoles*; Potts, K. T., Ed.; Pergamon, **1984**; Vol. 5.

- (48) Bladin, J. A. *Chem. Ber.* **1885**, *18*, 1544-1545.
- (49) Bamberger, E.; De Gruyter, P. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1893**, *26* (3), 2385–2397.
- (50) Hantzsch, A.; Vagt, A. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1901**, *314* (3), 339–369.
- (51) v. Braun, J.; Keller, W. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser.)* **1932**, *65* (10), 1677–1680.
- (52) Finnegan, W.; Henry, R.; Lofquist, R. *J. Am. ...* **1958**, *80* (4), 3908–3911.
- (53) Demko, Z. P.; Sharpless, K. B. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (24), 7945–7950.
- (54) Demko, Z. P.; Sharpless, K. B. *Org. Lett.* **2002**, *4* (15), 2525–2527.
- (55) Bosch, L.; Vilarrasa, J. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46* (21), 3926–3930.
- (56) Yan, R.-B.; Yang, F.; Wu, Y.; Zhang, L.-H.; Ye, X.-S. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (52), 8993–8995.
- (57) Nyffeler, P. T.; Liang, C. H.; Koeller, K. M.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (36), 10773–10778.
- (58) Pandiakumar, A. K.; Sarma, S. P.; Samuelson, A. G. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55* (18), 2917–2920.
- (59) Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V. *Org. Lett.* **2007**, *9* (19), 3797–3800.
- (60) Ye, H.; Liu, R.; Li, D.; Liu, Y.; Yuan, H.; Guo, W.; Zhou, L.; Cao, X.; Tian, H.; Shen, J.; Wang, P. G. *Org. Lett.* **2013**, *15* (1), 18–21.
- (61) Fischer, N.; Goddard-Borger, E. D.; Greiner, R.; Klapötke, T. M.; Skelton, B. W.; Stierstorfer, J. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (4), 1760–1764.
- (62) Bavetsias, V.; Marriott, J. H.; Melin, C.; Kimbell, R.; Matusiak, Z. S.; Boyle, F. T.; Jackman, A. L. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (10), 1910–1926.
- (63) Cam, T. H.; Bouillère, F.; Johannesen, S.; Zulauf, A.; Panel, C.; Pouilhès, A.; Gori, D.; Alezra, V.; Kouklovsky, C. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (9), 4177–4187.